



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

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

**ANA CLARA SANTOS DA FONSECA BASTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO E DO PAPEL  
FUNCIONAL DA OSTEOPONTINA-C NA LEUCEMIA  
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

**Orientadora:** Profa. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Mariana Emerenciano

**RIO DE JANEIRO**

**2020**



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

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

**ANA CLARA SANTOS DA FONSECA BASTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO E DO PAPEL  
FUNCIONAL DA OSTEOPONTINA-C NA LEUCEMIA  
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Mariana Emerenciano

**RIO DE JANEIRO**  
**2020**

**FICHA CATALOGRÁFICA SERÁ ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INCA  
PARA A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO**

**(A ser impressa no verso da primeira folha de rosto)**

**INDICAR APENAS AS PALAVRAS-CHAVE NA VERSÃO APRESENTADA PARA A  
DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO**

Palavras-chave: 1. Osteopontina 2. Isoformas de *splicing* 3. Leucemogênese 4. Leucemias



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

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

**ANA CLARA SANTOS DA FONSECA BASTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO E DO PAPEL  
FUNCIONAL DA OSTEOPONTINA-C NA LEUCEMIA  
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

**Orientadora:** Profa. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Mariana Emerenciano

**Aprovada em:** 06/03/2020

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho** – INCA (Presidente - Titular)

**Prof. Dr. Julio Cesar Madureira de-Freitas-Junior** – INCA (Titular)

**Profa. Dra. Elaine Sobral da Costa** – UFRJ (Titular)

**Profa. Dra. Andreia Melo** – INCA (Suplente)

**Profa. Dra. Rosane Vianna-Jorge** – UFRJ (Suplente)

**RIO DE JANEIRO**

**2020**

*Aos pacientes pediátricos e seus familiares,  
toda a minha dedicação, solidariedade e respeito*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por sempre iluminarem e guiarem meus passos, despertando em mim o amor pela ciência e permitindo com que tudo isso acontecesse.

Aos meus pais, pelo incentivo e amor incondicional depositados em mim. Por serem tão presentes em todos os momentos e as minhas maiores fontes de amor e inspiração!

A minha avozinha, que mesmo distante compreende a aceita a saudade, sempre rezando e me enchendo de amor e comidas!

A Dra Etel Gimba, minha orientadora, por permitir com que eu realizasse o meu maior sonho. Agradeço por ter confiado a mim esse projeto pelo qual sou apaixonada. Por estar comigo em cada passo, me orientando, incentivando e apoiando. Por ser paciente, incansável e nunca medir esforços em busca do meu melhor. Minha grande inspiração!

A Dra. Mariana Emerenciano, minha co-orientadora, por me acolher tão bem em seu grupo, sempre se mostrando tão presente e disposta a contribuir. Agradeço por todos os seus ensinamentos.

A Dra. Luciana Bueno, que tanto auxiliou na minha orientação ao longo desse tempo. Agradeço por toda a sua contribuição científica e principalmente pela amizade e companheirismo que construímos ao longo do tempo. Meu grande exemplo de cientista e ser humano!

A Ma. Josiane Tessmann, a irmã que não tive e que o INCA me presenteou. Palavras não cabem aqui para expressar toda minha gratidão. Agradeço sua cumplicidade, amizade e carinho. Por toda a troca científica, pelas madrugadas no laboratório, por me ensinar tantos experimentos! Por acreditar em mim quando eu mesma descredito, por compartilhar dos meus momentos de felicidade e principalmente daqueles mais difíceis. Você é rara!

A Bianca Diniz, a segunda irmã que o INCA me presenteou. Agradeço por tua presença de fé, força e carinho tão grande em minha vida! Por sempre me receber com teu abraço acolhedor e com tua alegria que contagia a todos que tem o privilégio de conviver com você!

As minhas mascotinhas, Bruna e Dani. A presença de vocês faz com que os dias se tornem mais leves! Agradeço por todas as trocas científicas e por esse laço tão especial de amizade que foi construído entre nós. Vocês são incríveis!

Ao Grupo de Biomarcadores Neoplásicos, a cada uma das meninas que sempre estiveram tão dispostas a ajudar nos experimentos, compartilhando o dia-a-dia do laboratório. Agradeço aquelas que permanecem, como também aquelas que já se despediram. Agradeço a Abigail, Amanda, Ana Emília, Bruna, Dani, Gabriela, Luciana, Mariana e Vanessa.

A todos os MECS, por serem tão acolhedores e contribuírem tanto para a minha melhor compreensão sobre as leucemias. Agradeço especialmente aqueles que se tornaram amigos e contribuíram para o meu projeto, em especial a Dra. Marcela Mansur, Dra. Carol Barbieri, Dra. Thayana Barbosa, Ma. Carol Poubel, Ma. Ana Luiza, Amanda Chu, Karol Wolch e o Me Júlio Show, meu grande parceiro de experimentos!

Ao Grupo de Estrutura e Dinâmica Celular, liderado pelo Dr. Jose Morgado, por toda contribuição científica e auxílio nos experimentos de biologia celular. Agradeço especialmente ao Dr. Wallace Araújo, Dra. Annie Squiavinato, Dr. Pedro Barcelos, Dr. Murilo Ramos, Dra. Renata Machado, Ma Josiane Tessmann, Me Perony Nogueira, Cássio e Renata Ivo.

Ao Grupo de Glicobiologia do Câncer, liderado pelo Dr. Julio Madureira, por toda a contribuição científica e auxílio nos experimentos de migração e invasão. Agradeço a Ma. Érika Elias, Jéssica Andrade e Michelle Ferreira.

A toda equipe técnica, Giovani e Andreia, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto. E a Jessica por ser uma pessoa tão animada e otimista, sempre nos ajudando em tudo!

Ao Grupo da Pesquisa Clínica, em especial a Dra. Isabella Guimarães e ao Me Renan Fernandes, por todas as discussões científicas, pelas ideias criativas de experimentos, pelas conversas motivadoras e por sempre serem tão solícitos.

Ao Grupo de Imunologia de Tumores, liderado pelo Dr. Martin Bonamino, por me permitir o uso do Nucleofector 4D. Agradeço especialmente ao Me Marco Antonio por toda a paciência em me ensinar a transfectar as células em suspensão.

Ao Grupo de Bioinformática e Ciência Computacional, liderado pela Dra. Mariana Boroni, pela colaboração nas análises de bioinformática.

Aos amigos que fiz no alojamento no INCA, vindos de diversos cantos do Brasil, tornando os meus dias mais felizes e cheios de sotaques diferentes! Agradeço a Amanda, Bianca, Josiane, Nathalia, Taiara, Taisnara, Geisiane, Eduardo, Elielson e Perony.

Aos meus amigos especiais, Babis, Gabi, Felipe, Fefa, Leandro, Lívia, Malena, Tainá, Paola, Pri e Vinícius, por permanecerem presentes me dando tanto carinho! Agradeço por sempre acreditarem e torcerem por mim, por me acalmarem e serem tão compreensivos nos momentos em que estive ausente. Eu sou muito mais feliz por ter vocês na vida!

A Luana, por se tornar cada dia mais especial me mostrando que a distância é relativa, se fazendo tão presente nos meus dias! Agradeço a torcida, companheirismo e carinho!

Aos pacientes, que mesmo enfrentando um momento de extrema dificuldade, se dispuseram a participar do estudo e sempre têm um sorriso para nos inspirar!

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,  
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”*

***Carl Jung***





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

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO E DO PAPEL FUNCIONAL DA  
OSTEOPONTINA-C NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

**RESUMO**

**Dissertação de mestrado**

**Ana Clara Santos da Fonseca Bastos**

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o câncer mais comumente diagnosticado na infância, sendo as originadas de células B, as mais frequentes (LLA-B). A presença de rearranjos gênicos está associada à estratificação de risco e prognóstico da doença. Pacientes positivos para a fusão gênica *KMT2A-AFF1* são incluídos no subgrupo de pior prognóstico, com elevado risco de recaída e acometimento do sistema nervoso central (SNC). Dentre os produtos gênicos de expressão alterada nas LLAs, está osteopontina (OPN). A OPN é uma glicofosfoproteína de matriz extracelular envolvida em diversas etapas da progressão tumoral. O transcrito primário da OPN apresenta *splicing* alternativo gerando três isoformas, denominadas OPNa, OPNb e OPNc. Essas isoformas apresentam um perfil de expressão e papéis tecido-tumores específicos. Na LLA, já foi demonstrado que a OPN total, ou seja, a soma de todas as isoformas da OPN oriundas de modificações pós transcricionais e traducionais, suporta a dormência das células e sua sobrevivência em resposta ao tratamento com quimioterápicos. Entretanto, os papéis das isoformas da OPN na LLA-B ainda não foram elucidados. Sendo assim, nosso estudo buscou investigar o perfil de expressão transcricional e os papéis das isoformas da OPN na LLA-B *KMT2A-AFF1*. Desta forma, analisamos amostras de pacientes LLA-B disponíveis no banco de dados TARGET e observamos que a maioria expressava as três isoformas da OPN. Para confirmar esse resultado, analisamos amostras do INCA de pacientes LLA-B positivos para *KMT2A-AFF1* (n=26) ou *ETV6-RUNX1* (n=28, grupo comparativo). Os níveis de expressão transcricional das isoformas da OPN foram analisados por RT-qPCR. Demonstramos que a OPNc foi a isoforma superexpressa no subgrupo *KMT2A-AFF1* e que está associada à características desfavoráveis da doença. Para investigar o papel da OPNc na LLA-B *KMT2A-AFF1*, escolhemos a linhagem celular RS4;11. As células RS4;11 foram transfectadas com oligômeros de DNA anti-senso anti-OPNc ou sua respectiva sequência controle *scramble*, utilizando o sistema Nucleofector 4D. A eficiência do silenciamento foi avaliada por RT-qPCR e imunofluorescência. Observamos que mediante o silenciamento da OPNc as células aumentaram sua proliferação, porém diminuíram sua viabilidade, capacidade adesiva, migratória e invasiva. Com base nesses resultados, nossa hipótese é que a OPNc pode controlar a habilidade das células leucêmicas em invadirem o SNC, contribuindo para um fenótipo mais agressivo na LLA-B.



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

**CARACTERIZATION OF OSTEONPONTIN-C EXPRESSION PROFILE AND  
FUNCTIONAL ROLES IN B CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

**ABSTRACT**

**Master degree dissertation**

**Ana Clara Santos da Fonseca Bastos**

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most commonly diagnosed pediatric cancer. Within ALL, those originating from B-cells are the most frequent (B-ALL). The occurrence of specific gene rearrangements is associated with prognostic risk stratification. Patients harboring the *KMT2A-AFF1* gene fusion are included in the poor prognostic subgroup, with increased risk of relapse and central nervous system (CNS) involvement. Among several gene products presenting aberrant expression in ALL, osteopontin (OPN) has been reported. OPN is a matricellular glycoposphoprotein involved in several steps of tumor progression. OPN primary transcript is subject to alternative splicing, generating at least three splice isoforms (OPN-SI), named OPNa, OPNb, OPNc. These OPN-SI display tumor and tissue-specific roles. In ALL, it has been reported that total OPN, the sum of all OPN isoforms generated from transcriptional and translational modifications, supports tumor dormancy and cell survival in response to chemotherapeutic drugs. However, the putative roles of OPN-SI in B-ALL cells have not been addressed. In this scenario, our study aims to evaluate the expression profiles and roles of OPN-SI in B-ALL presenting *KMT2A-AFF1*. We analyzed B-ALL samples available on TARGET database and we demonstrated that most patients express the three OPN-SI. To confirm this result, we also analyzed patients' samples containing *KMT2A-AFF1* (n = 26) or the *ETV6-RUNX1* (n = 28, as our comparative group) gene rearrangements from INCA. OPN-SI transcriptional expression levels were evaluated by RT-qPCR. We demonstrated that OPNc is the most upregulated OPN-SI in the *KMT2A-AFF1* subgroup and is associated with poor prognostic risk features. To investigate the putative roles of OPNc on modulating cellular and molecular aspects of B-ALL presenting *KMT2A-AFF1*, we choose RS4;11 cell line for our study. The RS4;11 was transfected with DNA oligomer targeting OPNc (ASO anti-OPNc) or a scrambled control sequence (ASO scramble) using the 4D-nucleofector. The efficiency of OPNc knockdown was analyzed using RT-qPCR and immunofluorescence. We found that RS4;11 OPNc-silenced cells increased proliferation, while decreased cell viability, adhesion to matrigel and osteoblast cell matrix, as well as migration and invasion rates, when compared to ASO scrambled-transfected cells. We then hypothesize that OPNc may control the leukemic cell's ability to detach from the bone marrow matrix, while decreasing cell proliferation and acquiring invasive properties, possibly being able to infiltrate the central nervous system, contributing to a more aggressive B-ALL phenotypes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.1</b> - Frequência das alterações cromossômicas mais comuns na LLA-B pediátrica .....	21
<b>Figura 1.2</b> - Representação esquemática das translocações envolvendo os cromossomos 12 e 21 .....	22
<b>Figura 1.3</b> - Representação esquemática das translocações envolvendo os cromossomos 4 e 11 .....	24
<b>Figura 1.4</b> - Evolução clonal das células leucêmicas até a recaída a partir de um clone pré-leucêmico .....	28
<b>Figura 1.5</b> - Representação dos domínios estruturais da OPN .....	31
<b>Figura 1.6</b> - Estrutura das isoformas de <i>splicing</i> da OPN .....	33
<b>Figura 1.7</b> - Modelo de indução das células leucêmicas à dormência no nicho endosteal da medula óssea .....	36
<b>Figura 1.8</b> - Os distintos papéis da OPN na leucemogênese .....	37
<b>Figura 4.1</b> - Fluxograma do desenho experimental realizado no estudo.....	40
<b>Figura 5.1</b> - Frequência de pacientes pediátricos com LLA-B que expressam as isoformas OPNa, OPNb e OPNc .....	53
<b>Figura 5.2</b> - Expressão das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes LLA-B disponíveis no banco de dados TARGET .....	53
<b>Figura 5.3</b> - Associação da expressão das isoformas OPNa, OPNb e OPNc os <i>status</i> de acometimento do SNC de pacientes LLA-B disponíveis no banco de dados TARGET .....	55
<b>Figura 5.4</b> - Frequência de pacientes pediátricos com LLA-B contendo a fusão <i>KMT2A-AFF1</i> ou <i>ETV6-RUNX1</i> que expressam as isoformas OPNa, OPNb e OPNc .....	58
<b>Figura 5.5</b> - Expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes LLA-B contendo a fusão <i>KMT2A-AFF1</i> ou <i>ETV6-RUNX1</i> .....	59
<b>Figura 5.6</b> - Associação da expressão transcricional da isoforma OPNc com características de risco e prognóstico desfavoráveis em LLA-B .....	61
<b>Figura 5.7</b> - Imagem da linhagem celular RS4;11 de LLA-B que contém a fusão <i>KMT2A-AFF1</i> .....	62
<b>Figura 5.8</b> - Perfil de expressão da fusão <i>KMT2A-AFF1</i> na linhagem celular RS4;11 .....	63
<b>Figura 5.9</b> - Perfil de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc na linhagem celular RS4;11 .....	63

<b>Figura 5.10</b> - Ensaio de imunofluorescência para análise da localização subcelular da OPNc na linhagem celular RS4;11 .....	64
<b>Figura 5.11</b> - Silenciamento da expressão da OPNc na linhagem celular RS4;11 .....	65
<b>Figura 5.12</b> - Ensaio de imunofluorescência para análise da localização da expressão da OPNc na linhagem celular RS4;11 após 36h de silenciamento da OPNc .....	67
<b>Figura 5.13</b> - Índice de viabilidade da linhagem celular RS4;11 após o silenciamento da expressão da OPNc .....	69
<b>Figura 5.14</b> - Índice de proliferação da linhagem celular RS4;11 em resposta ao silenciamento da expressão da OPNc na linhagem celular RS4;11 .....	70
<b>Figura 5.15</b> - Índice de adesão da linhagem celular RS4;11 sobre matrigel em resposta ao silenciamento da expressão da OPNc .....	71
<b>Figura 5.16</b> - Imagem da matriz extracelular secretada pela linhagem celular MC3T3-E1 .....	71
<b>Figura 5.17</b> - Índice de adesão celular à matriz extracelular secretada pelos osteoblastos da linhagem celular MC3T3-E1 em resposta ao silenciamento da expressão da OPNc .....	72
<b>Figura 5.18</b> - Índice de migração da linhagem celular RS4;11 após o silenciamento da expressão da OPNc .....	73
<b>Figura 5.19</b> - Índice de invasão da linhagem celular RS4;11 após o silenciamento da expressão da OPNc .....	74
<b>Figura 7.1</b> - Modelo hipotético dos possíveis papéis da OPNc na modulação de distintos aspectos da biologia da LLA-B contendo a fusão gênica <i>KMT2A-AFF1</i> .....	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> - Principais alterações primárias e as alterações secundárias cooperativas em LLA-B* .....	20
<b>Tabela 4.1</b> - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a análise de RT-PCR .....	44
<b>Tabela 4.2</b> - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a análise de RT-Qpcr .....	45
<b>Tabela 5.1</b> - Características clínicas de pacientes pediátricos com LLA-B disponíveis no banco de dados TARGET* .....	52
<b>Tabela 5.2</b> - Características clínicas dos pacientes diagnosticados com LLA-B de casuística do INCA .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

AKT – do inglês *protein kinase B*  
ALL - do inglês *Acute Lymphoblastic Leukemia*  
aPKC – do inglês *Atypical protein kinase C*  
ASO – do inglês *Anti-sense oligomer*  
ATCC - *American Type Culture Collection*  
BSA - do inglês *bovine serum albumin*  
BSP - do inglês *bone sialoprotein*  
CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio  
Céls. - Células  
CD44v3 – do inglês *CD44 variant 3*  
CD44v6 - do inglês *CD44 variant 6*  
CD44v7 - do inglês *CD44 variant 7*  
cDNA- do inglês *complementary DNA*  
CN - controle negativo  
CNS – do inglês *central nervous system*  
CP - controle positivo  
CP– campo  
CT – do inglês *cycle threshold*  
DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol  
DEPC - dietil pirocarbonato  
DMP1 – do inglês *dentin matrix acidic phosphoprotein 1*  
DMSO - dimetilsulfóxido  
DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*  
dNTP - desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
DSPP- do inglês *dentin sialophosphoprotein*  
ETA1 – do inglês *early T-lymphocyte activation 1 protein*  
FISH – do inglês *fluorescence in situ hybridization*  
FITC – do inglês fluorescein isothiocyanate  
G0 – do inglês *Gap 0*  
G1 – do inglês *Gap 1*  
G2 – do inglês *Gap 2*  
HUVEC – do inglês *human umbilical vein endothelial cells*  
INCA - Instituto Nacional do Câncer  
JAK – do inglês *Janus kinase*  
LCR - líquido cefalorraquidiano  
LLA – leucemia linfoblástica aguda  
LLA-B – leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B  
LLA-B SOE - leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B sem outras especificações  
LMA - leucemia mieloide aguda  
LMC - leucemia mieloide crônica  
MEK – do inglês *raf-mitogen-activated protein kinase*  
MEM- $\alpha$  – do inglês *Minimum Essential Medium alpha*  
MgCl<sub>2</sub>- cloreto de magnésio  
MLPA – do inglês *multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*  
MMP2 – do inglês *matrix metalloproteinases 2*  
MMP9 - do inglês *matrix metalloproteinases 2*  
MO- medula óssea  
mTOR – do inglês *mammalian target of rapamycin*  
MTT- brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]

NCI – National Cancer Institute  
 NF- $\kappa$ B – do inglês *factor nuclear kappa B*  
 OPN - osteopontina  
 OPN4 – osteopontina-4  
 OPN5 – osteopontina-5  
 OPNa – osteopontina-a  
 OPNb – osteopontina-b  
 OPNc – osteopontina-c  
 OPNi - osteopontina intracelular  
 OPNs - osteopontina secretada  
 OPN-SI - do inglês *osteopontin splicing isoforms*  
 OPNt - osteopontina total  
 P1- passagem 1  
 P10- passagem 10  
 PBS – do inglês *phosphate buffered saline*  
 PBS/CM – do inglês *calcium and magnesium phosphate buffered saline*  
 PFA - paraformaldeído  
 PI3K – do inglês *phosphoinositide 3-kinase*  
 PM – peso molecular  
 PTEN – do inglês *phosphatase and tensin homolog*  
 Raf-1 – do inglês *rapidly accelerated fibrosarcoma protein*  
 RAS – do inglês *rat sarcoma virus protein*  
 RGD – sequencia de aminoácidos arginina-glicina-asparagina  
 RNA – do inglês *ribonucleic acid*  
 RNAm - RNA mensageiro  
 RPKM - do inglês *Reads Per Kilobase Million*  
 Rpm – rotação por minuto  
 RPMI – do inglês *Roswell Park Memorial Institute medium*  
 RSK - Domínio de clivagem da trombina  
 RT-PCR - do inglês *Real Time-Polymerase Chain Reaction*  
 RT-qPCR - do inglês *quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction*  
 SCD – do inglês *stearoyl-CoA desaturase-1*  
 SDS - do inglês *sodium lauryl sulfate*  
 SFB - soro fetal bovino  
 SG - sobrevida global  
 SIBLING - do inglês *Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein*  
 SLE - sobrevida livre de eventos  
 SNC - sistema nervoso central  
 SNC1 -Grupo de pacientes que não apresentaram acometimento do SNC  
 SNC2 -Grupo de pacientes que apresentaram um valor de acometimento do SNC de  $\leq 5$  células/ $\mu$ L  
 SNC3 - Grupo de pacientes que apresentaram total acometimento do SNC  
 SNPs – do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*  
 SPP1 – do inglês *Secreted phosphoprotein 1*  
 TA - temperatura ambiente  
 TARGET - *Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments*  
 TP53 – do inglês *tumor protein p53*  
 UDG – do inglês *Uracil-DNA Glycosylase*  
 UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro  
 VEGF – do inglês *vascular endothelial growth factor*  
 VLA-4 – do inglês *very late antigen-4*

# SUMÁRIO

<b>1) INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1) Leucemia linfoblástica aguda.....	18
1.1.1) Definição e epidemiologia .....	18
1.2) Alterações genéticas e cromossômicas na LLA.....	19
1.2.1) Translocação cromossômica t(12;21)(p13;q22) – <i>ETV6-RUNX1</i> .....	22
1.2.2) Translocação cromossômica t(4;11)(q21;q23) – <i>KMT2A-AFF1</i> .....	23
1.3) Recaída e acometimento do SNC na LLA-B .....	25
1.3.1) Definição e epidemiologia .....	25
1.3.2) Recaídas na MO .....	26
1.3.3) Recaídas no SNC.....	26
1.3.4) A biologia da recaída na LLA-B .....	27
1.4) Osteopontina .....	29
1.4.1) OPN e estrutura .....	30
1.4.2) OPN e polimorfismos.....	321
1.4.3) OPN e suas isoformas de <i>splicing</i> .....	32
1.4.4) OPN e suas isoformas de <i>splicing</i> na biologia tumoral.....	33
1.4.5) OPN e leucemia.....	35
<b>2) JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>38</b>
<b>3) OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
3.1) OBJETIVO GERAL .....	39
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>4) METODOLOGIA .....</b>	<b>40</b>
4.1) Análise de bioinformática .....	41
4.2) Coleta das amostras de pacientes da casuística do INCA .....	41
4.3) Cultura de células .....	42
4.4) Extração de RNA .....	42
4.5) Síntese de cDNA .....	43
4.6) RT-PCR.....	44
4.7) PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	44
4.8) Imunofluorescência .....	45
4.9) Silenciamento da OPNc na linhagem celular RS4;11 .....	46
4.10) Ensaio de viabilidade celular.....	46
4.11) Ensaio de proliferação celular .....	47



4.12) Ensaio de adesão celular .....	48
4.13) Ensaio de migração celular .....	49
4.14) Ensaio de invasão celular .....	50
4.15) Análises estatísticas.....	50
<b>5) RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1) Avaliação da expressão das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes pediátricos com LLA-B do banco de dados TARGET .....	51
5.1.1) Características clínicas de pacientes pediátricos com LLA-B .....	51
5.1.2) Níveis de expressão das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes pediátricos com LLA-B .....	52
5.1.3) Associação da expressão das isoformas OPNa, OPNb e OPNc com o acometimento do SNC em pacientes pediátricos com LLA-B.....	54
5.2) Avaliação da expressão das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes pediátricos com LLA-B de casuística do INCA .....	56
5.2.1) Características clínicas de pacientes pediátricos com LLA-B contendo a fusão gênica <i>KMT2A-AFF1</i> ou <i>ETV6-RUNX1</i> .....	56
5.2.2) Níveis de expressão das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes pediátricos com LLA-B contendo a fusão gênica <i>KMT2A-AFF1</i> ou <i>ETV6-RUNX1</i> .....	57
5.2.3) A expressão da isoforma OPNc está associada com características de risco e prognóstico desfavoráveis em amostras pediátricas de LLA-B .....	60
5.3) Expressão das isoformas OPNa, OPNb e OPNc na linhagem celular RS4;11 de LLA-B .....	62
5.3.1) Caracterização da linhagem celular RS4;11.....	62
5.4) Silenciamento da OPNc na linhagem celular RS4;11 .....	64
5.5) Ensaios funcionais para avaliação do efeito do silenciamento da expressão da OPNc na linhagem celular RS4;11 .....	68
5.5.1) O silenciamento da OPNc diminui a viabilidade das células RS4;11.....	68
5.5.2) O silenciamento da OPNc aumenta a proliferação das células RS4;11 .....	69
5.5.3) O silenciamento da OPNc diminui a capacidade de adesão células RS4;11 .....	70
5.5.4) O silenciamento da expressão da OPNc diminui a capacidade de migração e invasão das células RS4;11 .....	73
<b>6) DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>7) CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>8) PERSPECTIVAS .....</b>	<b>86</b>
<b>9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>87</b>

**10) ANEXOS ..... 101**



## **1) INTRODUÇÃO**

### **1.1) Leucemia linfoblástica aguda**

#### **1.1.1) Definição e epidemiologia**

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é definida como uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação clonal e maligna de células progenitoras linfoides imaturas, as quais acumulam-se no nicho endosteal da medula óssea (MO), impedindo o processo da hematopoiese normal (COBALEDA & SÁNCHEZ-GARCÍA, 2009). Nesse processo, as células progenitoras linfoides sofrem uma interrupção em seu processo de diferenciação e proliferam de maneira exacerbada. Esse descontrole tem sido atribuído à presença de alterações genéticas e moleculares em genes fundamentais na regulação dessas vias, bem como à existência de um microambiente que permita a manutenção da leucemogênese (MULLIGHAN, 2012; KUMAR *et al.*, 2018). Os componentes presentes no microambiente da MO são conhecidos por regular a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células-tronco hematopoiéticas em condições normais. Com a presença das células leucêmicas nesse nicho, todas as funções normais desempenhadas pelos componentes do microambiente da MO são desreguladas, de forma a sustentar a leucemogênese (YAN *et al.*, 2015). Além disso, essas células progenitoras imaturas também podem ser capazes de infiltrar diversos sítios extramedulares, como: sistema nervoso central (SNC), testículos, fígado, baço e ovários (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

A LLA é uma doença heterogênea em níveis clínicos, genéticos e demográficos. É o câncer mais comumente diagnosticado na infância, correspondendo a aproximadamente 35% dos casos de cânceres pediátricos (MOORMAN, 2016; GLOBOCAN, 2020). O número de novos casos de leucemia esperados para o Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 5.920 casos em homens e 4.890 em mulheres (INCA, 2020). Embora 80% das LLAs acometam crianças entre 3-6 anos, é uma doença que pode acontecer em indivíduos de qualquer idade, sendo mais prevalente naqueles do sexo masculino, correspondendo a 55% dos pacientes pediátricos (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). Nos últimos anos, com o desenvolvimento de melhores abordagens terapêuticas e maiores conhecimentos a respeito da biologia da doença, a sobrevida de pacientes com LLA tem aumentado consideravelmente, porém varia drasticamente de acordo com a idade dos pacientes. Quando tratados com os protocolos mais modernos, os pacientes pediátricos apresentam uma sobrevida global (SG) em torno de 90%, enquanto os adultos entre 25-50

anos apresentam uma SG de 40%. Já aqueles com idade superior a 50 anos apresentam uma SG inferior a 20% (BHOJWANI *et al.*, 2015; MOORMAN, 2016). Apesar de todos os avanços no tratamento da doença, as taxas de recaída entre os pacientes pediátricos com LLA ainda correspondem a 20%, sendo um grande desafio clínico (MOORMAN *et al.*, 2010).

Dentre os tipos de LLAs, aquelas que se originam de células precursoras B (LLA-B) são as mais comuns, correspondendo a cerca de 85% dos casos de LLA em pacientes pediátricos e 75% dos casos em pacientes adultos (BHOJWANI *et al.*, 2015). A LLA-B é definida como uma neoplasia hematológica de células linfóides B imaturas, as quais podem apresentar alguns tipos de alterações genéticas e cromossômicas, que contribuirão para sua rápida auto-renovação e inibição de seu processo de maturação (HUNGER; MULLIGHAN, 2015; LOGHAVI; KUTOK; JORGENSEN, 2015)

## **1.2) Alterações genéticas e cromossômicas na LLA**

A aquisição de alterações genéticas ou cromossômicas nas células leucêmicas de pacientes com LLA é um dos principais pilares desta doença, uma vez que sua identificação auxilia no diagnóstico, na estratificação de risco da doença, na determinação do prognóstico do paciente e na definição da terapia em que o mesmo será submetido. Nos últimos anos, uma série de alterações genéticas e cromossômicas na LLA têm sido caracterizadas e essas costumam estar associadas às características clínico-demográficas dos pacientes, como: idade, leucometria e imunofenótipo. Essas alterações também têm se mostrado fortemente associadas a resposta ao tratamento e ao desfecho clínico desses pacientes (MOORMAN, 2012; ZHANG *et al.*, 2019).

Em pacientes pediátricos com LLA, as alterações genéticas podem ser divididas em primárias ou secundárias. Segundo a hipótese de Greaves, as alterações primárias são as responsáveis pela iniciação do clone pré-leucêmico e acontecem na fase intrauterina. Após o nascimento e durante a infância, os clones pré-leucêmicos adquirem alterações secundárias cooperativas, ocasionando o desenvolvimento e manutenção da LLA. Além disso, muitos estudos têm demonstrado que um clone pré-leucêmico pode permanecer latente durante anos até o diagnóstico da LLA (GREAVES, 2006).

As alterações primárias na LLA são normalmente translocações cromossômicas, resultando em fusões gênicas ou aneuploidias (ganho ou perda de múltiplos cromossomos inteiros). Observam-se também alterações secundárias, que costumam ser alterações no número de cópias (frequentemente deleções de únicos ou poucos éxons de um gene) ou mutações pontuais. Segundo Anderson e colaboradores, as alterações primárias podem ser

definidas como aquelas presentes em todos os clones leucêmicos, sendo as responsáveis pelas principais características da leucemia. Por outro lado, as alterações secundárias estão presentes em apenas uma parte dos clones leucêmicos, dando assim origem a uma arquitetura sub-clonal mais complexa e heterogênea (ANDERSON *et al.*, 2011). Algumas alterações secundárias são mais frequentemente observadas em subgrupos citogenético-moleculares específicos, conforme descrito na Tabela 1.1. Estas alterações primárias e secundárias na LLA, em conjunto, colaboram para a manutenção e progressão da leucemia (Tabela 1.1) (MOORMAN, 2016).

**Tabela 1.1 – Principais alterações primárias e as alterações secundárias cooperativas em LLA-B\***

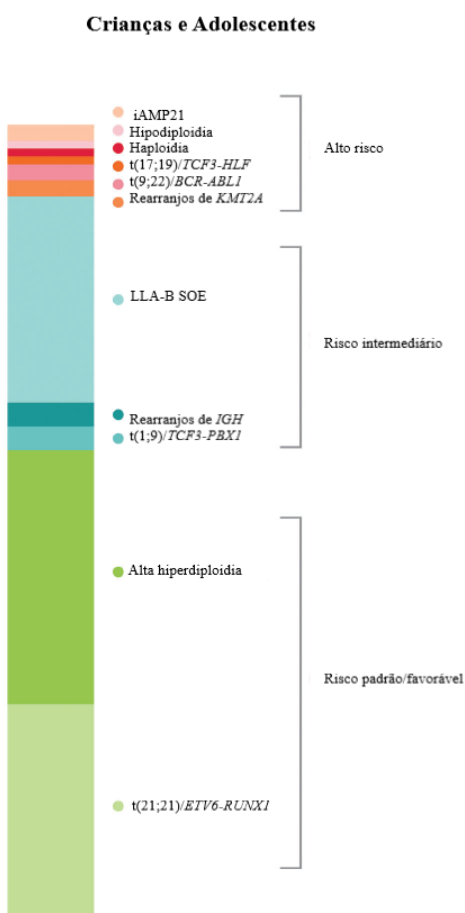
Alterações cromossômicas primárias	Alterações secundárias cooperativas			
	Diferenciação linfoide	Regulação do ciclo celular	Proliferação e sobrevivência celular	Cofatores transcricionais
t(12;21)/ <i>ETV6-RUNX1</i>	<i>PAX5</i>			<i>ETV6, BTG1, TBLXR1</i>
Alta hiperdiploidia			<i>KRAS, NRAS</i>	<i>CREBBP</i>
t(1;19)/ <i>TCF3-PBX1</i>	<i>TCF3, PAX5</i>	<i>CDKN2A/B</i>		
Rearranjos de <i>IGH</i>	<i>IKZF1</i>	<i>CDKN2A/B</i>		
LLA-B SOE	<i>PAX5, IKZF1</i>	<i>CDKN2A/B</i>	<i>KRAS, NRAS, CRLF2, JAK2</i>	
t(9;22)/ <i>BCR-ABL1</i>	<i>PAX5, IKZF1</i>	<i>CDKN2A/B</i>		
Rearranjos de <i>KMT2A</i>		<i>CDKN2A/B</i>	<i>KRAS, NRAS, FLT3</i>	
iAMP21		<i>RB1</i>	<i>RAS, FLT3, CRLF2</i>	
Cariótipo Complexo		<i>TP53</i>		
Haploidia		<i>CDKN2A/B</i>	<i>KRAS, NRAS, NF1</i>	
Baixa hiperdiploidia	<i>IKZF2</i>	<i>TP53, RB1</i>		

\*Nesta tabela estão listados os genes mais comumente alterados em cada um dos subgrupos citados. Modificado de (MOORMAN, 2016).

Cerca de 75% dos pacientes pediátricos com LLA-B apresentam algum tipo de alteração genética ou cromossômica, que podem ser diagnosticadas através das técnicas: hibridização por fluorescência *in situ* (do inglês, FISH), transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase e amplificação multiplex de sondas dependente de ligação (do inglês, MLPA). Dentre as alterações primárias mais recorrentes na LLA-B pediátrica, podemos citar as translocações t(9;22)(q34;q11)/*BCR-ABL1*, t(12;21)(p13;q22)/*ETV6-RUNX1*, t(4;11)(q21;q23)/*KMT2A-AFF1*, t(1;19)(q23;p13)/*TCF3-PBX1*, alta hiperdiploidia e hipodiploidia. As alterações secundárias mais recorrentes costumam acontecer nos genes

*IKZF1*, *CRLF2*, *PAX5* e *FLT3* (Figura 1.1) (WOO; ALBERTI; TIRADO, 2014; MOORMAN, 2016).

As alterações primárias na LLA-B são consideradas biomarcadores de risco prognóstico mais confiáveis do que as alterações secundárias (MOORMAN, 2016). Isso pode ser justificado pelo fato das primárias estarem sempre presentes, definindo as principais características dos clones leucêmicos. Sendo assim, as alterações primárias são categorizadas de acordo com seu risco prognóstico como: risco padrão/favorável, risco intermediário e alto risco (Figura 1.1) (WOO; ALBERTI; TIRADO, 2014; MOORMAN, 2016).

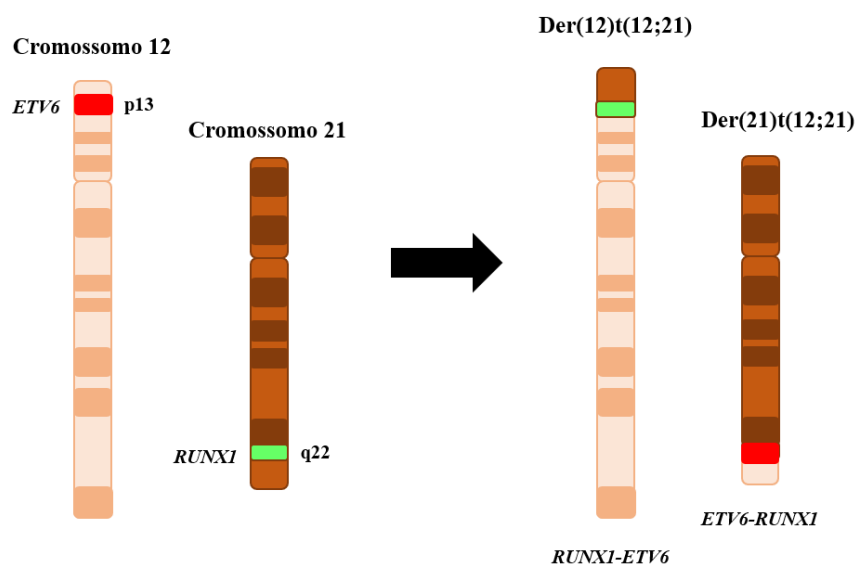


**Figura 1.1 - Frequência das alterações cromossômicas mais comuns na LLA-B pediátrica.** Frequência das alterações cromossômicas e sua associação com as classificações de risco, definidas como: alto risco (iAMP21, hipodiploidia, haploidia, *TCF3-HLF*, *BCR-ABL1* e rearranjos de *KMT2A*), risco intermediário (LLA-B SOE, rearranjos de *IGH*, *TCF3-PBX1*) e risco padrão/favorável (alta hiperdiploidia e *ETV6-RUNX1*). Modificado de (MOORMAN, 2016).

Dentre as alterações primárias citadas anteriormente, a fusão gênica *ETV6-RUNX1* e os rearranjos de *KMT2A* (*KMT2A-r*), apresentam características de risco e prognóstico opostas e, por isso, serão enfatizados a seguir.

### 1.2.1) Translocação cromossômica t(12;21)(p13;q22) – *ETV6-RUNXI*

A translocação cromossômica t(12;21)(p13;q22) resulta na fusão quimérica *ETV6-RUNXI* (antigamente denominada *TEL-AML1*), a qual está associada ao bom prognóstico, sendo a fusão gênica mais comum em pacientes pediátricos com LLA-B e raramente encontrada em pacientes adultos (Figura 1.2) (PUI; RELLING; DOWNING, 2004).



**Figura 1.2- Representação esquemática das translocações envolvendo os cromossomos 12 e 21.** O cromossomo 12 está representado em laranja claro e cromossomo 21 em laranja escuro. O cromossomo com o der(12)t12;21) compreende a fusão recíproca *RUNXI-ETV6* e o cromossomo com o der(21)t(12;21) compreende a fusão direta *ETV6-RUNXI*. Modificado de (AL-SHEHHI *et al.*, 2013).

Esta fusão gênica está presente em aproximadamente 25% dos casos de LLA-B pediátrica no momento do diagnóstico e em 15-20% dos casos de recaída (MULLIGHAN, 2012b) (MULLIGHAN, 2012b). Os casos de recaída em pacientes positivos para *ETV6-RUNXI* costumam ocorrer após longos períodos de latência após o término da terapia inicial (SEEGER *et al.*, 2001; IRVING *et al.*, 2016). Na literatura, já existiu um conflito sobre a significância da fusão *ETV6-RUNXI* como um marcador prognóstico independente. Conforme revisado por Rubnitz e colaboradores, alguns autores defendiam que a presença desta fusão poderia ser incorporada a classificação de risco, uma vez que indicava um excelente prognóstico, no qual os pacientes respondiam bem a terapia (RUBNITZ *et al.*, 2008). Em contrapartida, outros autores defendiam que essa fusão não poderia ser considerada um marcador independente associado ao um bom prognóstico, visto que nem sempre estava relacionada a um bom desfecho no tratamento, bem como por haver uma alta prevalência desta fusão entre os pacientes que recaem (RUBNITZ *et al.*, 2008). Apesar dessa divergência



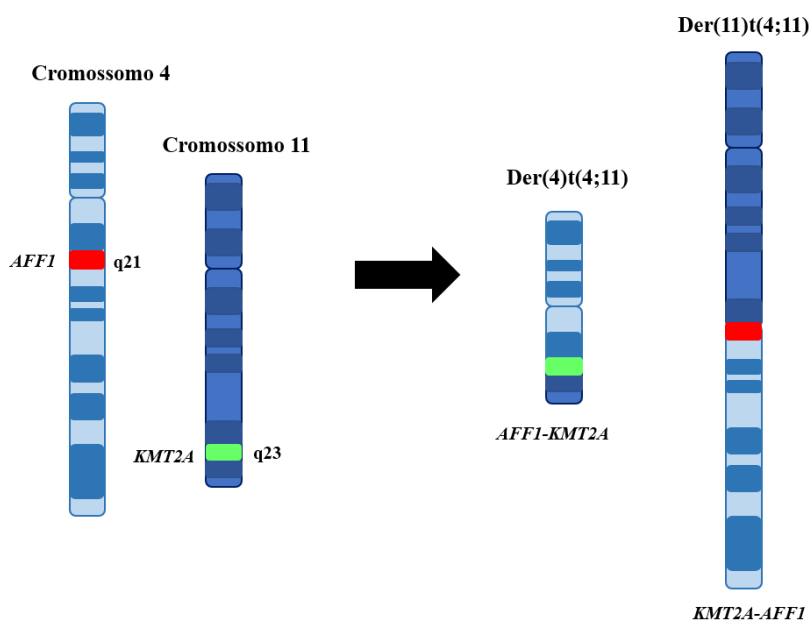
na literatura, a maioria dos estudos têm consistentemente demonstrado que os pacientes com *ETV6-RUNX1* apresentam uma alta SG, com baixas taxas de recaída quando comparados com os demais subgrupos, sendo assim considerado um marcador associado ao bom prognóstico na LLA (RUBNITZ *et al.*, 2008; MOORMAN *et al.*, 2010; BHOJWANI *et al.*, 2013).

Os fatores de transcrição *ETV6* e *RUNX1* são necessários para a regulação da hematopoiese normal, mas a fusão *ETV6-RUNX1* é capaz de alterar a expressão normal dos genes regulados por *RUNX1*, fazendo com que esse fator se torne um repressor transcricional (WOO; ALBERTI; TIRADO, 2014). Essa fusão também promove a superexpressão do receptor de eritropoetina e ativação das vias de sinalização envolvendo as proteínas JAK/STAT (TORRANO *et al.*, 2011). Além disso, a presença de *ETV6-RUNX1* altera os processos de diferenciação e estimula a auto-renovação das células progenitoras hematopoiéticas, principalmente as da linhagem B (MORROW *et al.*, 2004).

Uma série de estudos realizados por Greaves demonstraram que a fusão *ETV6-RUNX1* ocorre ainda no período do desenvolvimento fetal no útero, mas sozinha não é suficiente para causar leucemia. Dessa maneira, outras alterações seriam necessárias para causar a doença (GREAVES, 2006). A perda do segundo alelo do *ETV6* não rearranjado localizado no cromossomo 12 normal ocorre em aproximadamente 2/3 dos casos, enquanto o ganho do cromossomo 21 normal ou derivativo ocorre em 25% e 20% dos casos, respectivamente (ATTARBASCHI *et al.*, 2004; STAMS *et al.*, 2006). Outros estudos também têm demonstrado uma associação entre *ETV6-RUNX1* e alterações genéticas secundárias, como deleção dos genes *PAX5* e *TBLIXR1* (KUIPER *et al.*, 2007; MULLIGHAN *et al.*, 2007; PARKER *et al.*, 2008).

### **1.2.2) Translocação cromossômica t(4;11)(q21;q23) – *KMT2A-AFF1***

O gene *MLL* (“*mixed-lineage leukemia*”), atualmente conhecido como *KMT2A*, está localizado no cromossomo 11q23 e codifica uma proteína com atividade de histona metiltransferase, sabidamente envolvida na regulação da hematopoiese (GHAZAVI *et al.*, 2015). Esse gene apresenta mais de 100 parceiros de fusão já descritos até o momento, estando associado com as leucemias agudas (MEYER *et al.*, 2006, 2009). Dentre os rearranjos de *KMT2A*, o mais frequente nos pacientes pediátricos com LLA-B, consiste na fusão do gene *KMT2A* com o gene *AFF1* gerada a partir da translocação t(4;11)(q21;q23) (Figura 1.3) (PUI *et al.*, 2002; PIETERS *et al.*, 2007; ANDERSSON *et al.*, 2015)



**Figura 1.3- Representação esquemática das translocações envolvendo os cromossomos 4 e 11.** O cromossomo 11 está representado em azul claro e cromossomo 21 em azul escuro. O cromossomo com o der(4)t(4;11) compreende a fusão recíproca *AFF1-KMT2A* e o cromossomo com o der(11)t(4;11) compreende a fusão direta *KMT2A-AFF1*. Modificado de (RAGUSA *et al.*, 2019).

Os rearranjos de *KMT2A* (*KMT2A-r*) são mais prevalentes em pacientes lactentes (< 1 ano de idade), acometendo cerca de 80% deste grupo etário com LLA, sendo que dentro desta porcentagem, 50% dos pacientes apresentam a fusão *KMT2A-AFF1*. Pacientes pediátricos com LLA-B e *KMT2A-r* são classificados como grupo de alto risco da doença, sendo esses rearranjos considerados marcadores independentes associados ao prognóstico ruim da doença (PUI *et al.*, 2002; PIETERS *et al.*, 2007; ANDERSSON *et al.*, 2015).

Muitos estudos têm demonstrado que a expressão dos rearranjos de *KMT2A* é capaz de induzir o fenótipo leucêmico sem a presença de alterações genéticas secundárias. Mesmo assim, mutações nos genes *KRAS*, *NRAS*, *FLT3* e nas vias envolvendo as proteínas PI3K/RAS podem ser observadas em pacientes pediátricos com *KMT2A-AFF1* (ARMSTRONG *et al.*, 2003; ANDERSSON *et al.*, 2015). Esses rearranjos estão envolvidos no controle da transcrição dos genes da família HOXA (*HOXA5*, *HOXA7* e *HOXA9*) e seu cofator *MEIS1*, os quais são normalmente expressos por progenitores hematopoiéticos imaturos, como as células-tronco (ZEISIG *et al.*, 2004; KRIVTSOV *et al.*, 2006). A expressão do gene *HOX9* facilita a expansão das células progenitoras imaturas e contribui para a imortalização das mesmas (SCHNABEL; JACOBS; CLEARY, 2000; ZEISIG *et al.*, 2004). A co-expressão dos genes da família HOXA e seu cofator *MEIS1* cooperam para que os rearranjos de *KMT2A* sejam capazes de induzir o fenótipo leucêmico. Essas alterações estimulam a expansão, sobrevivência e auto-renovação dos progenitores linfóides imaturos, também impedindo a

diferenciação dos mesmos. Sendo assim, o *KMT2A-r* é considerado uma alteração molecular de alta penetrância durante a leucemogênese (ARMSTRONG *et al.*, 2001; FABER *et al.*, 2008).

Os pacientes pediátricos com *KMT2A-AFF1* apresentam uma sobrevida livre de eventos (SLE) de 4 anos e uma SG de 50% (CEPPI *et al.*, 2015). Esses dados são um reflexo da resistência ao tratamento quimioterápico demonstrada por esse grupo de pacientes, os quais ainda apresentam elevadas taxas de recaída e acometimento do SNC (PUI, 2000). Desta maneira, todos os pacientes que apresentam a fusão *KMT2A-AFF1* são submetidos a um tratamento quimioterápico intensivo e causador de graves sequelas como infertilidade, deficiência neurocognitiva, associado a elevados riscos de neoplasias secundárias e morbidade (CHOW *et al.*, 2014; WARRIS *et al.*, 2016). Isso acontece porque até o momento não existem biomarcadores que consigam estratificar esse grupo de pacientes de maneira a predizer quais apresentam maiores ou menores riscos de acometimento do SNC. Além disto, essas abordagens terapêuticas não têm melhorado o desfecho clínico desse grupo de pacientes ao longo dos últimos anos, indicando a necessidade da busca por biomarcadores capazes de predizer o risco de acometimento do SNC como também de novos alvos terapêuticos associados aos rearranjos de *KMT2A-AFF1*, de forma a reduzir a resistência ao tratamento e a recaída da doença (LE VISEUR *et al.*, 2008; REHE *et al.*, 2013; CEPPI *et al.*, 2015).

### **1.3) Recaída e acometimento do SNC na LLA-B**

#### **1.3.1) Definição e epidemiologia**

De modo geral, os pacientes com LLA apresentam uma porcentagem de cura da doença de 80%. Embora isso seja um grande sucesso da medicina oncológica, cerca de 20% dos pacientes pediátricos ainda recaem e esse número não têm diminuído a medida que novas abordagens terapêuticas têm sido desenvolvidas (NGUYEN *et al.*, 2010; PIERRO *et al.*, 2018). O número de pacientes pediátricos com LLA-B que recaem a cada ano é equivalente ao número de novos pacientes pediátricos diagnosticados com leucemia mieloide aguda (LMA). E mesmo com a combinação entre a intensa quimioterapia e o transplante de células-tronco hematopoiéticas, apenas 30-50% dos pacientes pediátricos que recaem são curados (LOCATELLI *et al.*, 2012). Se a recaída ocorrer após o primeiro tratamento ser completado, a maioria dos pacientes pediátricos entrarão em uma segunda remissão e a chance de cura passa a ser de 50%. Já se a recaída ocorrer durante a terapia, a chance de os pacientes alcançarem

uma segunda remissão é de 50-70% e apenas 20-30% dos pacientes serão curados (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

A recaída na LLA pode ser definida como o reaparecimento das células leucêmicas em qualquer região do corpo do paciente. Essa pode ser isolada, onde as células leucêmicas reaparecem em uma única região do corpo (medular ou extramedular) ou uma recaída combinada em que as células leucêmicas reaparecem em mais de uma região do corpo (medular e extramedular) (ROGANOVIC, 2013). As recaídas combinadas e as isoladas em sítios extramedulares apresentam melhores respostas à terapia do que as recaídas isoladas na MO (GAYNON, 2005; CONTER *et al.*, 2010). A maioria das recaídas ocorrem na MO, seja de maneira isolada como também combinada com sítios extramedulares, sendo o SNC o principal sítio acometido. As recaídas isoladas no SNC, nos testículos e em outros sítios extramedulares também podem ocorrer, porém em menor frequência (LOCATELLI *et al.*, 2012).

### **1.3.2) Recaídas na MO**

As recaídas na MO são as mais comuns na LLA-B pediátrica, correspondendo a 75-90% dos casos de recaída. Geralmente estão relacionadas a um prognóstico ruim, sendo as recaídas tardias associadas com um risco prognóstico mais favorável do que as recaídas precoces (SAARINEN-PIHKALA *et al.*, 2006; GAUDICHON *et al.*, 2019). As duas abordagens utilizadas no tratamento da recaída medular são a quimioterapia e o transplante de células-tronco hematopoéticas. Os pacientes que recebem apenas a quimioterapia também precisam receber um tratamento direto no SNC, com o intuito de prevenir uma subsequente recaída neste sítio extramedular (PUI, 2012). Por causa desse intenso tratamento quimioterápico, cerca de 66-82% dos pacientes com recaída precoce alcançam uma segunda remissão da doença. Para aqueles que apresentaram recaída tardia, esse número aumenta para 90-95%. Entretanto, a utilização desses intensos regimes quimioterápicos não tem resultado em melhores taxas de recuperação dos pacientes, que muitas vezes atingem seu limite de tolerância ao esquema terapêutico, demonstrando a importância do transplante no tratamento desses pacientes (CHESSELLS *et al.*, 2003; MARTIN; MORGAN; HIJIYA, 2012).

### **1.3.3) Recaídas no SNC**

Na LLA-B, um dos maiores desafios da prática clínica é realizar um diagnóstico e tratamento adequados para os pacientes pediátricos que apresentam o acometimento do SNC,

o qual é detectado em 3-8% dos pacientes no momento do diagnóstico e em 30-40% daqueles que recaem (PUI & HOWARD, 2008; FRISHMAN-LEVY; IZRAELI, 2017).

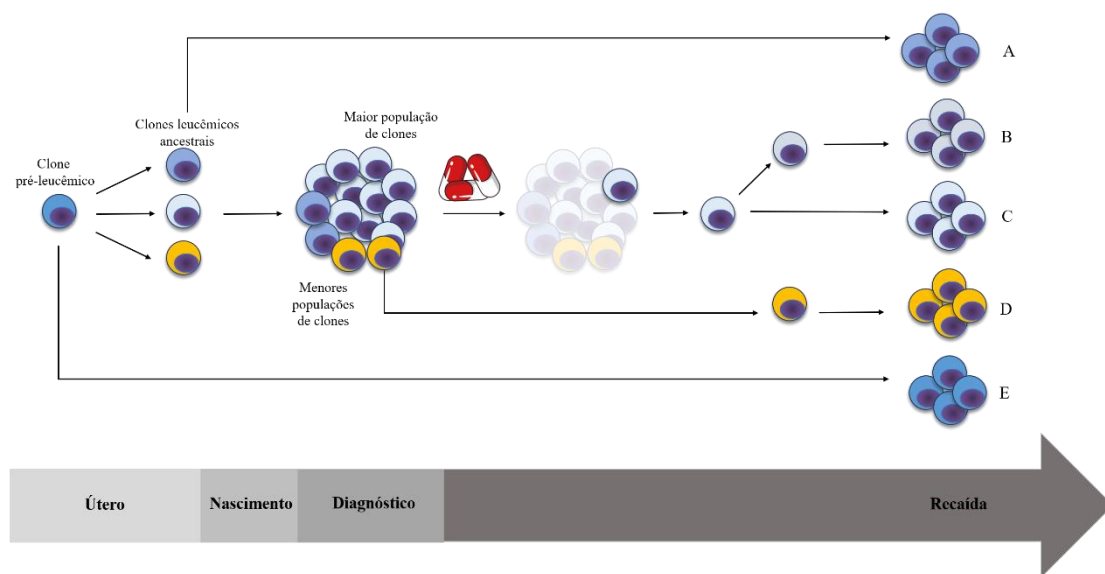
O padrão ouro para avaliar o acometimento do SNC é a detecção de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano (LCR), após punção lombar. Porém, o fato de que a maioria das recaídas no SNC ocorre em pacientes que inicialmente são diagnosticados sem a presença de células leucêmicas no LCR, nos evidencia a urgente necessidade de serem encontradas abordagens diagnósticas mais precisas (BÜRGER *et al.*, 2003). Portanto, independentemente do *status* do SNC no momento do diagnóstico, todos os pacientes são tratados com uma terapia profilática intratecal com a administração de metotrexato e em um número limitado de pacientes é realizada a irradiação craniana (HUNGER; MULLIGHAN 2015; CHEUNG *et al.*, 2018). Ambas as abordagens terapêuticas estão associadas a graves sequelas, como o aumento do risco de formação de neoplasias secundárias, infertilidade, déficit neuro cognitivo, entre outras (KRULL *et al.*, 2013; CHEUNG *et al.*, 2018). Existem alguns fatores de risco associados ao acometimento do SNC na LLA-B, como a hiperleucocitose periférica no diagnóstico e a presença de determinados rearranjos cromossômicos, principalmente o *BCR-ABL1* e o *KMT2A-AFF1* (ALSADEQ; SCHEWE, 2017; FRISHMAN-LEVY; IZRAELI, 2017; SANCHEZ *et al.*, 2017; WINTERS; BERNT, 2017).

#### **1.3.4) A biologia da recaída na LLA-B**

A heterogeneidade clonal é uma das principais características da LLA. A evolução dos clones é um processo dinâmico no qual fatores intrínsecos e extrínsecos, como as condições microambientais e o tratamento quimioterápico, podem favorecê-los de forma a ocorrer posteriormente uma recaída (LOCATELLI *et al.*, 2012; GAUDICHON *et al.*, 2019). Na clínica, isso é corroborado pelas baixas taxas de remissão da doença e a persistência da doença residual mínima no momento da recaída, mesmo após o tratamento quimioterápico intensivo (BOROWITZ *et al.*, 2008; RAETZ *et al.*, 2008; ECKERT *et al.*, 2013)

Muitos estudos têm comparado os clones malignos presentes no momento do diagnóstico com aqueles presentes na recaída, de forma a entender os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela evolução desses clones ao longo do tempo (MULLIGHAN *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2008; HOGAN *et al.*, 2011). Esses estudos têm demonstrado que uma primeira alteração cromossômica (como os rearranjos gênicos) nos progenitores hematopoiéticos, ocasionaria no surgimento de um clone pré-leucêmico. Esse clone subsequentemente acumularia outras alterações genéticas, e assim daria origem aos “clones

leucêmicos ancestrais”. Outras alterações genéticas possibilitariam o surgimento de clones que dariam origem à LLA, que seria composta por distintas populações de clones malignos. Essas populações clonais poderiam se diferir em número de clones, como também em características genéticas e moleculares. Após o diagnóstico, o tratamento quimioterápico erradicaria todos ou quase todos os clones malignos que iriam compor a LLA. Entretanto, algumas células poderiam sobreviver ao tratamento dando origem à recaída a partir da maior população de clones encontradas no diagnóstico (Figura 1.4C). Alternativamente, células derivadas da maior ou menor população de clones poderiam adquirir outras alterações genéticas e dariam origem a outro tipo de recaída (Figura 1.4B e D). A recaída também poderia ter origem dos “clones leucêmicos ancestrais” ou até mesmo do clone pré-leucêmico (Figura 1.4A e E) (GAUDICHON *et al.*, 2019). Além disto, já foi demonstrado por Borowitz e colaboradores que muitas alterações genéticas, como alterações no número de cópias gênicas presentes nos clones malignos da recaída, envolvem genes associados a quimioresistência, como *CDKN2A* e *IKZF1* (BOROWITZ *et al.*, 2008).



**Figura 1.4 – Evolução clonal das células leucêmicas até a recaída a partir de um clone pré-leucêmico. (A)** Recaída a partir de um clone leucêmico ancestral; **(B)** recaída a partir de um clone da população clonal maior o qual adquiriu novas alterações genéticas; **(C)** recaída a partir de um clone da população clonal maior; **(D)** recaída a partir de um clone da população clonal menor e **(E)** recaída a partir do clone pré-leucêmico. Modificado de (GAUDICHON *et al.*, 2019).

A recaída também poderia ser explicada pela presença de algumas células leucêmicas em estado dormente dentro da população de células LLA. Essas células por estarem na fase G0 do ciclo celular, não estão se dividindo e por isso não estão sensíveis a ação dos agentes quimioterápicos. Posteriormente, ao entrarem novamente no ciclo celular, dão origem a uma

nova população de células leucêmicas responsáveis pela recaída. O microambiente em que a célula leucêmica se encontra, sua interação com as demais células daquele nicho e componentes ali presentes podem auxiliar na manutenção de seu estado dormente, sendo um local protetor e facilitador do escape ao tratamento quimioterápico (FORD *et al.*, 2015; SPINELLA *et al.*, 2018; LENK; ALSADEQ; SCHEWE, 2020). Neste contexto, os mecanismos pelos quais as células leucêmicas se tornam dormentes e posteriormente retornam ao ciclo celular, provocando a recaída da doença, assim como migram e invadem outros microambientes extramedulares, ainda precisam ser melhor elucidados.

Dessa maneira, estudos têm buscado investigar genes possivelmente envolvidos nos mecanismos de recaída e acometimento do SNC na LLA. Nesses estudos, os autores têm buscado encontrar genes diferencialmente expressos entre amostras de aspirados da MO ou LCR de grupos de pacientes que apresentaram ou não recaída da doença. Dentre esses genes diferencialmente expressos associados à recaída e acometimento do SNC podemos citar o *VEGF*, *NG2*, *SCD* e *SPP1* (codificador da proteína osteopontina) (VAN DER VELDEN *et al.*, 2016; MÜNCH *et al.*, 2017; PRIETO *et al.*, 2018).

#### 1.4) Osteopontina

Dentre os produtos gênicos de expressão alterada nas leucemias está a osteopontina (OPN) (BASTOS *et al.*, 2017). A nomenclatura de OPN é a combinação entre as palavras “*osteo*” e “*pontin*” para caracterizar sua função de ligação das células ósseas à matriz extracelular óssea (EL-TANANI *et al.*, 2006). É também conhecida como SPP1 (“*secreted phosphoprotein 1*”) e ETA1 (“*Early T-lymphocyte activation 1 protein*”). A OPN é uma glicoproteína de matriz extracelular, pertencente à família SIBLING (“*Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein*”), expressa por diferentes tecidos e envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos como, calcificação óssea, inflamação, resposta imunológica e câncer (BELLAHCÈNE *et al.*, 2008). A OPN pode ser sintetizada e secretada por diversos tipos de células, incluindo os osteoblastos, osteoclastos, células epiteliais, células endoteliais, células neuronais, células tumorais e células imunes (como as células T e B, macrófagos e *Natural Killer*) (WAI; KUO, 2004, 2008; RANGASWAMI; BULBULE; KUNDU, 2006; KUNII *et al.*, 2009). É expressa constitutivamente em órgãos como os rins, bexiga, ossos e em fluidos biológicos como sangue, urina, saliva, leite, fluidos seminais e bile (WAI; KUO, 2004; RANGASWAMI; BULBULE; KUNDU, 2006). Embora a maioria dos estudos refiram-se a OPN secretada (OPNs), já foi demonstrado que a OPN também pode ser

encontrada no núcleo e no citoplasma das células e não ser secretada, sendo assim denominada de OPN intracelular (OPNi) (JUNAID *et al.*, 2007). A forma intracelular da OPN já se mostrou expressa em células dendríticas, macrófagos e células nervosas, onde sua função está principalmente associada à regulação do citoesqueleto e na transdução de sinais intracelulares (ZHU *et al.*, 2004; SHINOHARA *et al.*, 2006, 2008; WUNG *et al.*, 2007; INOUE; SHINOHARA, 2011).

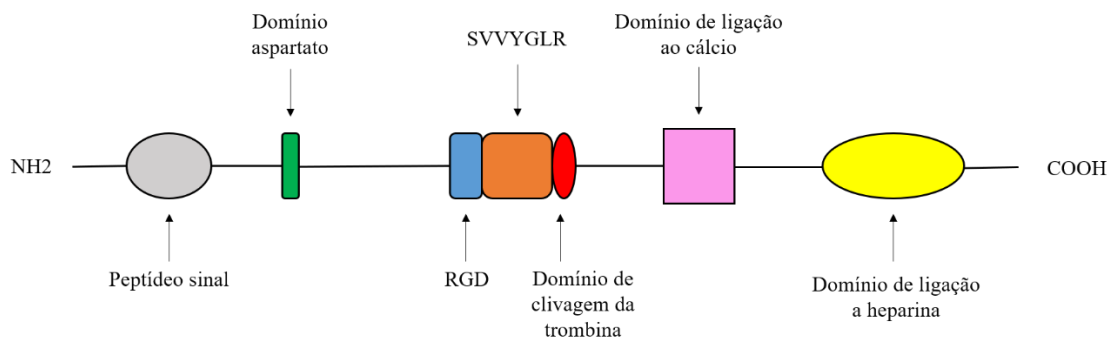
#### 1.4.1) OPN e estrutura

A proteína OPN, de aproximadamente 35kDa, é codificada pelo gene *SPP1* presente no braço longo do cromossomo 4, *locus* 22 em humanos e é pertencente à família SIBLING (CASTELLO *et al.*, 2017). A família SIBLING inclui a OPN, a sialoproteína óssea (BSP), proteína da matriz da dentina I (DMP1) e sialofosfoproteína da dentina (DSPP), as quais apresentam algumas similaridades estruturais (FEDARKO *et al.*, 2001; FISHER *et al.*, 2001). As cinco proteínas apresentam o domínio RGD composto pelos aminoácidos arginina, glicina e asparagina e vários sítios semelhantes de modificações pós-traducionais (FEDARKO *et al.*, 2001).

O gene *SPP1* em humanos é composto por 7 éxons e 6 íntrons, tendo uma extensão de aproximadamente 9 kb, com uma região aberta de leitura que consiste em 942 nucleotídeos que inicia-se no códon de iniciação de tradução localizado no éxon 2 e termina códon de parada de tradução localizado no éxon 7. A região 5' não traduzida inclui o éxon 1, o qual começa com um sítio de iniciação a transcrição AGC, enquanto a região 3' não traduzida consiste na última parte do éxon 7, o qual inclui três possíveis sinais de poliadenilação (AATAA). O éxon 2 codifica um peptídeo sinal e os dois primeiros aminoácidos da proteína madura. Os éxons 3 e 5 apresentam as sequências de fosforilação serina-serina-glutamina-glutamina. Já o éxon 4 apresenta dois resíduos de transglutaminase e por fim o éxon 6 uma sequência rica em ácido aspártico. O éxon 7 é o maior dentre os 7, e contém metade da região codificante da proteína, incluindo o domínio RGD e o domínio central de clivagem da trombina (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Na Figura 1.5 observa-se os domínios conservados presentes na proteína OPN: domínio RGD (arginina-glicina-asparagina), sequência de reconhecimento (GRGDS), sequência SVVYGLR, domínio de clivagem da trombina (RSK), região N-terminal rica em ácido aspártico, sítio de ligação ao cálcio e região C-terminal com o domínio de ligação a heparina (WEI *et al.*, 2017).





**Figura 1.5 – Representação dos domínios estruturais da OPN.** Modificado de (WEI *et al.*, 2017).

A OPN é capaz de interagir com muitas integrinas e receptores celulares, desencadeando a ativação de uma série de vias de sinalização fundamentais para os processos fisiológicos e patológicos em que ela está envolvida. A OPN é capaz de interagir com as integrinas  $\alpha v$ , principalmente as  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ , através do seu domínio RGD, como também interage com as  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 7$  através da sequência SVVYGLR. Além disso, também interage com as variantes de *splicing* do receptor CD44 (CD44v3, CD44v6 e CD44v7) através do seu domínio C-terminal (HAO *et al.*, 2017).

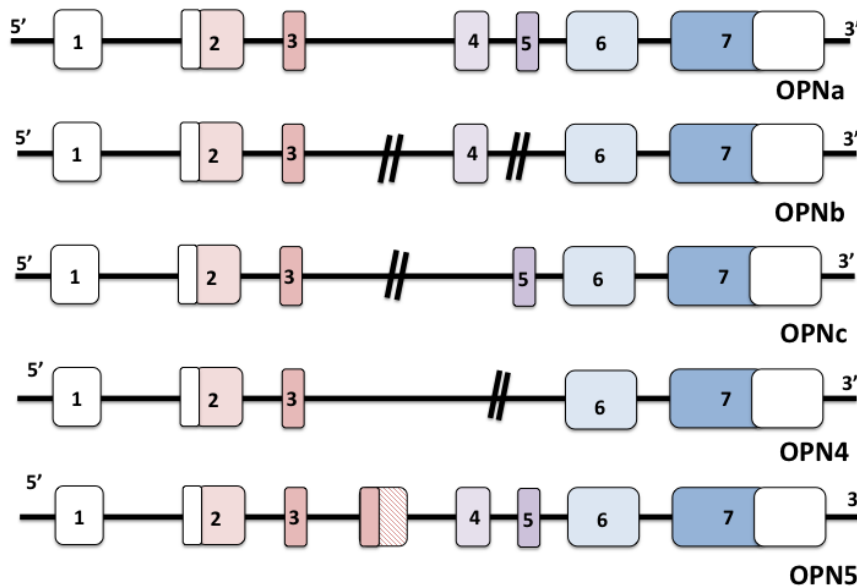
#### 1.4.2) OPN e polimorfismos

Para o gene *SPP1* já foi descrito cerca de 310 variações de sua sequência. Desse total, 10 variações correspondem a pequenas deleções ou polimorfismos de inserção, enquanto as outras 300 correspondem a polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Além disto, cerca de 239 variações de sequência estão localizadas em regiões transcritas do gene (BRIONES-ORTA *et al.*, 2017).

Sítios de polimorfismo na região promotora do gene pode impactar na ligação de fatores de transcrição e conseqüentemente na expressão do gene. Dos 16 SNPs localizados na região promotora do gene *SPP1*, 15 estão relacionados ao câncer, influenciando nos níveis de expressão da OPN como também na sua associação com o risco prognóstico da doença (BRIONES-ORTA *et al.*, 2017).

### 1.4.3) OPN e suas isoformas de *splicing*

A OPN é codificada por um único gene, porém existe em várias isoformas, as quais se diferem principalmente em relação as suas modificações pós-tradução e devido ao processo de tradução e *splicing* alternativos. Dentre as modificações pós-tradução, podemos citar a fosforilação da serina e treonina, glicosilação, sulfatação da tirosina e proteólise, que permitem a geração de distintas isoformas monoméricas que variam entre 41 e 75kDa (CHRISTENSEN; PETERSEN; SØRENSEN, 2008). Essas modificações são tecido e célula-específicas e dependem de outros fatores fisiopatológicos que impactam na estrutura e função da OPN (CHRISTENSEN *et al.*, 2007; KAZANECKI; UZWIAK; DENHARDT, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; ANBORGH *et al.*, 2009). O *splicing* alternativo é um dos processos que mais contribui para a diversidade molecular da célula, onde diversos RNAs mensageiros (RNAm) maduros podem ser produzidos a partir de um único pré-RNAm. Esse processo não acontece apenas em condições fisiológicas normais, mas tem sido cada vez mais associado a determinadas doenças, como o câncer (SINGH; EYRAS, 2017). O transcrito primário da OPN sofre *splicing* alternativo, gerando três principais isoformas denominadas OPNa, OPNb e OPNc. A OPNa é conhecida como a isoforma completa por conter os 7 éxons, a OPNb apresenta o éxon 5 deletado e a OPNc apresenta o éxon 4 deletado. Recentemente, duas novas isoformas da *splicing* da OPN foram descritas, denominadas de OPN4 e OPN5. A OPN4 apresenta a deleção dos éxons 4 e 5 enquanto a OPN5 contém um éxon extra gerado a partir da retenção de uma porção do íntron 3 da isoforma canônica. Além disso, a OPN5 apresenta um códon de iniciação de tradução adicional, sendo assim considerada a maior isoforma de *splicing* da OPN. Entretanto, diferentemente da OPNa, OPNb e OPNc, os papéis funcionais dessas novas isoformas de *splicing* ainda não foram caracterizados (BASTOS *et al.*, 2017) (Figura 1.6).



**Figura 1.6 – Estrutura das isoformas de *splicing* da OPN.** A OPNa apresenta todos os 7 éxons enquanto a OPNb e OPNc apresentam a deleção dos éxons 5 e 4, respectivamente. A OPN4 apresenta a deleção dos éxons 4 e 5 e a OPN5 contém um éxon extra localizado entre os éxons 3 e 4, devido a retenção do íntron 3. As regiões não codificantes estão representadas pela cor branca e as regiões codificantes representadas pelos diferentes tons das cores rosa, lilás e azul. Modificado de (BASTOS *et al.*, 2017).

A soma de todas as isoformas da OPN, sejam as geradas a partir das modificações pós-transcricionais ou pós traducionais, constitui a OPN total (OPNt) ou apenas OPN como é descrita na maioria dos artigos.

#### 1.4.4) OPN e suas isoformas de *splicing* na biologia tumoral

Muito estudos, experimentais e/ou clínicos, têm demonstrado o papel da OPN e de suas isoformas de *splicing* na progressão tumoral, em que estão associadas à diversas características de células tumorais, como: proliferação, sobrevivência, angiogênese, quimioresistência, aumento das características de células tronco, migração, invasão e metástase (WEI *et al.*, 2017).

Uma série de mecanismos complexos estão envolvidos no papel da OPN e suas isoformas no câncer, os quais incluem a interação das mesmas com receptores de superfície celular, fatores de crescimento e proteases. A interação da OPN e suas isoformas com diferentes receptores de superfície pode ativar uma série de vias de transdução de sinal. Isso resulta na modificação da expressão de diversos genes e proteínas, contribuindo diretamente para uma modificação do comportamento celular. Os efeitos da OPN e suas isoformas sobre o comportamento celular variam de acordo com o tipo de célula, pois depende do tipo de

integrinas e outros receptores que essas células expressam para definir quais vias poderão ser ativadas (RODRIGUES *et al.*, 2007).

No processo de proliferação e adesão celular já foi demonstrado que a OPN interage com o CD44 através da integrina  $\beta 1$ . Essa interação da OPN com o CD44 também é capaz de promover a migração celular através de vias envolvendo as proteínas pKC, PI3K e AKT. Já no processo de invasão celular, foi demonstrado que a OPN induz a expressão de MMPs e uPA, através de vias envolvendo a integrina  $\alpha\beta 3$  e proteínas como PI3K, NFKB e AP1 (BELLAHCÈNE *et al.*, 2008).

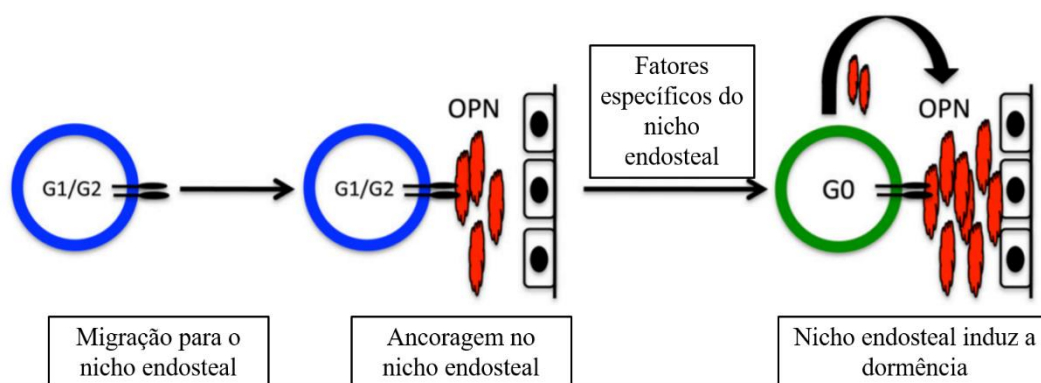
As isoformas de *splicing* da OPN apresentam um perfil de expressão e funções tecidomorfogênicas específicas, contribuindo de maneiras distintas para a progressão tumoral. As razões pelas quais isso acontece ainda não foram bem elucidadas. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa tem proposto que modificações pós-tradução podem impactar na estrutura e nas propriedades de interação das isoformas de *splicing* da OPN, assim como em seus papéis funcionais em diferentes contextos celulares, como já bem descrito por alguns autores em tumores sólidos (BLASBERG *et al.*, 2010; GOPARAJU *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2011; TILLI *et al.*, 2012b; GIMBA; TILLI, 2013). Ao analisar os locais de fosforilação nos resíduos de aminoácidos serina, tirosina e treonina na região que corresponde aos éxons 3, 4, 5 e 6 das isoformas OPNa, OPNb e OPNc, nosso grupo observou que essas isoformas de *splicing* da OPN apresentam perfis distintos de fosforilação (GIMBA & TILLI, 2013). Alguns estudos já demonstraram que a fosforilação interfere na interação da proteína com seus receptores e que a diferença no perfil de fosforilação entre isoformas de *splicing* implica nos seus diferentes papéis em um mesmo modelo tumoral. Logo, as deleções dos éxon 4 e 5 podem alterar os perfis de modificações pós-tradução das isoformas da OPN, resultando nos seus distintos papéis funcionais ( MENG *et al.*, 2004; EDBERG *et al.*, 2005; COURTER *et al.*, 2010; GIMBA; TILLI, 2013).

Até o presente momento, a maioria dos estudos elucidou o papel das isoformas da OPN em tumores sólidos, como: mama, próstata, cólon, ovário, estômago, fígado, pulmão e tireóide (TUCK *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2001; AGRAWAL *et al.*, 2002; FOROOTAN *et al.*, 2006; BAO *et al.*, 2007; IMANO *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011; TILLI *et al.*, 2012b, 2011; FERREIRA *et al.*, 2016a, 2016b, 2018). Entretanto, existem poucas informações a respeito do papel das isoformas da OPN em tumores não sólidos, como as leucemias, estando a maioria dos estudos voltados para o papel da OPN total, conforme recentemente revisado por nosso grupo (BASTOS *et al.*, 2017; ANEXO 1). Até o presente momento, nada havia sido descrito a respeito das isoformas de *splicing* da OPN nas LLAs, sendo o nosso grupo de pesquisa pioneiro nesta investigação.

#### 1.4.5) OPN e leucemia

Nas leucemias, níveis elevados de expressão da OPN têm se mostrado associados a um pior prognóstico e fenótipo mais agressivo da doença (BASTOS *et al.*, 2017). Na leucemia mieloide crônica (LMC), a expressão da OPN mostrou-se elevada no soro dos pacientes, independente do estágio clínico em que se encontravam (FLAMANT *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* demonstraram a primeira evidência de que a OPN pode ser regulada pela expressão de uma alteração genética primária, a *BCR-ABL1*, associada a um pior prognóstico em pacientes com LMC. A *BCR-ABL1* é capaz de mediar a superexpressão da OPN através da ativação de uma via de sinalização envolvendo as proteínas RAS, PI3K, aPKC, Raf-1 e MEK. Nesse mesmo modelo tumoral, a elevada expressão da OPN também colabora para o aumento das características de células tronco, para o aumento da capacidade migratória e do escape das células leucêmicas da apoptose (HICKEY; ENGLAND; COTTER, 2005; VEJDA; PIWOCKA; MCKENNA, 2005). Corroborando esses dados, na LMA, estudos clínicos também relataram a elevada expressão da OPN no soro dos pacientes e que esta estava associada a uma menor SG e menor SLE (LIERSCH *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2017). Estudos *in vitro*, demonstraram que células de LMA tratadas com partenolídeo, apresentaram elevada expressão da OPN, AKT, mTOR,  $\beta$ -catenina e PTEN. Mediante o silenciamento da OPN, ocorreu uma diminuição das proteínas AKT, mTOR,  $\beta$ -catenina e PTEN. Estas células apresentaram uma redução da sua viabilidade, capacidade proliferativa e de formação de colônias após o tratamento com o mesmo composto. Esses dados demonstraram uma possível ação da OPN no processo de quimioresistência na LMA (MOHAMMADI *et al.*, 2017).

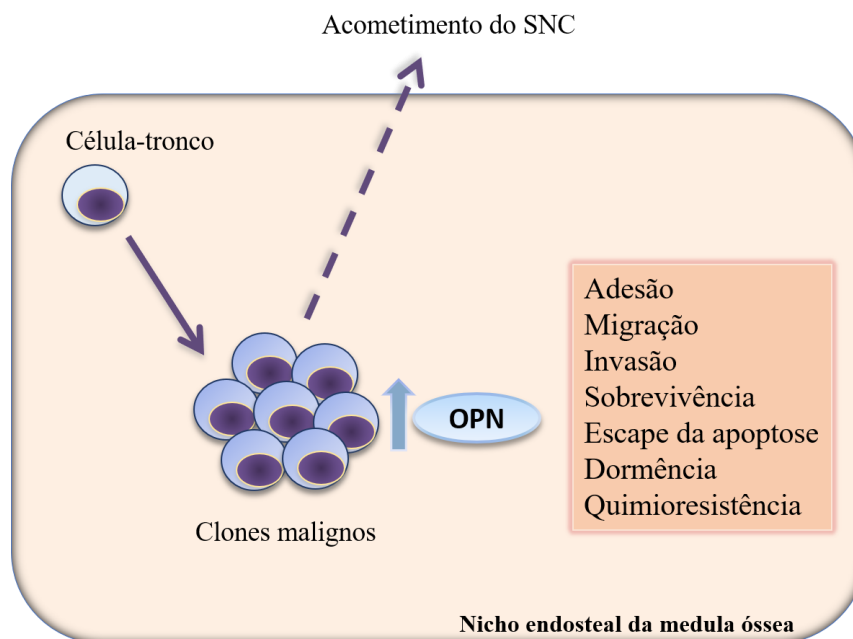
É sabido que o microambiente exerce um importante papel na manutenção do fenótipo leucêmico, seja através das células como também de moléculas ali presentes. Na LLA, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os blastos leucêmicos ativos no ciclo celular migram em direção ao nicho endosteal da MO, em resposta a expressão de citocinas desse microambiente. Uma dessas citocinas é a OPN, a qual é secretada pelos osteoblastos presentes no nicho endosteal da MO. Dentro no nicho endosteal, os blastos leucêmicos utilizam seus receptores de integrinas, como VLA-4, para se ligarem à OPN expressa pelos osteoblastos locais. Dessa maneira, a OPN serviria como âncora, aprisionando os blastos leucêmicos nesse nicho e sustentando o estado dormente dessas células. Como consequência, os blastos dormentes em G0 não estariam mais ativos no ciclo celular e assim conseguiriam escapar dos agentes quimioterápicos, colaborando para o processo de quimioresistência e um possível processo de recaída da doença (Figura 1.7) (BOYERINAS *et al.*, 2013).



**Figura 1.7- Modelo de indução das células leucêmicas à dormência no nicho endosteal da medula óssea.** As células leucêmicas ativas no ciclo celular (G1/G2) são atraídas para o nicho endosteal da MO em resposta a OPN secretada pelos osteoblastos. A OPN serve como ancora para essas células leucêmicas no nicho endosteal da MO, sustentando o estado dormente (G0) dessas células. Modificado de (BOYERINAS *et al.*, 2013).

Nas LLAs pediátricas, um estudo clínico demonstrou altos níveis de OPN circulante no LCR dos pacientes que apresentaram recaída no SNC, demonstrando uma possível relação da OPN com esse processo (INCESROY-ÖZDEMİR *et al.*, 2013). Recentemente, Van der Velden e colaboradores demonstraram a primeira evidência de que a OPN pode estar envolvida na recaída do SNC na LLA-B. Neste estudo, os autores mapearam uma série de genes nas amostras de aspirados de MO no momento do diagnóstico e do LCR dos mesmos pacientes no momento da recaída no SNC. Descreveram que as células de LLA-B envolvidas na recaída do SNC apresentavam um perfil proteico característico, em que a OPN se mostrava superexpressa, sendo assim cogitada com um possível preditor de acometimento do SNC (VAN DER VELDEN *et al.*, 2016).

Quando expressa de maneira elevada, a OPN pode estimular diversas etapas da leucemogênese, incluindo: adesão, migração, invasão, sobrevivência, escape da apoptose, dormência e quimioresistência. Dessa maneira, colaborando para um fenótipo mais agressivo da doença, estando associada a diversas características de pior prognóstico, como menor sobrevida e acometimento do SNC (Figura 1.8) (BASTOS *et al.*, 2017).



**Figura 1.8 – Os distintos papéis da OPN na leucemogênese.** No nicho endosteal da medula óssea, a OPN é superexpressa pelos clones malignos e pelas células presentes nesse microambiente, como os osteoblastos. A superexpressão da OPN pode induzir diversas etapas da progressão das leucemias, como adesão, migração, invasão, sobrevivência, escape da apoptose, dormência e quimioresistência. Em resposta a elevada expressão da OPN, os clones malignos são capazes de invadir sítios extramedulares, como o sistema nervoso central. Modificado de (BASTOS *et al.*, 2017).

## 2) JUSTIFICATIVA

A LLA-B é o tipo de câncer mais comumente diagnosticado na infância, com uma porcentagem de cura de aproximadamente 80%. Apesar do avanço das abordagens terapêuticas, cerca de 20% dos pacientes ainda recaem (MOORMAN, 2016). Neste contexto, o rearranjo *KMT2A-AFF1* corresponde à uma alteração genética primária, associada a um prognóstico desfavorável, mais frequente em pacientes pediátricos LLA-B. Esses pacientes são classificados dentro do grupo de alto risco da doença, com uma SG de aproximadamente 50% quando tratados com os protocolos terapêuticos mais avançados (ANDERSSON *et al.*, 2015). Essa baixa SG deve-se principalmente devido à resistência desses pacientes ao tratamento quimioterápico. Por apresentarem elevadas chances de recaída no SNC, todos os pacientes positivos para a fusão *KMT2A-AFF1* são submetidos a um tratamento quimioterápico intratecal, causador de graves sequelas ou até mesmo o óbito (PUI, 2000). Até o presente momento, não existem biomarcadores capazes de predizer quais pacientes desse grupo terão o acometimento do SNC pelas células leucêmicas, a fim de estratificá-los de forma a submeter à terapia apenas aqueles com elevados riscos. Dessa maneira, muitos estudos têm buscado investigar genes possivelmente envolvidos no mecanismo de recaída do SNC, em busca de biomarcadores de predição como também de possíveis alvos terapêuticos (CEPPI *et al.*, 2015).

Dentre os produtos gênicos de expressão alterada na LLA, está a OPN. A OPN é uma glicoproteína de matriz extracelular sabidamente envolvida em diversas etapas da progressão tumoral. Suas isoformas de *splicing* têm sido identificadas como importantes biomarcadores em tumores sólidos, uma vez que apresentam um perfil de expressão e funções tecido-tumor específicas. Apesar de seus papéis serem bem descritos em tumores sólidos, não haviam informações a respeito de suas funções em tumores não sólidos, como nas LLAs (BASTOS *et al.*, 2017).

Recentemente, foi demonstrado que OPN está envolvida em um fenótipo mais agressivo nas LLAs e que se mostrou superexpressa em uma população de células LLA-B envolvidas no acometimento do SNC (VAN DER VELDEN *et al.*, 2016). Dado que as isoformas de *splicing* da OPN apresentam funções tecido e tumor específicas, estudar suas possíveis funções nas LLA-B contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1*, é de extrema importância para compreender seus potenciais papéis na manutenção do fenótipo leucêmico. Uma vez envolvidas nesse processo, podem ser propostas como promissores biomarcadores ou alvos de estratégias terapêuticas para esta doença.



### 3) OBJETIVOS

#### 3.1) OBJETIVO GERAL

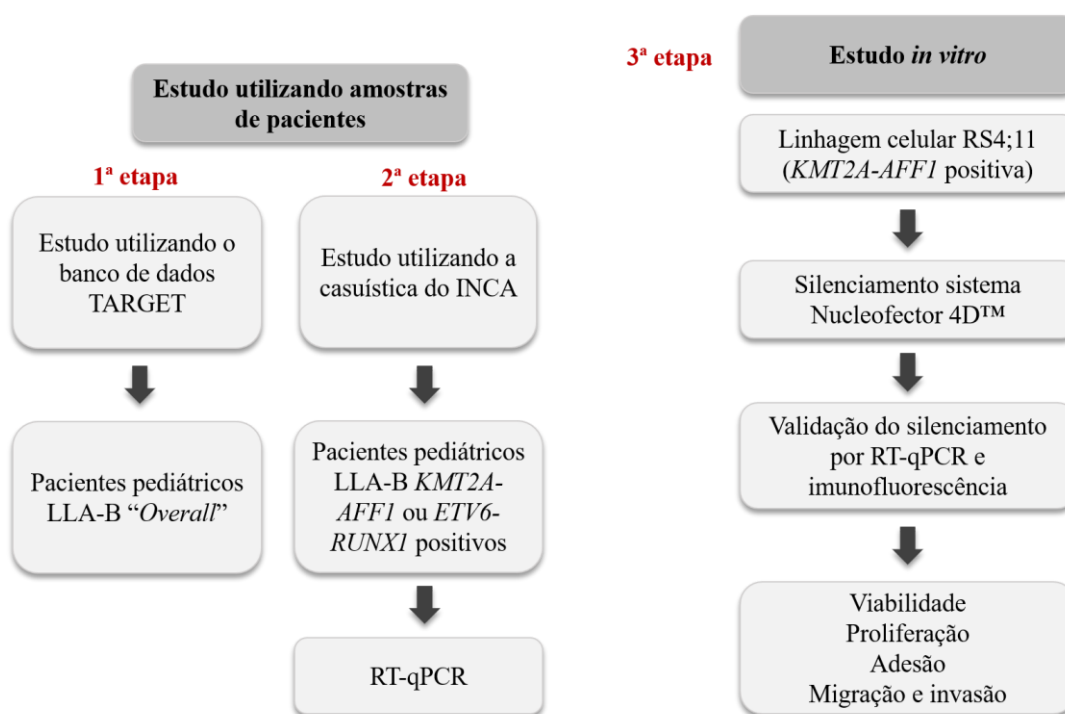
- Avaliar o perfil de expressão transcricional e os papéis funcionais das isoformas de *splicing* OPNa, OPNb e OPNc na LLA-B pediátrica contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1*

#### 3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de expressão das isoformas de *splicing* OPNa, OPNb e OPNc, utilizando dados de pacientes pediátricos com LLA-B provenientes do projeto TARGET;
- Associar a expressão transcricional das isoformas de *splicing* OPNa, OPNb e OPNc destes pacientes com o acometimento do SNC;
- Avaliar o perfil de expressão transcricional das isoformas de *splicing* OPNa, OPNb e OPNc em amostras de pacientes pediátricos com LLA-B de casuística do INCA contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1* ou *ETV6-RUNX1* (grupo comparativo);
- Com base no perfil de expressão transcricional diferencial observado para as isoformas de *splicing*, associar seus perfis de expressão transcricional com características de risco prognóstico
- Realizar estudos funcionais de aspectos ligados a progressão da LLA-B, como viabilidade, proliferação, adesão, migração e invasão, por meio do silenciamento da(s) isoforma(s) de interesse

#### 4) METODOLOGIA

De modo geral, para atingir os objetivos propostos, dividimos o presente estudo em três etapas experimentais. A primeira etapa consistiu no estudo da frequência e do perfil expressão transcricional das isoformas de *splicing* OPNa, OPNb e OPNc em amostras de pacientes pediátricos LLA-B disponíveis no banco de dados TARGET, independente do rearranjo gênico que apresentavam. A segunda etapa, foi o estudo da frequência e do perfil de expressão transcricional das mesmas isoformas da OPN utilizando a casuística do INCA. Essa análise foi feita pela técnica de PCR quantitativo em tempo real em amostras pacientes pediátricos LLA-B contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1*, utilizando como grupo comparativo pacientes que apresentavam a fusão gênica *ETV6-RUNX1*. A partir dos resultados obtidos, a terceira etapa foi o estudo *in vitro*, utilizando como modelo a linhagem celular RS4;11, a qual é positiva para a fusão gênica *KMT2A-AFF1* de interesse do estudo. Realizamos o silenciamento da isoforma de interesse através do sistema de eletroporação Nucleofector 4D. Em seguida, avaliamos a eficiência do silenciamento da isoforma em níveis transcricionais e proteicos através de ensaios de PCR quantitativo em tempo real e imunofluorescência, respectivamente. Após a validação do silenciamento, realizamos ensaios funcionais de viabilidade, proliferação, adesão, migração e invasão (Figura 4.1).



**Figura 4.1 – Fluxograma do desenho experimental realizado no estudo**

#### 4.1) Análise de bioinformática

Os níveis de expressão transcricional das isoformas de *splicing* OPNa, OPNb e OPNc foram inicialmente avaliados em uma coorte independente de pacientes, através de dados disponibilizados *online* pela iniciativa *Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments* (TARGET) (<https://ocg.cancer.gov/programs/target/data-matrix>). Esta etapa foi realizada em colaboração com a Dra. Mariana Boroni e a Ma. Caroline Poubel, no Laboratório de Bioinformática e Ciência Computacional do INCA.

O projeto TARGET *Acute Lymphoblastic Leukemia*, tem como objetivo elucidar a caracterização molecular, para determinar as mudanças genéticas responsáveis pela iniciação e progressão das LLAs pediátricas difíceis de serem tratadas. Este projeto foi gerado em duas fases distintas: a) fase piloto (*ALL Phase I*); e b) fase de expansão, subdividida em descoberta e validação (*ALL Phase II*). Apenas a fase de descoberta foi utilizada para a etapa de validação do presente projeto, devido a disponibilidade dos dados.

Através da planilha de dados em formato *.xlsx*, contendo as características clínicas dos pacientes, foi possível selecionar apenas os casos diagnosticados com LLA-B e excluir aqueles com síndrome de *Down*. Todas as amostras utilizadas foram obtidas a partir de MO e/ou sangue periférico, colhidas ao diagnóstico. Os detalhes sobre a manipulação dos materiais e dos dados gerados estão depositados no endereço eletrônico do projeto, com o título TARGET *Project Experimental Methods* (<https://ocg.cancer.gov/programs/target/target-methods>). O passo seguinte foi obter a expressão transcricional das isoformas de *splicing* citadas nas amostras destes pacientes. Para isso, foram utilizados dados públicos processados oriundos da metodologia de *RNA sequencing* e que incluíam a quantificação de isoformas. Esses dados encontram-se disponibilizados em arquivo de formato *.txt* para cada paciente. Desta forma, os níveis de expressão transcricional das isoformas de *splicing* da OPN representados pela unidade de medida RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) foram obtidos e utilizados para as análises de expressão.

#### 4.2) Coleta das amostras de pacientes da casuística do INCA

As amostras de pacientes pediátricos com LLA-B são provenientes do Programa de Hemato-Oncologia Pediátrica do INCA, em colaboração com a Dra. Maria Socorro Pombo de Oliveira. Essas amostras foram coletadas entre os anos de 2000 a 2016, e foram selecionadas de acordo com a presença de alterações genéticas e disponibilidade de RNA para os ensaios

em laboratório. Para o nosso estudo, foram incluídas amostras de pacientes LLA-B pediátricos com a fusão gênica *KMT2A-AFF1* (n=26) ou *ETV6-RUNX1* (n=28). Embora nosso estudo tenha como foco pacientes positivos para *KMT2A-AFF1*, os pacientes positivos para *ETV6-RUNX1* foram escolhidos como grupo comparativo, uma vez que apresentam características clínicas opostas em relação ao nosso modelo de estudo principal. Todas as amostras foram obtidas a partir de aspirados da MO dos pacientes. Os pacientes foram classificados como risco padrão quando apresentavam: idade > 12 meses e < 10 anos, leucometria < 50 x 10<sup>3</sup> céls./mm<sup>3</sup>, negativas para a rearranjos de *KMT2A* e *BCR-ABL1* e ausência de acometimento do SNC. Já os pacientes classificados como alto risco apresentavam: idade < 12 meses e > 10 anos, leucometria ≥ 50 x 10<sup>3</sup> céls./mm<sup>3</sup>. O uso das amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética do INCA, protocolo de número 33243214700005274.

#### **4.3) Cultura de células**

A linhagem celular em suspensão RS4;11 de LLA-B, positiva para a fusão gênica *KMT2A-AFF1*, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Imunologia Tumoral do INCA, em colaboração com o Dr. Martín Bonamino. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Sigma*®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L), pH 7,2. Essa linhagem celular foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em concordância com as recomendações do *American Type Culture Collection* (ATCC).

A linhagem celular MC3T3-E1, de osteoblastos murinos, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biocerâmicas e Cultura Celular da UFRJ, em colaboração com a Dra. Elena Mavropoulos e a Técnica Suzana Anjos. As células foram cultivadas em meio MEM- $\alpha$  (*Gibco*®) suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L), pH 7,4. Essa linhagem celular foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em concordância com as recomendações do *American Type Culture Collection* (ATCC).

#### **4.4) Extração de RNA**

A extração de RNA das amostras de pacientes foi realizada a partir das células mononucleares separadas após gradiente de *Ficoll* (leucometria ≥16.000) ou de lise de hemácias (leucometria <16.000). A partir de 5 x 10<sup>6</sup> células, o RNA total destas amostras de

pacientes foi extraído seguindo-se as recomendações do fabricante do reagente Trizol™ (*Invitrogen*). A extração de RNA da linhagem celular RS4;11 também foi realizada a partir de  $5 \times 10^6$  células, seguindo o mesmo protocolo. Foram acrescentados 1 ml de Trizol ao precipitado de células, sendo homogeneizadas com uma pipeta automática e em seguida incubadas por 5 min à temperatura ambiente (TA). Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio, pipetando vigorosamente por alguns segundos, e incubando por 3 min à TA. As amostras foram então centrifugadas a 12.500 rpm por 15 min à 4°C (centrífuga *eppendorf* 5402, rotor fixo). Após a centrifugação, foi coletado o sobrenadante e este foi transferido para um tubo novo livre de RNase. A esse novo tubo com a solução contendo RNA foram adicionados 500  $\mu$ L de etanol isopropílico 100%. Essa mistura foi incubada por 10 min à TA. O material foi em seguida centrifugado a 12.500 rpm por 10 min à 4°C (centrífuga *eppendorf* 5402, rotor fixo). O sobrenadante foi descartado e o precipitado (RNA) lavado com 1 ml de etanol 75%. O material foi novamente centrifugado a 12.500 rpm por 10 min à 4°C (centrífuga *eppendorf* 5402, rotor fixo). O sobrenadante foi retirado para secagem do precipitado e a este foram acrescentados 20  $\mu$ L de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). O material foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta e incubado por 10 min a 60°C. Após a extração, o RNA foi mantido à -80°C até o seu uso nas reações de síntese de DNA complementar (cDNA). As amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop (*Nanodrop Technologies*, USA) a 260 nm.

#### 4.5) Síntese de cDNA

A síntese de cDNA dos pacientes foi realizada a partir de 1  $\mu$ g de cada amostra de RNA total e da linhagem celular RS4;11 foi realizada a partir de 2  $\mu$ g de RNA total, segundo o protocolo do kit “*Superscript II First Strand Synthesis System for RT PCR*” (*Invitrogen*). Às amostras de RNA, foram adicionados OligodT (500 $\mu$ g/mL) e dNTPmix (10 $\mu$ M) com incubação a 65°C, durante 5 min no termociclador (*Applied Biosystems*) e armazenamento no gelo por 1 min. Em seguida, foram adicionados o tampão 5X *First Strand*, DTT (0.1M) e RNase OUT (400 ng/ $\mu$ l), seguido de incubação a 42°C durante 2 min. Posteriormente, nesta solução foram adicionados 2  $\mu$ L de *SuperScript II* Transcriptase Reversa, seguida de incubação a 42°C durante 50 min. A reação foi inativada através de incubação a 70°C pelo período de 15 min. O cDNA sintetizado posteriormente foi utilizado para os ensaios de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). As amostras de cDNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop (*Nanodrop Technologies*, USA) a 260 nm.

#### 4.6) RT-PCR

As reações de PCR a partir de cDNA previamente sintetizado (RT-PCR, *do inglês reverse transcription-polymerase chain reaction*) foram realizadas para detectar a expressão do transcrito direto da fusão gênica *KMT2A-AFF1* na linhagem celular RS4;11. Para esta análise, foi utilizada uma concentração final de 500 ng de cDNA da linhagem celular RS4;11. Os pares de oligonucleotídeos utilizados na reação estão descritos na Tabela 4.1. A reação foi executada com 2 µL de cDNA, tampão 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50pM de oligos, 10 nM de dNTPs, 0,1 U/reação de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*). As condições de ciclagem foram: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 66°C por 30 s e 72°C por 1 minuto. Um ciclo de extensão final a 72°C por 2 min em termociclador (*Applied Biosystems*). O produto de amplificação da RT-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com GelRed® (*Biotium*) e visualizado em trans iluminador com luz ultra violeta (*ChemiDoc, BioRad*).

**Tabela 4.1 Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a análise de RT-PCR**

Gene	Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
<i>KMT2A</i>	KMT2A Forward (F)	GATGCCTTCCAAAGCCTACCTG
	KMT2A Reverse (R)	CTCCCCGCCCAAGTATCCCT
<i>AFF1</i>	AFF1 Forward (F)	TGGGTTACAGAACTGACATGCTGA
	AFF1 Reverse (R)	GCTGCCATTTGTTTGTGTTGGAG

#### 4.7) PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O nível de expressão transcricional das isoformas de *splicing* da OPN foi avaliado por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), utilizando o aparelho *Eco Real-Time PCR System (Illumina)*. Para esta análise, foi utilizada uma concentração final de 60ng de cDNA das amostras de pacientes e 500ng de cDNA da linhagem celular RS4;11. O sistema de detecção utilizado foi o *SYBR™ Green (Applied Biosystem)*. Os pares de oligonucleotídeos utilizados na reação estão descritos na Tabela 4.2. Os níveis transcricionais de expressão das isoformas de *splicing* foram normalizados utilizando a β-actina como gene constitutivo e o cálculo foi feito utilizando o método de quantificação 1/deltaCT. A reação continha 10µL de *SYBR™ Green*, 5 µL de cDNA e 5 µL de oligonucleotídeo. As condições de ciclagem foram: incubação inicial a 50°C por 2 min (etapa incubação UDG), seguido de uma etapa a 95° C por

5min (etapa ativação da polimerase), 40 ciclos a 95°C por 30s, 60° por 30s e 72° por 30s (etapa de anelamento) e uma etapa de extensão final de 90° por 5 s , 55°c por 5s e 90° por 5s.

**Tabela 4.2 Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a análise de RT-qPCR**

<b>Gene</b>	<b>Oligonucleotídeos</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
<i>OPNa</i>	OPNa Forward (F)	ATCTCCTAGCCCCACAGAAT
	OPNa Reverse (R)	CATCAGACTGGTGAGAATCATC
<i>OPNb</i>	OPNb Forward (F)	ATCTCCTAGCCCCACAGAC
	OPNb Reverse (R)	AAAATCAGTGACCAGTTCATCAG
<i>OPNc</i>	OPNc Forward (F)	CTGAGGAAAAGCAGAAATGCTG
	OPNc Reverse (R)	GTCAATGGAGTCCTGGCTGT
<i>β-actina</i>	β-actina Forward (F)	GGCGGCACCACCATGTACCCT
	β-actina Reverse (R)	AGGGGCCGGACTCGTCATACT

#### 4.8) Imunofluorescência

Cerca de  $5 \times 10^4$  células da linhagem RS4;11 foram submetidas a centrifugação utilizando o aparelho de Cytospin™ (*Thermo Fisher Scientific*) durante 15 min, a 10.000 rpm, a fim de que as mesmas aderissem à lamínula. Após a centrifugação, as células foram fixadas na lamínula com solução de paraformaldeído (PFA) 2%, durante 10 min. Após a fixação, as células foram lavadas com solução de PBS/CM (PBS com 100mM de CaCl<sub>2</sub> e 100mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0). Em seguida, foram permeabilizadas com solução de 0,2% de soro de albumina bovina (BSA) + 0,1% de Triton X-100 em PBS, pH 8,0, durante 30 min. Posteriormente, foram bloqueadas com solução de BSA 0,2% pH 8,0, durante 1h. Após algumas lavagens com PBS/CM, as células foram incubadas por 4h com anticorpo anti-OPNc conjugado ao fluoróforo FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) (FITC *Chicken anti-Human Osteopontin-c*), em TA, na ausência de luz. O anticorpo anti-OPNc conjugado ao FITC foi diluído em solução de 0,2% de BSA/ Triton X-100 0,1% em PBS pH 8,0, na proporção de 1:25. Após lavagens com PBS/CM, as células foram incubadas com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) por 1 min, diluído em água Milli-Q na proporção de 1:1000. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS/CM. Por fim, todas as lâminas foram montadas em solução contendo reagente *Antifade Gold ProLong* (*Invitrogen*). Todas as imagens foram capturadas em microscópio confocal a laser (*Fluoview FV10i Overview*) nos planos X e Y, em aumento de 2x. Para análise das imagens, ajuste de coloração e contraste utilizou-se o

software *ICY bioimage analysis*. As análises de intensidade de fluorescência foram realizadas pelo programa *Image J* (versão 1.51p).

#### **4.9) Silenciamento da OPNc na linhagem celular RS4;11**

Para realizar o silenciamento da OPNc na linhagem RS4;11, foi utilizado um total de  $4 \times 10^6$  células. As células foram submetidas ao sistema de eletroporação Nucleofector 4D™ (Lonza) para a transfecção com os oligômeros de DNA anti-senso (ASO) anti-OPNc (5' A\*C\*A\*AC\*GCATTCTGCTTT\*T\*C\*C 3' – ASO anti-OPNc) ou *scramble* (5' C\*C\*T\*T\*TTCGTCTTACGAC\*A\*C\*A 3' – ASO *scramble*). O ASO *scramble* foi incluído no ensaio a fim de monitorar a especificidade e a eficiência do silenciamento da OPNc, sendo assim utilizado como controle. Os asteriscos presentes nas sequências dos oligômeros anti-OPNc e *scramble*, indicam as modificações químicas do tipo fosforotioatos nos ácidos nucleicos nas extremidades 3' e 5'. Essas modificações químicas conferem uma melhor eficiência de inibição específica da OPNc, conferindo uma maior estabilidade aos oligômeros. No sistema de eletroporação Nucleofector 4D™ foi utilizado o programa T-016 e o tampão 1SM, ambos específicos para a linhagem celular RS4;11, conforme padronizado por nosso grupo. Foram testadas as concentrações de 50 e 100 nM de oligômeros nos tempos de 36h e 48h. Logo após a transfecção, as células RS4;11 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB, na ausência de penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L), até completar os tempos testados. A eficiência do silenciamento da OPNc na linhagem celular RS4;11 foi avaliada em níveis transcricionais pela técnica de RT-qPCR e a níveis proteicos por imunofluorescência.

#### **4.10) Ensaio de viabilidade celular**

Para avaliar a viabilidade das células RS4;11 mediante o silenciamento da OPNc, utilizamos o ensaio colorimétrico de (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT) (*Sigma*®). Nesse ensaio, desidrogenases mitocondriais presentes nas células metabolicamente viáveis clivam o anel tetrazólico do composto MTT, transformando-o de um composto de coloração amarela para um composto de coloração azul escuro chamado formazan. Dessa maneira, o ensaio mede a respiração celular, a qual é proporcional à quantidade de formazan produzido e ao número de células metabolicamente viáveis (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018).



Após a transfecção das células RS4;11 com os ASOs anti-OPNc ou *scramble*, o ensaio de MTT foi realizado nos tempos de 0 h, 12 h, 24 h, 36 h e 48 h. Foi utilizada uma concentração de  $4 \times 10^4$  céls./poço em placa de 96 poços. As células RS4;11 foram tratadas com o MTT em cada um dos tempos indicados, incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 3 h, na ausência de luz. Em seguida, as placas de 96 poços contendo as células RS4;11 foram centrifugadas a 1500 rpm (centrífuga *ependorff* 5804R), por 15 minutos, de forma a fazer com que as células aderissem no fundo do poço. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células homogeneizadas com dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma*®). A quantificação de células metabolicamente ativas foi realizada através de leitura da absorbância em comprimento de onda de 538 nm no espectrofotômetro *Spectra Max 190* (*Molecular Devices*). O experimento foi realizado em quintuplicatas (para cada condição: células RS4;11 transfectadas com ASOs anti-OPNc ou sua respectiva sequência *scramble*), em três experimentos independentes.

#### **4.11) Ensaio de proliferação celular**

Para avaliar a proliferação das células RS4;11 mediante o silenciamento da OPNc, escolhemos o ensaio de azul de tripan (*Sigma*®). Neste ensaio, o corante azul de tripan não é capaz de atravessar membranas íntegras. Assim, células vivas não permitem a passagem do corante, logo, não adquirem nenhuma coloração. Como as células mortas têm suas membranas danificadas, ocorre o fluxo do corante para o interior da célula fornecendo uma coloração azul.

Após a transfecção das células RS4;11 com os ASOs anti-OPNc ou *scramble*, as células foram contadas nos tempos de 0 h, 12 h, 24 h, 36 h e 48 h. Uma alíquota de 10 µL de células foi coletada, a qual foi misturada com 10 µL de azul de tripan 0,4%. As células foram colocadas na câmara de *Neubauer* e observadas ao microscópio óptico. As células viáveis foram contadas utilizando o seguinte cálculo:  $C_v = N_v \times 10^4 \times 2$ , onde  $C_v$  representa a concentração de células viáveis na suspensão celular e  $N_v$  corresponde à média do número de células viáveis observada nos quatro campos da câmara de *Neubauer*. Foram realizados cinco experimentos independentes.

#### 4.12) Ensaio de adesão celular

Os ensaios de adesão celular foram realizados sobre matrigel ou sobre a matriz extracelular formada por osteoblastos.

Para a adesão em matrigel, cerca de 24 h antes do ensaio ser iniciado, as células RS4;11 transfectadas com ASOs anti-OPNc ou *scramble*, tiveram seu meio de cultura trocado para o meio RPMI 1640 suplementado com 1% de penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L), na ausência de SFB. Neste mesmo tempo, a Matrigel® (BD Biosciences) foi plaqueada nos poços da placa de 96 poços e incubada em uma temperatura de 4°C.

Após 36 h de transfecção das células RS4;11 com os ASOs anti-OPNc ou *scramble*, foi iniciado o ensaio de adesão em matrigel. Neste ensaio, uma concentração de  $2 \times 10^4$  células ressuspendidas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 3% de BSA e 1% de penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L), foi plaqueada sobre o matrigel. As placas contendo as células plaqueadas sobre o matrigel foram incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 12 h. Após esse tempo, as células que não aderiram foram removidas através de lavagem com PBS 1x, e as células aderidas foram sendo em seguida fixadas com solução de formalina 10% (Isifar®). Em seguida, as células foram coradas com azul de toluidina em solução de boro 1% (Isifar®), durante 1 min. Posteriormente, o corante foi retirado, e as células foram homogeneizadas com SDS 1% (Sigma®). A quantificação de células aderidas em matrigel foi realizada através de leitura da absorbância em comprimento de onda de 650 nm no espectrofotômetro *Spectra Max 190 (Molecular Devices)*. O experimento foi realizado em triplicatas (para cada condição: células RS4;11 transfectadas com ASOs anti-OPNc ou sua respectiva sequencia *scramble*) em três experimentos independentes.

Para a adesão na sobre a matriz extracelular formada por osteoblasto, utilizamos a linhagem celular MC3T3-E1 de osteoblastos murinos. Para este ensaio as células MC3T3-E1 foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^4$  céls./poço em placa de 96 poços. Essas células foram cultivadas em meio MEM- $\alpha$  suplementado com 10% de com 10% de SFB e 1% de penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L) e foram tratadas a cada 48h com a solução indutora de matriz ( $\beta$ -Fosfatase Glicerol). Cerca de 14 dias após o início da indução, a formação da matriz extracelular oriunda de osteoblastos foi analisada por meio de ensaio utilizando o corante *Alizarin Red (Sigma®)*.

No ensaio com o corante *Alizarin Red*, as células MC3T3-E1 foram lavadas com PBS 1x e fixadas com PFA 4% durante 15 min. Em seguida, foram lavadas com água destilada e o corante *Alizarin Red* foi adicionado. As células foram incubadas com o corante *Alizarin Red*

durante 20 min, em TA, na ausência de luz. Após esse tempo, as células foram lavadas com água destilada. A formação da matriz extracelular foi visualizada e as imagens foram capturadas em microscópio de contraste de fase, em um aumento de 20x. O corante *Alizarin Red*, é capaz de se ligar aos depósitos de cálcio presentes na matriz extracelular formadas por osteoblastos (YANG *et al.*, 2015).

Para o ensaio de adesão das células RS4;11 em matriz extracelular foi necessário que retirássemos os osteoblastos presentes na matriz. Para isto, as células MC3T3-E1 foram lavadas com solução de PBS Ca<sup>2+</sup> e em seguida incubadas durante 3 minutos com uma solução de extração composta por 0,1% de Triton X-100 + Hidróxido de amônia + PBS Ca<sup>2+</sup> + inibidor de protease e fosfatase (*Thermo Scientific*). Após as células MC3T3-E1 serem retiradas da matriz, esta foi bloqueada com solução de 3% de BSA em PBS durante 1h.

O ensaio de adesão das células RS4;11 mediante o silenciamento da OPNc em matriz extracelular formada por osteoblastos seguiu todas as etapas descritas para no ensaio de adesão em matrigel. As imagens das células RS4;11 após a transfecção, aderidas na matriz extracelular, foram capturadas em microscópio *Axio Observer. Z1* equipado com um *Axio Cam HRc* e *Axio Vision Release 8.2 Image Analyzer (Carl Zeiss)*, em um aumento de 20x. Os experimentos foram realizados em triplicatas (para cada condição: células RS4;11 transfectadas com ASOs anti-OPNc ou sua respectiva sequencia *scramble*), em três experimentos independentes.

#### **4.13) Ensaio de transmigração celular**

Para avaliar a migração das células RS4;11, após 36 h de transfecção com os ASOs anti-OPNc ou *scramble*, as células foram plaqueadas na concentração de  $1,5 \times 10^4$  e cultivadas em 200  $\mu$ l de meio RPMI 1640 suplementado com 1% de penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L) na membrana de polycarbonato *Transwell*® (poro de 8  $\mu$ m; *Corning Incorporated*). Utilizou-se meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB como um quimioatraente na parte inferior da câmara *Transwell*. As células RS4;11 cultivadas na câmara *Transwell* foram incubadas durante 4 h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células que atravessaram a membrana de polycarbonato *Transwell* são aquelas que migraram e conseqüentemente encontraram-se na parte inferior da membrana. Posteriormente, os insertos foram lavados com PBS 1x, as células que migraram foram coradas com panóptico (*Laborclin*) e em seguida lavadas sucessivamente com água Milli-Q. Para análise da capacidade migratória das células, imagens de cinco campos das membranas coradas foram

capturadas em microscópio *Axio Observer. Z1* equipado com um *Axio Cam HRc* e *Axio Vision Release 8.2 Image Analyzer (Carl Zeiss)*, onde mensurou-se o número de células que migraram. Foram realizados três experimentos independentes.

#### **4.14) Ensaio de invasão celular**

Para avaliar a capacidade invasiva das células RS4;11, após 36 h de transfecção com os ASOs anti-OPNc ou *scramble*, as células foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^6$  e cultivadas em 200µl de meio RPMI 1640 suplementado com 1% de penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L) na membrana de policarbonato *Transwell®* (poro de 8 µm; *Corning Incorporated*). A membrana de policarbonato *Transwell* foi revestida com 50 µL de Matrigel® (BD *Biosciences*) diluído 1:10 em meio RPMI 1640 suplementado com 1% de penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L). Utilizou-se meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB como um quimio-atraente na parte inferior da câmara *Transwell*. As células RS4;11 cultivadas na câmara *Transwell* foram incubadas durante 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células que atravessaram a membrana de policarbonato *Transwell* e o matrigel, são aquelas que invadiram e conseqüentemente encontraram-se na parte inferior da membrana. Posteriormente, o matrigel que revestiu a parte superior da membrana foi retirado com uma haste de algodão. Em seguida, os insertos foram lavados com PBS 1x, as células que invadiram foram coradas com panóptico (*Laborclin*) e em seguida lavadas sucessivamente com água Milli-Q. Para análise da capacidade invasiva das células, imagens de cinco campos dos insertos foram capturadas em microscópio *Axio Observer. Z1* equipado com um *Axio Cam HRc* e *Axio Vision Release 8.2 Image Analyzer (Carl Zeiss)*, onde mensurou-se o número de células que migraram. Foram realizados três experimentos independentes.

#### **4.15) Análises estatísticas**

A significância estatística das diferenças observadas entre as condições estudadas foi calculada através do Teste T *Student's*. As diferenças foram consideradas significativa quando: \*p<0,05, \*\*p<0,005 e \*\*\*p<0,0005. Os gráficos foram construídos com auxílio da *GraphPad Prism 8.0 (GraphPad™ Software, San Diego, CA, EUA)*.

## 5) RESULTADOS

Parte dos resultados aqui descritos foram publicados na forma de 3 artigos científicos, os quais encontram-se em anexo

### 5.1) Avaliação da expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes pediátricos com LLA-B do banco de dados TARGET

#### 5.1.1) Características clínicas de pacientes pediátricos com LLA-B

O presente estudo é pioneiro na análise do perfil de expressão transcricional das isoformas de *splicing* da OPN em LLA-B. Desta maneira, realizamos uma análise preliminar *in silico* do perfil de expressão transcricional dessas isoformas em amostras de pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-B.

Utilizando o banco de dados TARGET, obtivemos uma coorte de 135 pacientes diagnosticados com LLA-B com distintas alterações moleculares, tais como: *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1*, *KMT2A-r*, *TCF3-PBX1*, *iAMP21* e alta hiperdiploidia. As principais características clínicas dos pacientes, disponíveis no banco de dados, estão descritas na Tabela 5.1. A maioria dos pacientes incluídos nesta análise apresenta idade entre 1-10 anos (66,67%), é do sexo masculino (51,11%), apresenta contagem leucocitária  $<50 \times 10^3$  céls./ $\mu$ l (61,49%), recaída da doença (74,08%) e não apresenta acometimento do SNC (80,74%). O *status* de acometimento do SNC foi dividido em três categorias: SNC1, refere-se aos pacientes que não apresentaram acometimento do SNC; SNC2, refere-se aos pacientes que apresentaram um valor de acometimento  $\leq 5$  céls./ $\mu$ L. Já os SNC3, referem-se aos pacientes que apresentaram total acometimento do SNC (Tabela 5.1).

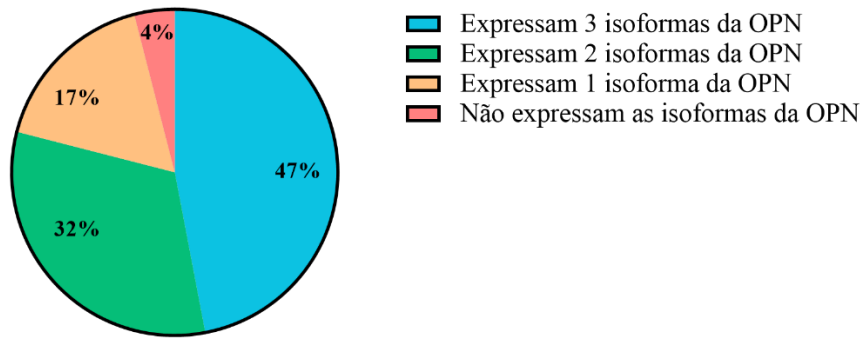
**Tabela 5.1 – Características clínicas de pacientes pediátricos com LLA-B disponíveis no banco de dados TARGET\***

<b>Características Clínicas</b>	<b>Pacientes LLA-B (N(%))</b>
<b>Idade (anos)</b>	
< 1 ano	0 (0)
1 – 10 anos	90 (66,67)
10 – 18 anos	45 (33,33)
<b>Sexo</b>	
Masculino	69 (51,11)
Feminino	66 (48,89)
<b>Leucometria (células/mm<sup>3</sup>)</b>	
< 50 . 10 <sup>3</sup>	83 (61,49)
≥ 50 . 10 <sup>3</sup>	52 (38,51)
<b>Primeiro Evento</b>	
Nenhum	29 (21,48)
Recaída	100 (74,08)
Morte	3 (2,22)
Neoplasia Maligna Secundária	2 (1,48)
Censurado	1 (0,74)
<b>Acometimento do SNC</b>	
SNC 1	109 (80,74)
SNC 2	22 (16,30)
SNC 3	4 (2,96)
<b>Total</b>	<b>N=135</b>

\*No banco de dados TARGET foram excluídos os pacientes com idade inferior a 1 ano.

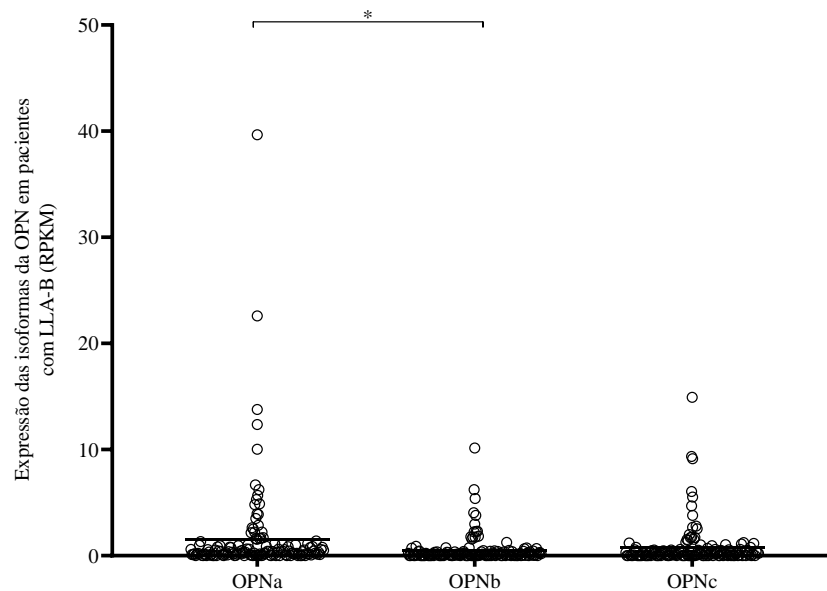
### **5.1.2) Níveis de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes pediátricos com LLA-B**

Com base nos dados disponíveis no TARGET, analisamos o perfil de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc nestas amostras. A Figura 5.1 mostra que a maioria dos pacientes com LLA-B apresentou a expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc concomitantemente (47%), enquanto outros 32% apresentaram a expressão transcricional de apenas duas destas isoformas (ocorrendo as três combinações: OPNa e OPNb, OPNa e OPNc e OPNb e OPNc). Outros 17% apresentaram expressão transcricional de apenas uma destas três isoformas. Os demais 4% não apresentaram a expressão transcricional de nenhuma das isoformas testadas.



**Figura 5.1 – Frequência de pacientes pediátricos com LLA-B que expressam as isoformas OPNa, OPNb e OPNc.** As amostras de pacientes com LLA-B disponíveis no banco de dados TARGET (n=135) foram analisadas em relação a frequência de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc. A cor azul representa a porcentagem de pacientes que expressam estas três isoformas da OPN, a cor verde dos que expressam duas destas três isoformas, a cor amarela daqueles que expressam apenas uma destas três isoformas e a cor vermelha daqueles que não expressam nenhuma destas três isoformas analisadas.

A análise do nível de expressão transcricional destas três isoformas na amostra testada, mostrou que a OPNa foi a isoforma que apresentou maior nível de expressão transcricional (mediana =1,50), seguida da OPNc (mediana = 0,74) e OPNb, (mediana =0,50), respectivamente (Figura 5.2).

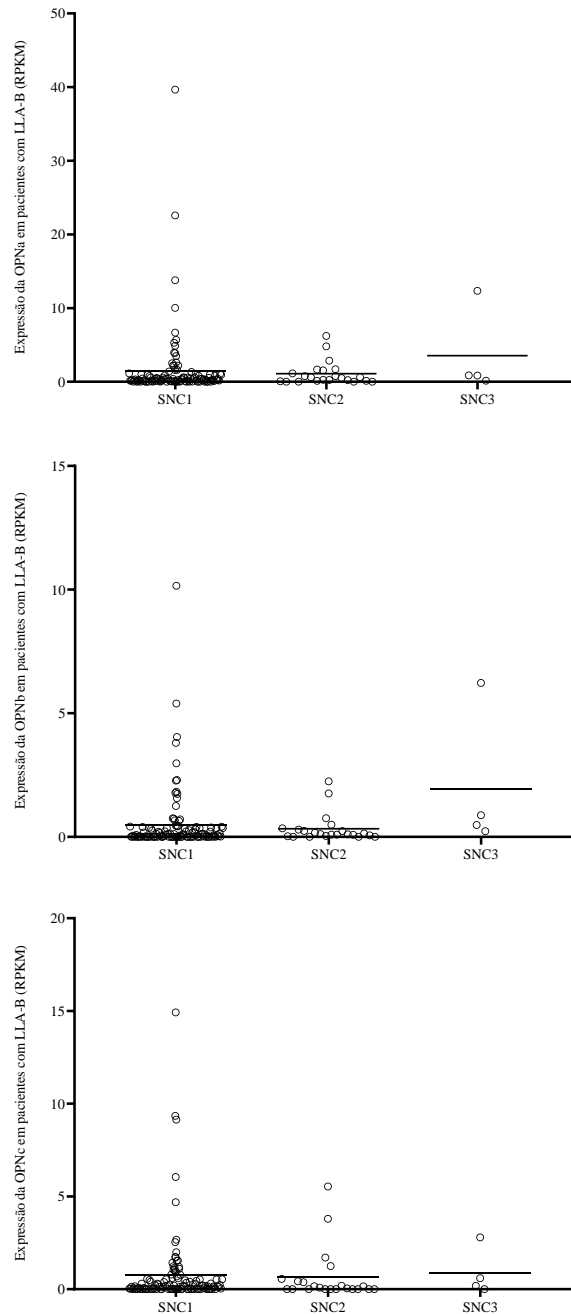


**Figura 5.2 – Expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes LLA-B disponíveis no banco de dados TARGET.** Os pacientes com LLA-B disponíveis no banco de dados TARGET (n=135) foram analisados em relação a expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc. O valor de expressão transcricional tem como unidade de medida o RPKM (“reads per kilobase million”). Para a análise estatística empregou-se o Teste T *Student’s* com a correção de Welch’s. A diferença foi considerada significativa quando: \*p<0,05.

### **5.1.3) Associação da expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc com o acometimento do SNC em pacientes pediátricos com LLA-B**

Em seguida, avaliamos a associação do nível de expressão transcricional das isoformas da OPN com o *status* de acometimento do SNC. Observamos que as três isoformas da OPN analisadas apresentaram maiores medianas de expressão transcricional nos pacientes com total acometimento do SNC (SNC 3) (OPNa, mediana = 3,54; OPNb, mediana = 1,95; OPNc, mediana = 0,89), em comparação àqueles com acometimento parcial (SNC 2) (OPNa, mediana = 1,10; OPNb, mediana = 0,33; OPNc, mediana = 0,64) ou sem acometimento (SNC 1) (OPNa, mediana = 1,5; OPNb, mediana = 0,48; OPNc, mediana = 0,74) ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.3).





**5.3 – Associação da expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc os *status* de acometimento do SNC de pacientes LLA-B disponíveis no banco de dados TARGET.** Os níveis de expressão transcricional das três isoformas da OPN testadas foram associadas com os *status* de acometimento do SNC de pacientes com LLA-B disponíveis no banco de dados TARGET (n=135). **(A)** Nível de expressão transcricional da OPNa em cada *status* de acometimento do SNC. **(B)** Nível de expressão transcricional da OPNb em cada *status* de acometimento do SNC. **(C)** Nível de expressão transcricional da OPNc em cada *status* de acometimento do SNC. O *status* de acometimento do SNC foi dividido em três categorias: SNC1, refere-se aos pacientes que não apresentaram acometimento do SNC; SNC2, refere-se aos pacientes que apresentaram um valor de acometimento  $\leq 5$  céls./ $\mu$ L e SNC3, refere-se aos pacientes que apresentaram total acometimento do SNC. O valor de expressão transcricional das isoformas da OPN tem como unidade de medida o RPKM (“reads per kilobase million”). Para a análise estatística empregou-se o Teste T *Student’s*.

Em conjunto, esses dados indicam uma possível associação da expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em células de LLA-B com o processo de acometimento de sítios extramedulares, como o SNC.

## **5.2. Avaliação da expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes pediátricos com LLA-B de casuística do INCA**

### **5.2.1) Características clínicas de pacientes pediátricos com LLA-B contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1* ou *ETV6-RUNX1***

Com base nos resultados anteriormente descritos, que indicaram uma possível associação da expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc com o acometimento do SNC, escolhemos como grupo modelo para a etapa seguinte de nosso estudo os pacientes pediátricos com LLA-B que apresentam a fusão *KMT2A-AFF1*. Pacientes positivos para esta fusão gênica apresentam elevadas taxas de acometimento de sítios extramedulares, sendo o SNC o principal sítio (LOPEZ-MILLAN *et al.*, 2019). Como grupo comparativo oposto a este, utilizamos amostras de pacientes que apresentavam a fusão *ETV6-RUNX1*, associada às características bom prognóstico da doença na LLA-B (MOORMAN, 2012). Nesta etapa, foram extraídas amostras de RNA obtidas a partir de sangue periférico ou aspirado de MO de pacientes pertencentes aos dois grupos estudados, provenientes de casuística do INCA.

Para avaliar o perfil de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes LLA-B, utilizamos uma coorte de 54 pacientes pediátricos com LLA-B. Dentro desta coorte, 26 pacientes eram positivos para a fusão gênica *KMT2A-AFF1*, enquanto 28 pacientes eram positivos para o rearranjo gênico *ETV6-RUNX1*. As principais características clínicas desses pacientes estão apresentadas na Tabela 5.2. A maioria dos pacientes incluídos nesta coorte positivos para a fusão *KMT2A-AFF1*, apresenta idade inferior a 1 ano (35,18%), é do sexo feminino (53,48%), apresenta contagem leucocitária  $\geq 50 \times 10^3$  céls./ $\mu$ l (69,23%), acometimento do SNC (65,38%) e foi classificada dentro do grupo de alto risco da doença (96,15%) de acordo com os critérios estabelecidos pelo *National Cancer Institute* (NCI). Os pacientes positivos para a fusão *ETV6-RUNX1*, em sua maioria apresenta idade entre 1-10 anos (85,71%), é do sexo masculino (60,71%), apresenta contagem leucocitária  $< 50 \times 10^3$  céls./ $\mu$ l (71,42%), acometimento do SNC (96,42%) e foram classificados dentro do grupo de risco padrão da doença (71,42%) de acordo com o NCI (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2 – Características clínicas dos pacientes diagnosticados com LLA-B de casuística do INCA**

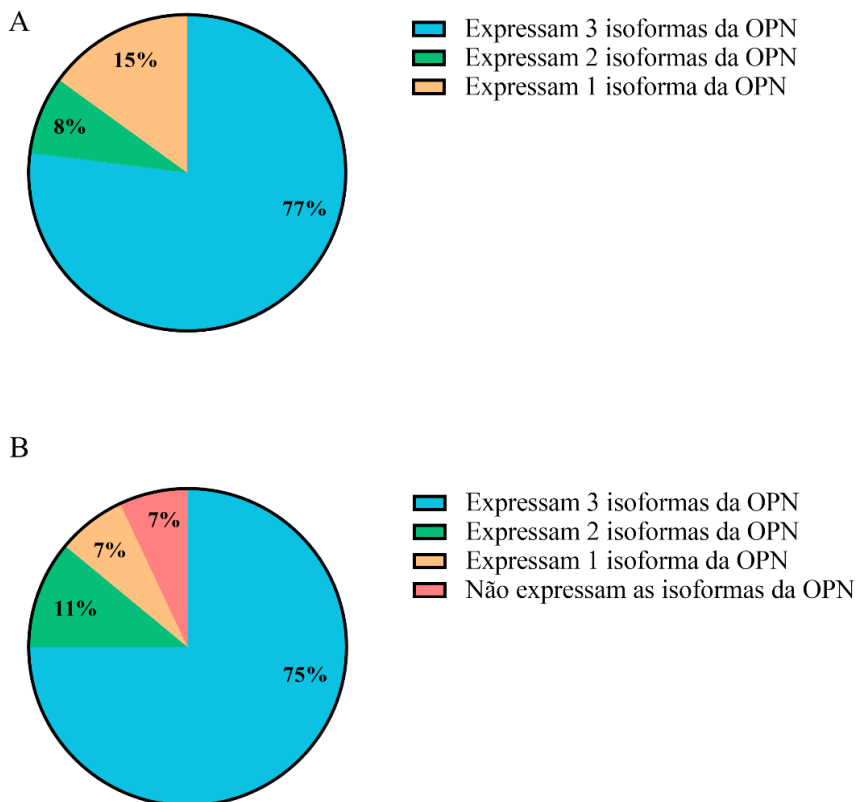
Características Clínicas	Pacientes positivos para fusão <i>KMT2A-AFF1</i> (N(%))	Pacientes positivos para fusão <i>ETV6-RUNX1</i> (N(%))	Todos os pacientes (N(%))
<b>Idade (anos)</b>			
< 1 ano	18 (69,23)	1 (3,57)	19 (35,18)
1 – 10 anos	7 (26,92)	24 (85,71)	31 (57,40)
10 – 18 anos	1 (3,84)	3 (10,71)	4 (7,40)
<b>Sexo</b>			
Masculino	12 (46,15)	17 (60,71)	29 (53,70)
Feminino	14 (53,84)	11 (39,28)	25 (46,29)
<b>Leucometria (células/mm<sup>3</sup>)</b>			
< 50 . 10 <sup>3</sup>	8 (30,76)	20 (71,42)	28 (51,85)
≥ 50 . 10 <sup>3</sup>	18 (69,23)	8 (28,57)	26 (48,14)
<b>Classificação de risco (NCI)</b>			
Risco padrão	1 (3,84)	20 (71,42)	21 (38,88)
Risco elevado	25 (96,15)	8 (28,57)	33 (61,11)
<b>Acometimento do SNC</b>			
Sim	9 (34,61)	1 (3,57)	10 (18,51)
Não	17 (65,38)	27 (96,42)	44 (81,48)
<b>Total</b>	N=26	N=28	N=54

### 5.2.2) Níveis de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes pediátricos com LLA-B contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1* ou *ETV6-RUNX1*

Utilizando amostras da coorte de pacientes do INCA descrita acima, realizamos uma análise da frequência de casos positivos para expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc e do perfil transcricional dessas variantes de *splicing*.

Através da técnica de RT-qPCR com o uso de sequências de oligonucleotídeos específicas para cada uma dessas isoformas, observamos que a maioria dos pacientes positivos para a fusão *KMT2A-AFF1* apresentou concomitantemente a expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc (77%). Outros 8% e 15% dos pacientes apresentaram a expressão transcricional de duas (ocorrendo as três combinações: OPNa e OPNb, OPNa e OPNc e OPNb e OPNc) ou de apenas uma destas isoformas, respectivamente (Figura 5.4A). De forma similar, a maioria dos pacientes positivos para a fusão *ETV6-RUNX1*, também apresentou a expressão transcricional destas três isoformas (75%), enquanto 11% e 7% deles destes apresentou respectivamente a expressão transcricional de duas (ocorrendo as três combinações: OPNa e OPNb, OPNa e OPNc e OPNb e OPNc) ou de apenas uma das três isoformas citadas da OPN. Diferentemente do observado no grupo de pacientes positivos para a fusão *KMT2A-AFF1*, em que todos os pacientes apresentaram a

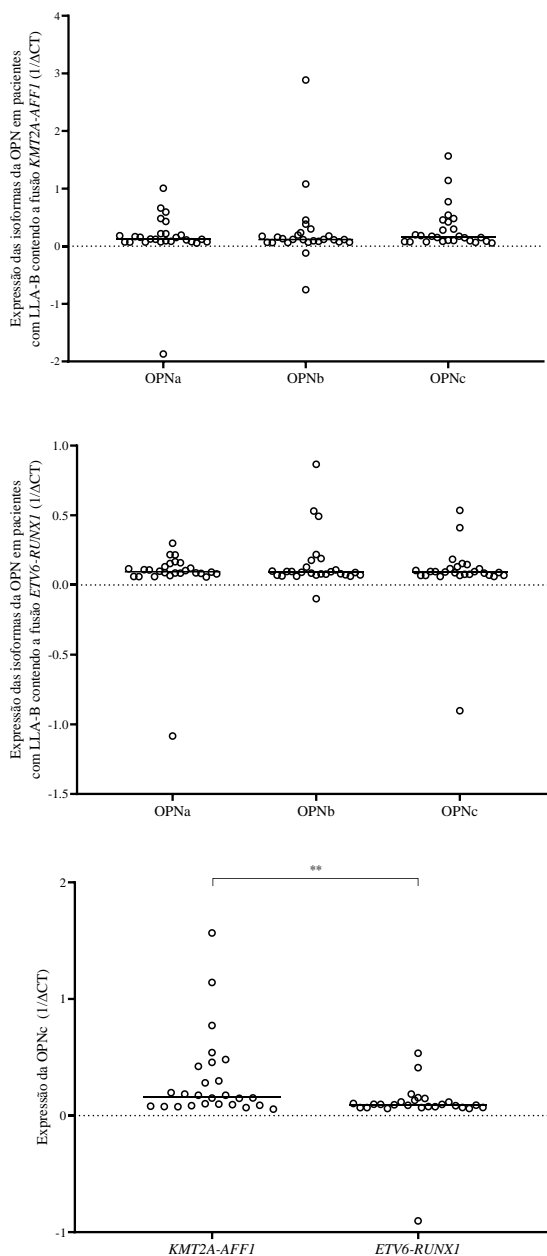
expressão transcricional de pelo menos uma destas isoformas da OPN, 7% das amostras do grupo comparativo positivo para a fusão *ETV6-RUNX1* não expressa nenhuma das três isoformas analisadas (Figura 5.4B).



**Figura 5.4 – Frequência de pacientes pediátricos com LLA-B contendo a fusão *KMT2A-AFF1* ou *ETV6-RUNX1* que expressam as isoformas OPNa, OPNb e OPNc.** As amostras de pacientes com LLA-B contendo a fusão *KMT2A-AFF1* ou *ETV6-RUNX1* (n=54) foram analisadas em relação a frequência de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc. **(A)** Frequência de expressão transcricional destas três isoformas da OPN em pacientes LLA-B contendo a fusão *KMT2A-AFF1* (n=26). **(B)** Frequência de expressão transcricional destas três isoformas da OPN em pacientes LLA-B contendo a fusão *ETV6-RUNX1* (n=28). A cor azul representa a porcentagem de pacientes que expressam estas três isoformas da OPN, a cor verde dos que expressam duas destas três isoformas, a cor amarela daqueles que expressam apenas uma destas três isoformas e a cor vermelha daqueles que não expressam nenhuma destas três isoformas analisadas.

A análise do nível de expressão transcricional das isoformas da OPN nos pacientes positivos para a fusão *KMT2A-AFF1* mostrou que a OPNc é a isoforma que apresenta a maior mediana de expressão transcricional neste grupo (mediana = 0,162), seguida da OPNb (mediana = 0,116) e OPNa (mediana = 0,122) (Figura 5.5A) ( $p > 0,05$ ). Já nos pacientes positivos para a fusão *ETV6-RUNX1*, a OPNa é a isoforma com maior mediana de expressão transcricional (mediana = 0,095), seguida da OPNc (mediana = 0,091) e OPNb (mediana =

0,090) (Figura 5.5B) ( $p > 0,05$ ). Uma vez que a OPNc se mostrou mais expressa no grupo positivo para a fusão *KMT2A-AFF1*, foco do presente estudo, resolvemos comparar a mediana de expressão transcricional desta isoforma entre os dois grupos de pacientes. Observamos que a mediana de expressão transcricional da OPNc é significativamente maior no grupo de pacientes positivos para a fusão *KMT2A-AFF1* em relação ao grupo de pacientes positivos para a fusão *ETV6-RUNX1* ( $p = 0,0056$ ) (Figura 5.5C).

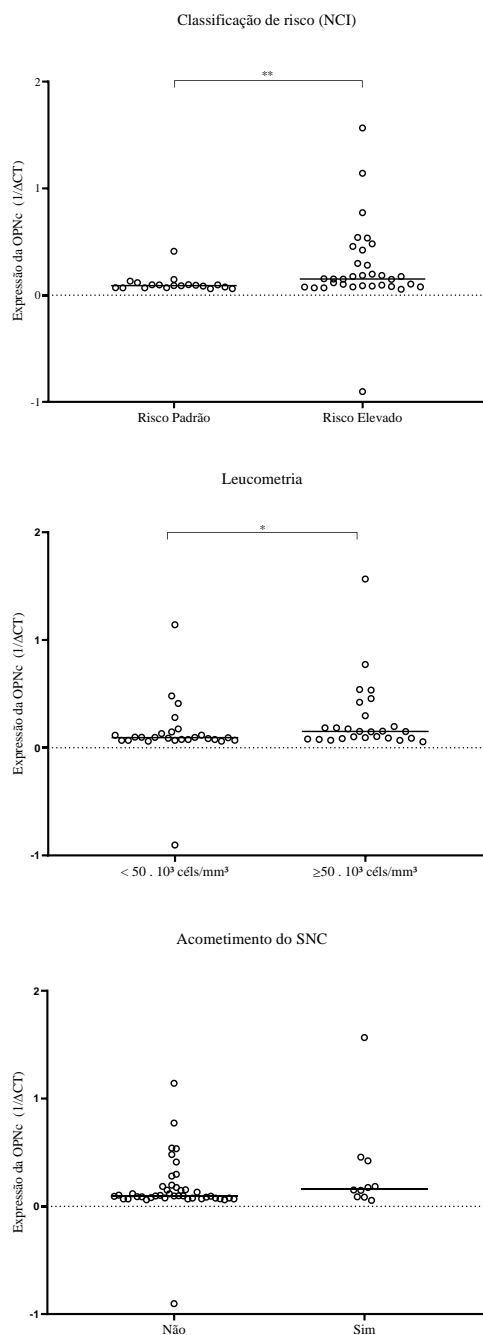


**Figura 5.5 – Expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes LLA-B contendo a fusão *KMT2A-AFF1* ou *ETV6-RUNX1*. (A) Nível de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes com LLA-B contendo a fusão *KMT2A-AFF1* (n= 26). (B) Nível de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em pacientes com LLA-B contendo a fusão *ETV6-RUNX1* (n= 28) (C) O nível de expressão transcricional da OPNc foi comparado entre o grupo de pacientes positivos para a fusão *KMT2A-AFF1* e o grupo de pacientes positivos para a fusão *ETV6-RUNX1*. Ensaio de**

RT-qPCR foi realizado para avaliar o nível de expressão transcricional das três isoformas da OPN, através do uso de oligonucleotídeos específicos para cada uma delas. A  $\beta$ -actina foi utilizada como gene constitutivo para normalização dos níveis de expressão transcricional. O cálculo da expressão transcricional foi realizado pelo método de quantificação  $1/\Delta CT$ . Para a análise estatística empregou-se o Teste T *Student's*. A análise foi considerada significativa quando: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ . Os resultados apresentados foram realizados em duplicatas, em três experimentos independentes.

### **5.2.3) A expressão transcricional da isoforma OPNc está associada com características de risco e prognóstico desfavoráveis em amostras pediátricas de LLA-B**

Em seguida, analisamos a possível associação entre a expressão transcricional da isoforma OPNc com características de risco e prognóstico desfavoráveis da doença, tais como: a classificação de risco de acordo com os critérios estabelecidos pelo NCI, a leucometria e o acometimento do SNC. Os pacientes classificados dentro do grupo de risco elevado da doença apresentaram uma mediana de expressão transcricional da OPNc (mediana = 0,150) significativamente maior que aqueles dentro do grupo de risco padrão da doença (mediana = 0,089;  $p = 0,0070$ ) (Figura 5.6A). Pacientes com leucometria  $\geq 50.000$  céls./ $\mu$ l também apresentaram maior mediana de expressão transcricional da OPNc (mediana = 0,150), quando comparados aqueles com leucometria  $< 50.000$  céls./ $\mu$ l (mediana = 0,094) ( $p = 0,0345$ ) (Figura 5.6B). Pacientes com acometimento do SNC também apresentaram uma maior mediana de expressão transcricional da OPNc (mediana = 0,162) em relação aqueles pacientes sem acometimento do SNC (mediana = 0,096) ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.6C).

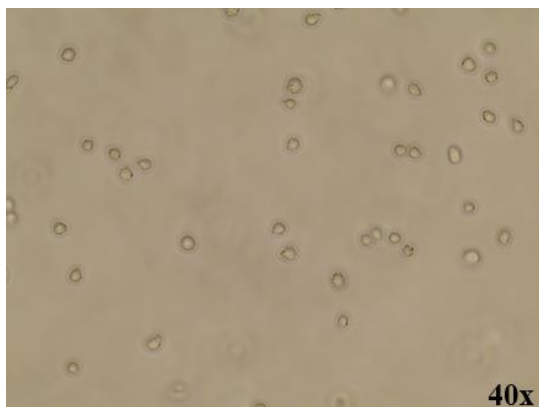


**Figura 5.6 – Associação da expressão transcricional da isoforma OPNc com características de risco e prognóstico desfavoráveis em LLA-B.** (A) Os níveis de expressão transcricional da OPNc foram comparados entre os pacientes classificados como de risco padrão e risco elevado de acordo com os critérios estabelecidos pelo NCI. (B) Os níveis de expressão transcricional da OPNc foram comparados entre os pacientes que apresentavam leucometria  $< 50.000 \text{ céls./}\mu\text{l}$  e  $\geq 50.000 \text{ céls./}\mu\text{l}$ . (C) O nível de expressão transcricional da OPNc foi comparado entre o grupo de pacientes positivos para a fusão *KMT2A-AFF1* e o grupo de pacientes positivos para a fusão *ETV6-RUNX1*. Ensaio de RT-qPCR foi realizado para avaliar o nível de expressão transcricional da OPNc através do uso de oligonucleotídeos específicos para esta isoforma. A  $\beta$ -actina foi utilizada como gene constitutivo da reação. O cálculo da expressão transcricional foi realizado pelo método de quantificação  $1/\text{deltaCT}$ . Para a análise estatística empregou-se o Teste T *Student's*. A análise foi considerada significativa quando: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ . Os resultados apresentados foram realizados em duplicatas em três experimentos independentes.

### 5.3) Expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc na linhagem celular RS4;11 de LLA-B

#### 5.3.1) Caracterização da linhagem celular RS4;11

Os dados acima apresentados apontaram uma maior mediana de expressão transcricional da OPNc em pacientes LLA-B positivos para a fusão *KMT2A-AFF1*, bem como sua associação com características de fenótipo mais agressivo desta doença. Neste sentido, de forma a iniciar a caracterização funcional da OPNc na leucemogênese de células B contendo a fusão *KMT2A-AFF1*, escolhemos como nosso modelo de estudo a linhagem celular RS4;11 de LLA-B (Figura 5.7), a qual apresenta a fusão gênica de interesse do presente trabalho.

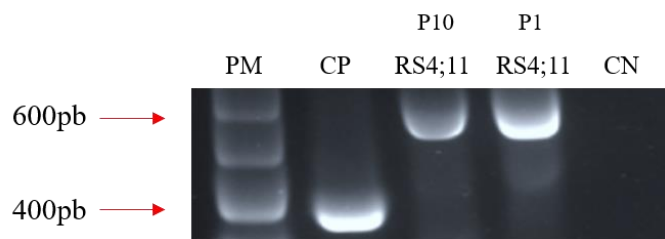


**Figura 5.7 – Imagem da linhagem celular RS4;11 de LLA-B que contém a fusão *KMT2A-AFF1*.** A captura das imagens da linhagem celular RS4;11 foi realizada através do microscópio óptico invertido em um aumento de 40x.

Realizamos a caracterização desta linhagem celular confirmando a presença da fusão *KMT2A-AFF1* e analisando o perfil de expressão da OPNc em nível transcricional e proteico. Para tal, primeiramente realizamos a análise qualitativa da fusão gênica através da técnica de RT-PCR com o uso de sequências de oligonucleotídeos específicas para os pontos de quebra da fusão. Utilizamos como controle positivo do ensaio uma amostra de cDNA de sangue periférico oriunda de paciente previamente diagnosticado com LLA-B positiva para a fusão *KMT2A-AFF1*. A presença da fusão *KMT2A-AFF1* foi confirmada em duas amostras de cDNA da linhagem celular RS4;11 oriundas de diferentes passagens (P1: passagem 1 e P10: passagem 10) (Figura 5.8). O gene *KMT2A* e *AFF1* apresentam diferentes pontos de quebra entre os éxons 8 – 12 e 3 – 7, respectivamente. Desta maneira, as amostras com a fusão

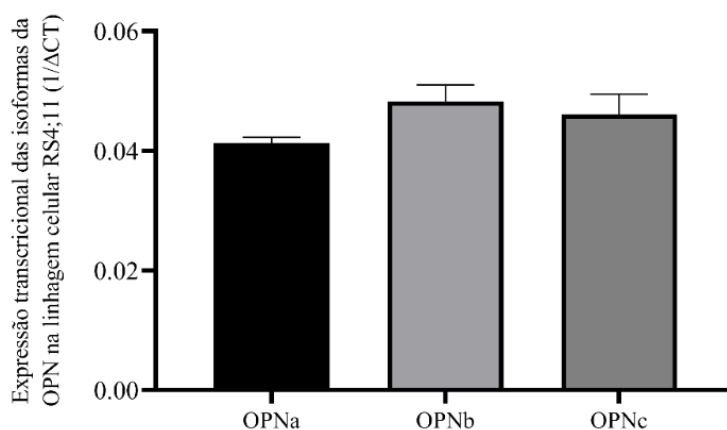


*KMT2A-AFF1* podem apresentar diferentes tamanhos, como observado em nosso resultado (Figura 5.8).



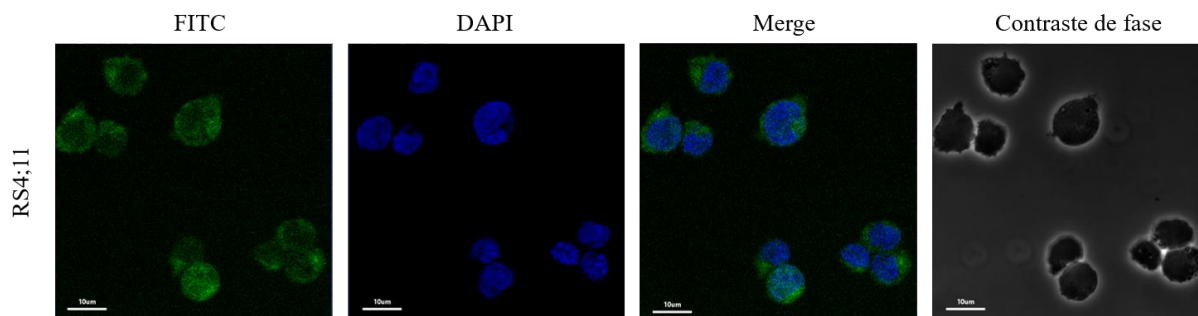
**Figura 5.8 – Perfil de expressão transcricional da fusão *KMT2A-AFF1* na linhagem celular RS4;11.** Produto de amplificação da fusão *KMT2A-AFF1* resolvido em análise eletroforética em gel de agarose 2% após ensaio de RT-PCR. Como controle positivo (CP) da reação foi utilizada uma amostra de paciente diagnosticado com LLA-B positivo para a fusão *KMT2A-AFF1*. As amostras de cDNA da linhagem celular RS4;11 foram oriundas das passagens 1 (P1) e 10 (P10).

Para avaliar o perfil de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc na linhagem celular RS4;11, realizamos ensaios de RT-qPCR através do uso de sequências de oligonucleotídeos específicos para cada uma destas isoformas. A linhagem celular RS4;11 expressa as isoformas OPNa, OPNb e OPNc, sendo as duas últimas as que apresentam maiores medianas de expressão transcricional ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.9).



**Figura 5.9 – Perfil de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc na linhagem celular RS4;11.** Ensaio de RT-qPCR foi realizado para avaliar o nível de expressão transcricional das três isoformas da OPN na linhagem celular RS4;11, através do uso de oligonucleotídeos específicos para cada uma delas. A  $\beta$ -actina foi utilizada como gene constitutivo da reação. O cálculo da expressão transcricional foi realizado pelo método de quantificação  $1/\Delta CT$ . Para a análise estatística empregou-se o Teste T *Student's*. Os resultados apresentados foram realizados em duplicatas em três experimentos independentes.

Uma vez que os dados observados nos pacientes de casuística do INCA apresentaram maiores medianas de expressão transcricional da OPNc, decidimos avaliara expressão desta isoforma em nível proteico na linhagem celular RS4;11, através do ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpo específico para esta isoforma. De acordo com esta análise, a proteína OPNc (fluorescência verde) apresenta-se expressa predominantemente no citoplasma circundando o núcleo (fluorescência azul) da linhagem celular RS4;11.



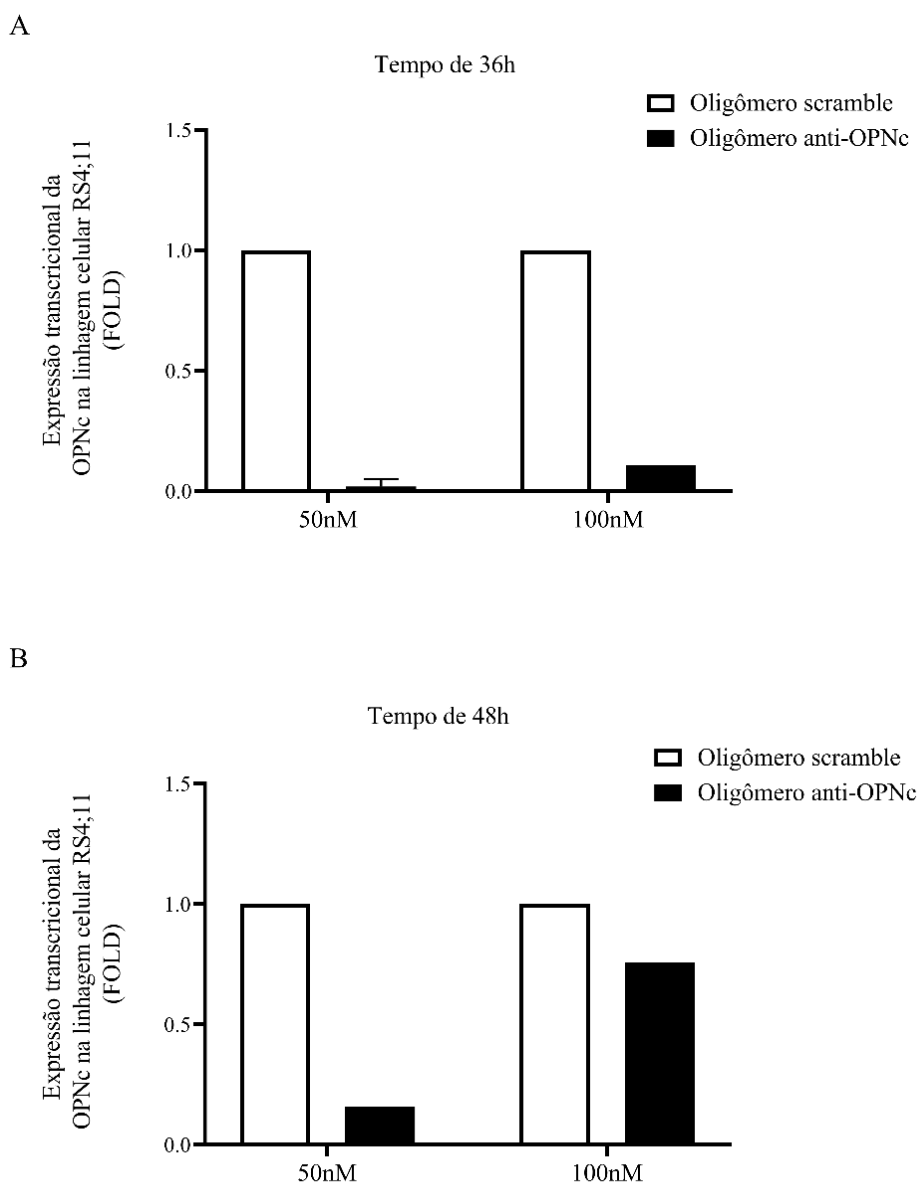
**Figura 5.10 – Ensaio de imunofluorescência para análise da localização subcelular da proteína OPNc na linhagem celular RS4;11.** A isoforma OPNc e o núcleo foram marcados com o anticorpo *Chicken anti-Human Osteopontin-c* conjugado ao FITC (fluorescência verde) e DAPI (fluorescência azul), respectivamente. A captura das imagens foi realizada em microscópio confocal e as análises através do software *ICY bioimage analysis*.

#### 5.4) Silenciamento da OPNc na linhagem celular RS4;11

Para avaliarmos o possível papel da OPNc na leucemogênese de células B contendo a fusão *KMT2A-AFF1*, optamos pela abordagem do silenciamento da expressão transcricional e protéica desta isoforma na linhagem celular RS4;11. Como primeiro passo nesse sentido, padronizamos o silenciamento desta isoforma por meio da transfecção das células RS4;11 com ASOs anti-OPNc e sua respectiva sequência controle *scramble* (ASO *scramble*).

As células RS4;11 foram transfectadas com as concentrações de 50 e 100 nM de ASOs anti-OPNc e sua respectiva sequência *scramble*. Após 36 e 48 h de transfecção, as células RS4;11 foram coletadas e tiveram seu RNA extraído e cDNA sintetizado. Em seguida, as amostras de cDNA geradas foram submetidas à ensaio de RT-qPCR para a quantificação da expressão transcricional da OPNc em resposta à transfecção com os ASOs anti-OPNc. Observamos que ao utilizarmos 50 nM de ASOs anti-OPNc, 36 h após a transfecção, ocorreu uma melhor eficiência no silenciamento da expressão transcricional da isoforma OPNc (eficiência de silenciamento = 98%), quando comparado às células transfectadas com a concentração de 100 nM no mesmo tempo pós-transfecção (eficiência de silenciamento = 89%) (Figura 5.11A). Além disto, no tempo de 48 h após a transfecção, o uso da concentração de 50 nM de ASOs anti-OPNc também demonstrou uma melhor eficiência no silenciamento

da expressão transcricional da OPNc (eficiência do silenciamento = 84%) quando comparado às células transfectadas com a concentração de 100 nM (eficiência do silenciamento = 24%) (Figura 5.11B).



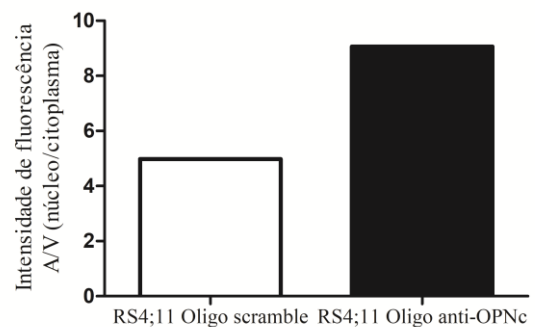
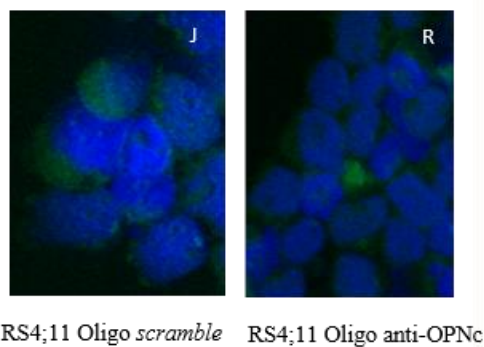
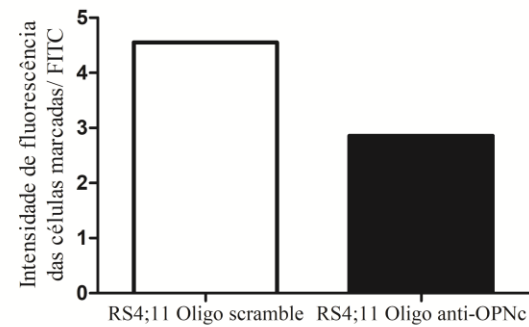
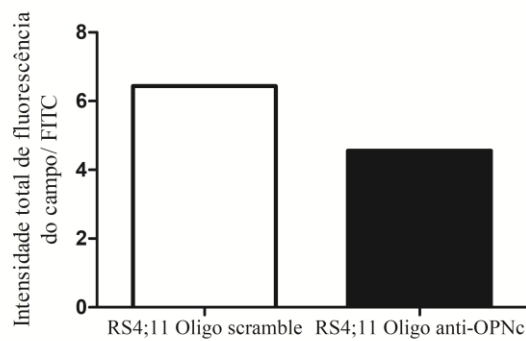
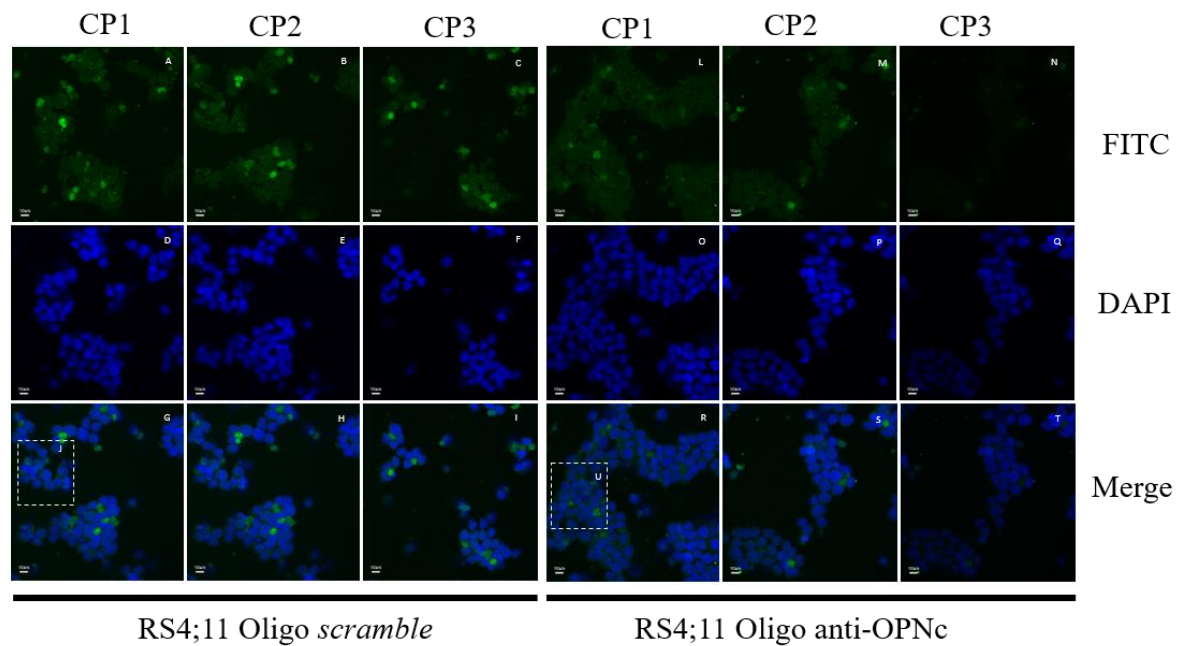
**Figura 5.11 – Silenciamento da expressão transcricional da OPNc na linhagem celular RS4;11.** (A) Nível de expressão transcricional da OPNc na linhagem celular RS4;11 após a transfecção com 50 e 100 nM de ASOs anti-OPNc e sua respectiva sequencia *scramble* no tempo de 36 h. (B) Nível de expressão transcricional da OPNc na linhagem celular RS4;11 após a transfecção com 50 e 100 nM de ASOs anti-OPNc e sua respectiva sequencia *scramble* no tempo de 48 h. O ensaio de RT-qPCR foi realizado para avaliar o nível de expressão transcricional da OPNc na linhagem celular RS4;11 através do uso de oligonucleotídeos específicos. A  $\beta$ -actina foi utilizada como gene constitutivo da reação. O cálculo da expressão transcricional relativa foi realizado pelo método de quantificação  $1/\Delta\Delta CT$ . Para a análise estatística empregou-se o Teste T *Student's*. Os resultados apresentados foram realizados em duplicatas em três experimentos independentes.

Com o objetivo de avaliar se o silenciamento da OPNc ocorreu também em níveis proteicos, após 36 h de transfecção das células RS4;11 e utilizando 50 nM de ASOs anti-OPNc ou *scramble*, realizamos o ensaio de imunofluorescência com o uso do anticorpo anti-OPNc.

A intensidade total de fluorescência de toda a área de três campos distintos (CP1, CP2 e CP3), de uma mesma lâmina contendo as células RS4;11 marcadas com o anticorpo anti-OPNc-FITC (fluorescência verde), foi quantificada nas células transfectadas com o ASO anti-OPNc (Figura 5.12A, imagens A, B e C) ou com o ASO *scramble* (Figura 5.12A, imagens L, M e N). Nas células que foram transfectadas com o ASO anti-OPNc, observamos uma diminuição de aproximadamente 1,5X na intensidade total de fluorescência, em comparação àquelas transfectadas com o ASO *scramble* (Figura 5.12B), indicando diminuição da expressão proteica da OPNc nestas células.

Os dados acima foram corroborados quando quantificamos especificamente as células marcadas com o anticorpo anti-OPNc-FITC, em que também observamos uma menor intensidade média de fluorescência nas células transfectadas com o ASO anti-OPNc (Figura 5.12C, imagens A, B e C), em relação àquelas transfectadas com o ASO *scramble* (Figura 5.12C, imagens L, M e N).

Observamos que a expressão proteica da OPNc nas células RS4;11 é predominantemente citoplasmática, em torno do grande núcleo destas células (Figura 5.10). De forma a reforçar a observação de diminuição da proteína OPNc após transfecção dessas células com o ASO anti-OPNc, também analisamos a razão da intensidade de fluorescência dos núcleos marcadas com DAPI (fluorescência azul) sobre a intensidade de fluorescência das células marcadas com o anticorpo anti-OPNc-FITC (fluorescência verde) (Figura 5.12D). Denominamos esta razão de A(azul)/V(verde). Observamos que as células transfectadas com o ASO anti-OPNc apresentam maior razão A/V do que as células transfectadas com o ASO *scramble*, indicando um maior predomínio da intensidade marcação dos núcleos em relação ao citoplasma das células RS4;11 em que a OPNc encontra-se silenciada (Figura 5.12D).



**Figura 5.12 – Ensaio de imunofluorescência para análise da localização da expressão proteica da OPNc na linhagem celular RS4;11 após 36 h de silenciamento da OPNc.** A expressão proteica da OPNc na linhagem celular RS4;11 foi avaliada após a transfecção com 50 nM de ASOs anti-OPNc e sua respectiva sequência “*scramble*”, 36 h após a transfecção com os oligômeros. (A) A OPNc e o núcleo das células RS4;11 foram marcados com o anticorpo Chicken anti-Human Osteopontin conjugado ao FITC (marcação em verde, imagens A-C e L-N) e DAPI (marcação em azul, imagens D-F e O-Q). Imagens de co-marcação com FITC e DAPI também estão apresentadas (imagens G-I e R-T). A intensidade total dos três campos analisados (B) ou das células marcadas especificamente (C) foi quantificada e representadas nos gráficos de barras (D). As imagens J e U à esquerda foram apresentadas em *zoom*, sendo representativas das imagens analisadas para os cálculos das razões da fluorescência dos núcleos marcados com DAPI (azul-A) sobre a intensidade do citoplasma

celular marcado com FITC (verde); razão A/V. Os dados são representativos de três experimentos independentes. Pelo menos 50 células foram analisadas em cada experimento. As imagens foram adquiridas utilizando parâmetros idênticos. Barras: 10  $\mu$ m (A-T); mA captura das imagens foi realizada em microscópio confocal e as análises através do software Image J.

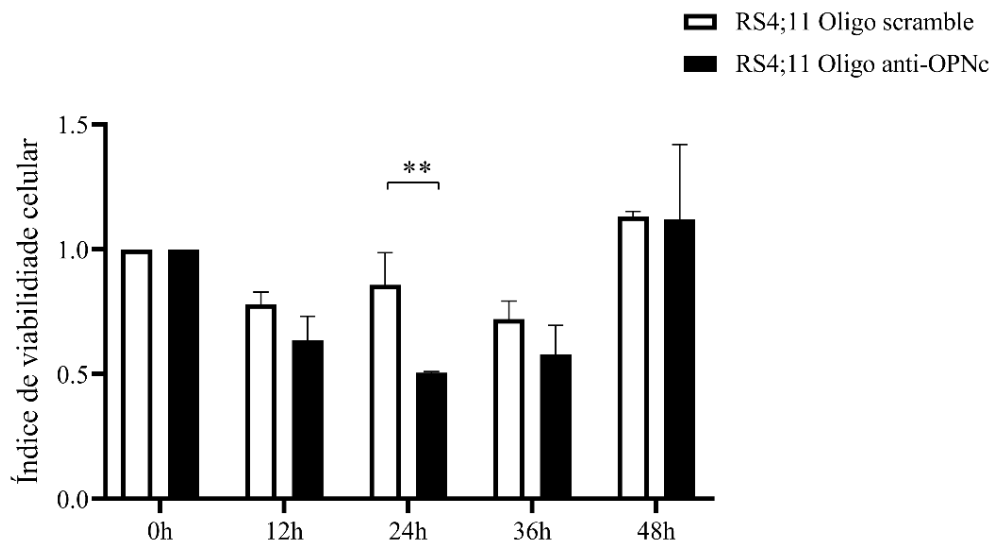
Esse conjunto de dados demonstra a eficiência do silenciamento da expressão da isoforma OPNc, em níveis transcricionais e proteicos, nas células RS4;11, após 36 h de transfecção com 50 nM de ASOs anti-OPNc. Após o estabelecimento destas condições de silenciamento da OPNc na linhagem celular RS4;11, seguimos para a realização dos ensaios funcionais de avaliação de diversos aspectos do comportamento e fenótipo destas células em resposta ao silenciamento desta isoforma.

Para facilitar a compreensão e análise dos resultados descritos a seguir, convencionamos que a linhagem celular RS4;11 que apresenta a OPNc silenciada será identificada como “RS4;11 Oligo anti-OPNc”. As células RS4;11 que foram transfectadas com a sequência Oligo *scramble* e que, portanto, expressam a OPNc a níveis transcricionais e proteicos, serão identificadas como “RS4;11 Oligo *scramble*”.

## **5.5) Ensaios funcionais para avaliação do efeito do silenciamento da OPNc na linhagem celular RS4;11**

### **5.5.1) O silenciamento da OPNc diminui a viabilidade das células RS4;11**

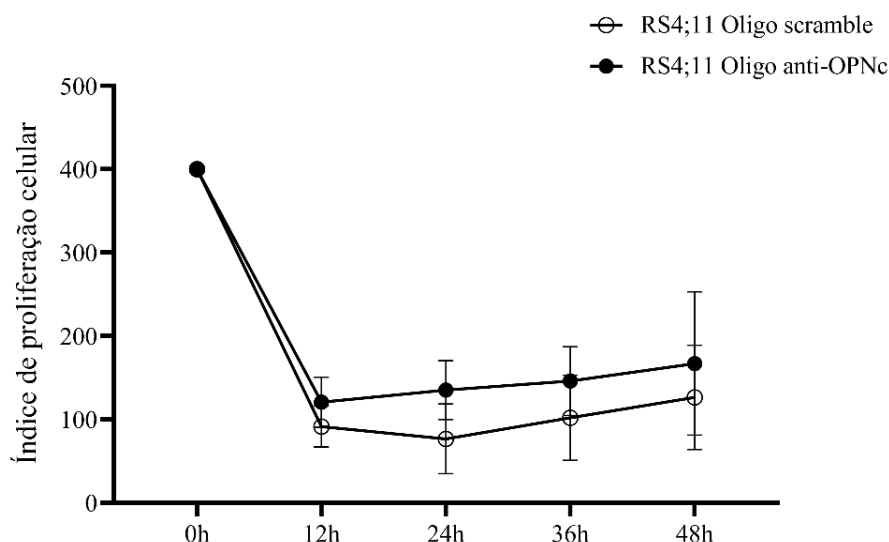
Para avaliar o efeito do silenciamento da OPNc na viabilidade das células RS4;11, realizamos o ensaio de MTT. Para esse ensaio, as células RS4;11 foram tratadas com MTT nos tempos de 0h, 12 h, 24 h, 36 h e 48 h após a transfecção com os oligômeros ASOs anti-OPNc ou *scramble*. Observamos que em todos os tempos avaliados, as células RS4;11 transfectadas com o ASO anti-OPNc apresentaram menor viabilidade celular que aquelas transfectadas com a sequência controle *scramble* (Figura 5.13). Esse efeito na redução da viabilidade celular após o silenciamento da OPNc ficou ainda mais evidente no tempo de 24 h após a transfecção com os oligômeros ( $p=0,009$ ).



**Figura 5.13 – Índice de viabilidade da linhagem celular RS4;11 após o silenciamento da da OPNc.** A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio por MTT, nos tempos de 0 h, 12 h, 24 h, 36 h e 48 h após a transfecção da linhagem celular RS4;11 com 50 nM de ASOs anti-OPNc e sua respectiva sequência *scramble*. Para a análise estatística empregou-se o Teste T *Student's*. A análise foi considerada significativa quando: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ . Os resultados apresentados foram realizados em quintuplicatas em três experimentos independentes.

### 5.5.2) O silenciamento da OPNc aumenta a proliferação das células RS4;11

Para melhor compreendermos o efeito do silenciamento da OPNc nas células RS4;11, realizamos o ensaio de proliferação celular por azul de tripan. Ao final dos tempos de 0 h, 12 h, 24 h, 36 h e 48 h após a transfecção, as células foram coradas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer. Ao longo de todos os tempos avaliados, as células RS4;11 em que a OPNc se mostrou silenciada apresentaram uma maior capacidade proliferativa, em comparação àquelas transfectadas com o ASO *scramble*. No tempo de 24h, houve maior taxa proliferativa nas células em que a OPNc se encontrava silenciada, quando comparado aos demais tempos testados (Figura 5.14).



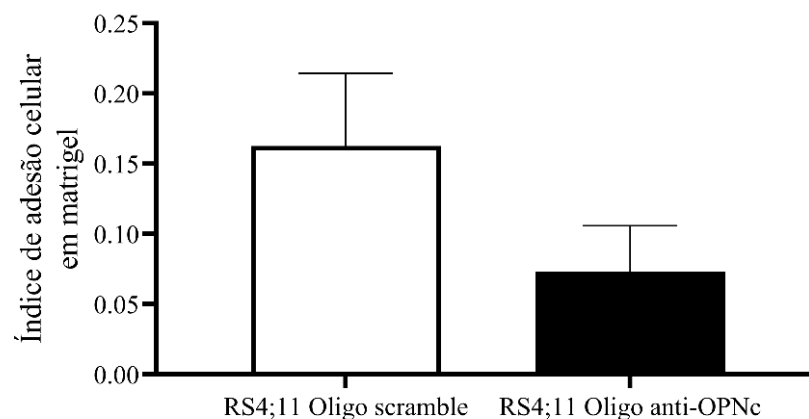
**Figura 5.14 – Índice de proliferação da linhagem celular RS4;11 em resposta ao silenciamento da OPNc na linhagem celular RS4;11.** A proliferação celular foi avaliada através do ensaio por Azul de tripan, nos tempos de 0 h , 12h, 24h, 36 h e 48 h após a transfecção da linhagem celular RS4;11 com 50 nM de ASOs anti-OPNc e sua respectiva sequência *scramble*. Para as análises estatísticas, empregou-se o Teste T *Student's*. Os resultados apresentados foram realizados em cinco experimentos independentes.

### 5.5.3) O silenciamento da OPNc diminui a capacidade de adesão células RS4;11

No nicho endosteal da MO a OPNt é capaz de ancorar blastos leucêmicos, colaborando diretamente para a adesão e estado quiescente dessas células (Boyerinas *et al.*, 2013), eventos celulares comumente observados na recaída da doença LLA-B. Desta forma, decidimos avaliar o possível envolvimento da OPNc no processo de adesão das células leucêmicas da linhagem RS4;11 sobre matrigel e sobre a matrix extracelular secretada por uma linhagem celular de osteoblastos.

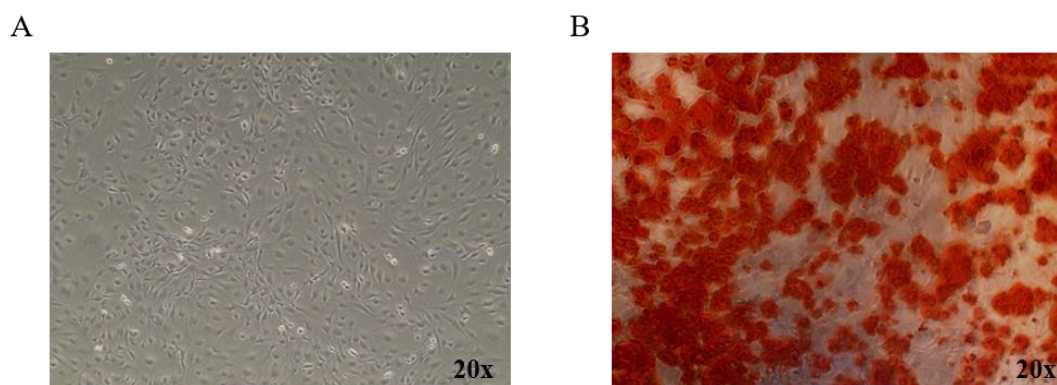
Após 36 h de transfecção com os ASOs anti-OPNc ou *scramble*, observamos que aquelas células em que a OPNc se apresentava silenciada, apresentaram uma menor capacidade de adesão em matrigel quando comparadas às células transfectadas com os ASOs *scramble* (Figura 5.15).





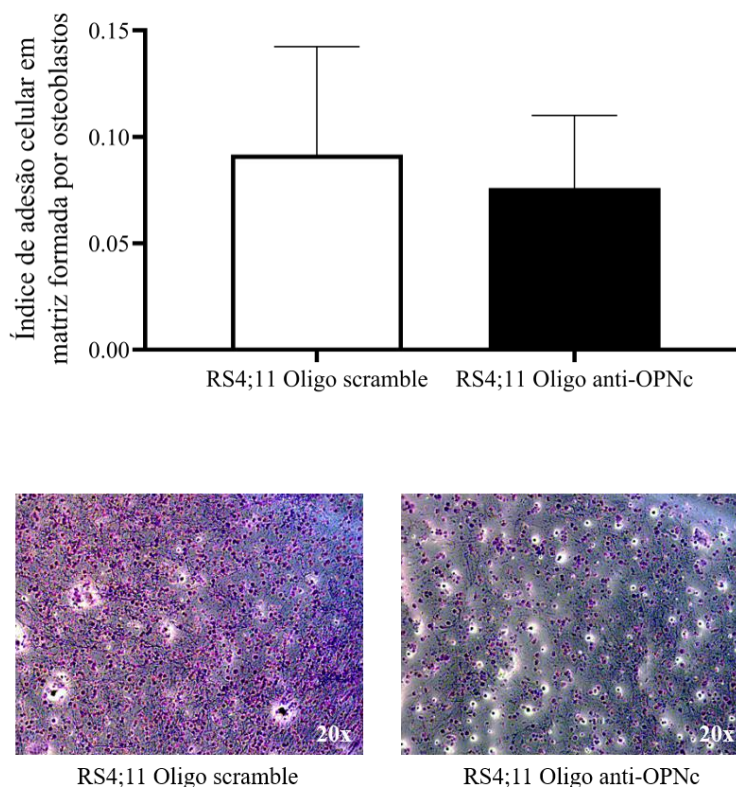
**Figura 5.15 – Índice de adesão da linhagem celular RS4;11 sobre matrigel em resposta ao silenciamento da OPNc.** A adesão celular sobre matrigel foi avaliada após a transfecção da linhagem celular RS4;11 com 50 nM de ASOs anti-OPNc e sua respectiva sequência *scramble*. Para a análise estatística empregou-se o Teste T *Student's*. Os resultados apresentados foram realizados em triplicatas em três experimentos independentes.

Com o objetivo de corroborar este resultado e mimetizar o microambiente da MO, onde células osteoblásticas estão presentes e secretam uma matriz extracelular, realizamos um protocolo similar de ensaio de adesão em que a matrigel foi substituída por uma matriz extracelular secretada por osteoblastos da linhagem celular MC3T3-E1 (Figura 5.16A). Cerca de 14 dias após o início da indução de formação da matriz extracelular oriunda de osteoblastos, observamos a formação desta matriz através do uso do corante *Alizarin Red*, o qual é capaz de se ligar a depósitos de cálcio presentes na matriz (YANG *et al.*, 2015). Assim, observamos que quanto mais intensa foi a cor vermelha observada, maior a quantidade de matriz secretada por estas células (Figura 5.16B).



**Figura 5.16 – Imagem da matriz extracelular secretada pela linhagem celular MC3T3-E1.** (A) A análise de linhagem celular MC3T3-E1 foi realizada através do microscópio de contraste de fase. (B) A análise da matriz extracelular da linhagem MC3T3-E1 corada com *Alizarin Red* foi realizada em microscópio de contraste de fase após 14 dias do início da indução para formação matriz. As duas imagens foram capturadas em um aumento de 20x.

Após a confirmação da formação de matriz extracelular secretada pelos osteoblastos da linhagem MC3T3-E1, estas células foram soltas da matriz, e sobre esta matriz remanescente foram plaqueadas as células da linhagem RS4;11 tranfectadas com os ASOs anti-OPNc ou *scramble*, seguido de avaliação da capacidade de adesão sobre a matriz. As células RS4;11 foram plaqueadas após 36 h de transfecção e incubadas sobre a matriz extracelular durante 12 h em estufa a 37°C. Células RS4;11 tranfectadas com os ASOs anti-OPNc apresentaram uma menor capacidade de adesão à matriz extracelular do que àquelas tranfectadas com os ASOs *scramble* (Figura 5.17). Em conjunto, esses dados sugerem que a diminuição da expressão da OPNc, em níveis transcricionais e proteicos, diminui a capacidade adesiva das células leucêmicas no microambiente da MO.

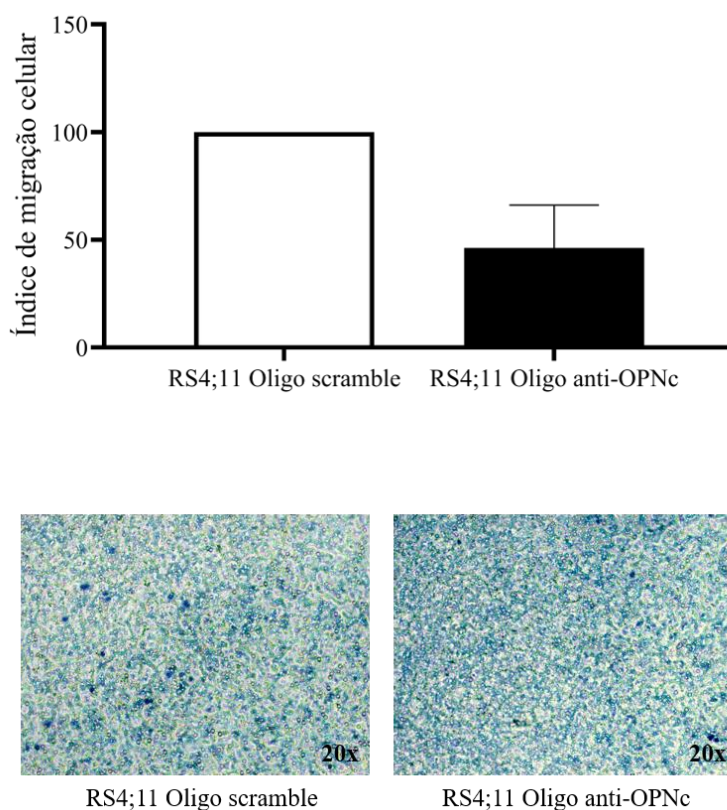


**Figura 5.17 – Índice de adesão celular à matriz extracelular secretada pelos osteoblastos da linhagem celular MC3T3-E1 em resposta ao silenciamento da OPNc.** A adesão celular sobre a matriz extracelular secretada por osteoblastos foi avaliada após a transfecção da linhagem celular RS4;11 com 50 nM de ASOs anti-OPNc e sua respectiva sequência *scramble*. Para a análise estatística empregou-se o Teste T *Student's*. Os resultados apresentados foram realizados em triplicatas em três experimentos independentes. As imagens foram capturadas em microscópio de contraste de fase em um aumento de 20x.

#### 5.5.4) O silenciamento da OPNc diminui a capacidade de migração e invasão das células RS4;11

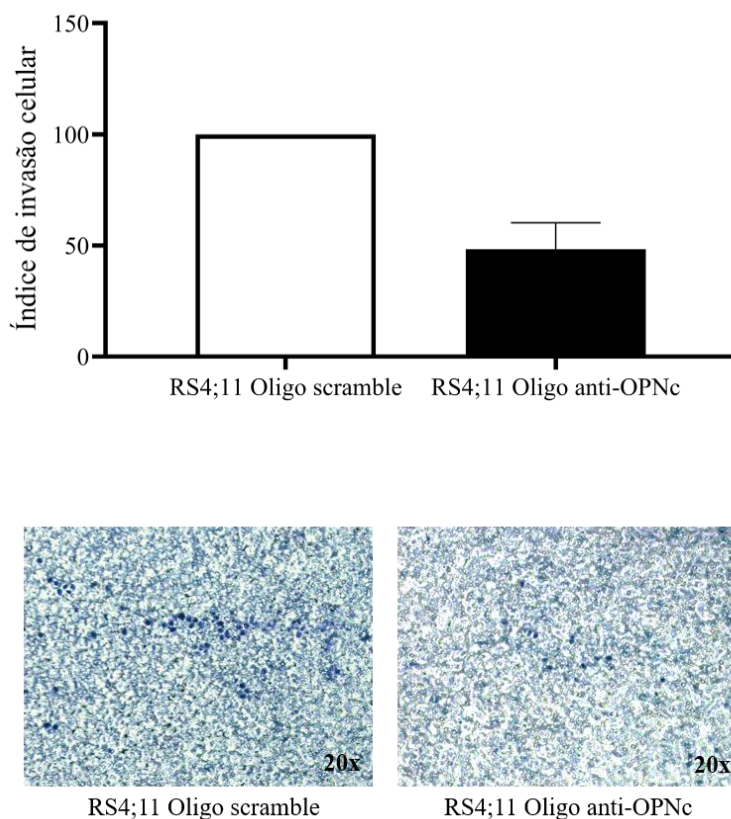
A OPNc já se mostrou superexpressa em células leucêmicas envolvidas no acometimento do SNC em LLA-B. Assim, foi proposto que esta proteína possa colaborar no processo de migração e invasão dessas células para ambiente extramedulares (VAN DER VELDEN *et al.*, 2016; SANTORO *et al.*, 2019). Com base nessas evidências, buscamos entender se a OPNc poderia estar envolvida nesses dois processos. Para tal, as células RS4;11 foram plaqueadas em câmara *Transwell* após 36 h de transfecção com os ASOs anti-OPNc ou *scramble*, na presença (ensaio de invasão) ou ausência de matrigel (ensaio de transmigração).

No ensaio de transmigração, observamos que as células RS4;11 em que a OPNc foi silenciada apresentaram uma menor capacidade migratória que as células RS4;11 transfectadas com os ASOs *scramble* (Figura 5.18).



**Figura 5.18 – Índice de migração da linhagem celular RS4;11 após o silenciamento da da OPNc.** A migração foi avaliada em câmara *Transwell* após a transfecção da linhagem celular RS4;11 com 50 nM de ASOs anti-OPNc e sua respectiva sequência *scramble*. As células que migraram através dos poros da membrana da câmara *Transwell* foram coradas com patóptico e analisadas em microscópio de contraste de fase. Para a análise estatística empregou-se o Teste T *Student's*. Os resultados apresentados foram realizados em três experimentos independentes. As imagens das membranas das câmaras foram capturadas em microscópio de contraste de fase em um aumento de 20x.

No ensaio de invasão, as células RS4;11 em que a OPNc estava silenciada apresentaram uma diminuição na capacidade invasiva quando comparadas as células RS4;11 em que a OPNc estava sendo expressa. Esse conjunto de dados nos sugere que a OPNc pode estar envolvida no processo de migração e invasão das células leucêmicas para ambientes extramedulares (Figura 5.19).



**Figura 5.19 – Índice de invasão da linhagem celular RS4;11 após o silenciamento da OPNc.** A invasão foi avaliada em câmara Transwell na presença de matrigel após a transfecção da linhagem celular RS4;11 com 50 nM de ASOs anti-OPNc e sua respectiva sequência *scramble*. As células que invadiram a barreira de matrigel e os poros da membrana da câmara Transwell foram coradas com patóptico e analisadas em microscópio de contraste de fase. Para a análise estatística empregou-se o Teste T *Student's*. Os resultados apresentados foram realizados em três experimentos distintos. As imagens das membranas das câmaras foram capturadas em microscópio de contraste de fase em um aumento de 20x.

## 6) DISCUSSÃO

As variantes de *splicing* da OPN têm sido descritas como importantes biomarcadores e potenciais alvos terapêuticos em diferentes tipos de tumores sólidos (GIMBA & TILLI, 2013). No entanto, todos os dados obtidos até o momento em LLA, se referem apenas ao da OPNt, ou seja, a soma de todas as isoformas, sejam aquelas geradas a partir de mecanismos pós-traducionais ou pós-transcricionais (BASTOS *et al.*, 2017). Considerando a expressão alterada das isoformas de *splicing* da OPN e seus papéis tecido e tumor específicos (HAO *et al.*, 2017), avaliar os seus perfis de expressão, assim como seus potenciais papéis enquanto biomarcadores ou novos potenciais alvos terapêuticos nas leucemias, é de grande importância. Sendo assim, de forma a buscar entender a contribuição das isoformas de *splicing* da OPN na leucemogênese, no presente estudo elucidamos o perfil de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc e os possíveis papéis funcionais da OPNc na LLA-B.

Neste contexto, inicialmente avaliamos o perfil de expressão transcricional destas três isoformas da OPN em uma série de pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-B, disponíveis no banco de dados TARGET, independentemente das alterações genéticas que eles apresentavam. Utilizamos essa estratégia para avaliarmos se tais isoformas eram expressas em amostras de pacientes com LLA, já que até o momento estes dados não haviam sido descritos na literatura. Nesta análise, observamos que a maioria dos pacientes com LLA-B expressavam as três isoformas da OPN (47%), enquanto 32% expressavam apenas duas isoformas, 17% apenas uma delas e os 4% restantes não expressavam nenhuma das três isoformas analisadas. As três isoformas da OPN também apresentaram diferentes níveis de expressão transcricional nesta série de casos. Estes dados também já haviam sido relatados por nosso grupo de pesquisa e também por outros que, em diversos modelos tumorais, os perfis e a frequência de expressão transcricional das isoformas da OPN são variáveis, como no câncer de ovário (TILLI *et al.*, 2011), de próstata (TILLI *et al.*, 2012b), de pulmão (SUN *et al.*, 2016), tireóide (FERREIRA *et al.*, 2016a; FERREIRA *et al.*, 2016b), mama (ZDUNIAK *et al.*, 2015), gliomas (YAN *et al.*, 2010) e carcinoma hepatocelular (CHAE *et al.*, 2009). Nesta série de casos do TARGET, as amostras de pacientes em que havia acometimento do SNC pelos blastos leucêmicos apresentaram maior nível de expressão transcricional das três isoformas avaliadas. Estes resultados nos fizeram levantar a hipótese de que as isoformas da OPN poderiam estar diferencialmente envolvidas no mecanismo de acometimento de sítios extramedulares por células leucêmicas na LLA-B, relação que até o momento só havia sido descrita com relação à OPNt (VAN DER VELDEN *et al.*, 2016). Contudo, esta série de casos

analisada apresentava a limitação de ser composta por pacientes submetidos a distintos protocolos terapêuticos e com distintas alterações moleculares.

Com a finalidade de validar estes primeiros achados, em seguida utilizamos uma série de casos pediátricos diagnosticados com LLA-B provenientes do INCA. Uma vez que nossa hipótese era de que as isoformas de *splicing* OPNa, OPNb e OPNc poderiam estar diferencialmente envolvidas no processo de acometimento de sítios extramedulares, como o SNC, o modelo experimental escolhido para realizar esta investigação foi o de comparar o perfil de expressão transcricional destas variantes de *splicing* da OPN entre um grupo de pacientes pediátricos com LLA-B contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1* (caracteristicamente de mau prognóstico) com um grupo de comparação que apresenta a fusão gênica *ETV6-RUNX1* (grupo de bom prognóstico). A escolha do grupo que continha a fusão *KMT2A-AFF1* foi realizada baseando-se no que já havia sido descrito na literatura que pacientes pediátricos contendo esta fusão apresentavam maiores chances de recaída e acometimento de sítios extramedulares (PUI, 2000; SCHRAPPE, 2008; MOORMAN, 2012). Além disto, é premente a disponibilidade de novos alvos terapêuticos ou biomarcadores que sejam capazes de prever, no momento do diagnóstico, a possibilidade de recaída ou de acometimento de sítios extramedulares para este grupo de pacientes (VAN DER VELDEN *et al.*, 2016; LENK; ALSADEQ; SCHEWE, 2020). A disponibilidade destes biomarcadores permitiria uma melhor estratificação destes pacientes, evitando que muitos fossem submetidos a um tratamento quimioterápico intensivo, causador de graves sequelas como deficiências neurocognitivas ou neoplasias secundárias, como tem sido amplamente reportado na literatura (PUI & HOWARD, 2008; CHEUNG *et al.*, 2018).

Já a escolha do grupo de comparação, de pacientes que apresentavam a fusão gênica *ETV6-RUNX1* foi feita baseando-se no fato de que esta fusão gênica na maioria dos casos está associada a um bom prognóstico na LLA-B, com menores chances de recaídas e acometimento de sítios extramedulares (MOORMAN, 2012). Sendo assim, corresponde a um grupo de pacientes com características clínicas opostas àqueles contendo a fusão *KMT2A-AFF1*.

Nossos dados mostraram que a maioria dos pacientes contendo as fusões *KMT2A-AFF1* ou *ETV6-RUNX1* apresentaram a expressão transcricional das três isoformas da OPN analisadas. Estes dados corroboram com aqueles observados nos pacientes pediátricos com dados disponíveis no TARGET, em que independentemente da alteração genética e molecular que apresentavam, a maioria expressou as três isoformas da OPN. Por outro lado, observamos que no grupo contendo a fusão *KMT2A-AFF1*, todos os pacientes expressavam pelo menos uma isoforma da OPN, enquanto no grupo contendo a fusão *ETV6-RUNX1* observamos que

7% dos pacientes não expressava nenhuma das três isoformas analisadas. Esses achados estão de acordo com os dados da literatura, em que as isoformas da OPN apresentam diferentes frequências de expressão transcricional, contribuindo de distintas maneiras para a progressão de distintos tumores (GIMBA & TILLI, 2013; HAO *et al.*, 2017).

Nossos achados também demonstraram que os níveis de expressão transcricional das três isoformas da OPN analisadas são distintos entre os grupos contendo as fusões *KMT2A-AFF1* ou *ETV6-RUNX1*. Nos pacientes contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1*, a isoforma OPNc mostrou-se superexpressa em relação à OPNa e a OPNb. Já naqueles que apresentavam a fusão *ETV6-RUNX1*, a isoforma OPNa foi a que se mostrou superexpressa em comparação às duas demais variantes analisadas. Estes achados reforçam dados prévios em que se demonstrou que isoformas da OPN apresentam diferentes perfis de expressão transcricional entre grupos de pacientes com diferentes prognósticos. No câncer de mama, por exemplo, Hao e colaboradores demonstraram que níveis elevados da OPNc estão associados a uma menor sobrevida global dos pacientes (HAO *et al.*, 2016).

Esse conjunto de dados também nos levaram a pensar em uma possível relação entre a superexpressão das diferentes isoformas da OPN com a presença das fusões gênicas analisadas. Hickey e colaboradores demonstraram que a OPNt é superexpressa em amostras que apresentam a fusão gênica *BCR-ABL1*, associada a um prognóstico desfavorável na LLA e na LMC (HICKEY; ENGLAND; COTTER, 2005). Neste trabalho, os autores também demonstraram que a fusão *BCR-ABL1* ativa uma via de sinalização que envolve as proteínas RAS, PI3K, aPKC, RAF-1 e MEK, que por sua vez medeiam a superexpressão da OPNt, demonstrando a associação entre a presença de um gene fusionado e a expressão proteica da OPNt (HICKEY; ENGLAND; COTTER, 2005).

Nosso estudo demonstrou também que a variante OPNa estava superexpressa no grupo de pacientes contendo a fusão *ETV6-RUNX1*, quando comparado aqueles que continham a fusão *KMT2A-AFF1*. A superexpressão da OPNa também já foi observada em outros modelos tumorais, como: carcinoma papilar da tireoide (FERREIRA *et al.*, 2016b), carcinoma medular da tireoide (FERREIRA *et al.*, 2016a) e câncer de pulmão de não pequenas células (GOPARAJU *et al.*, 2010), apresentando diferentes funções em cada um desses modelos tumorais citados. A alta expressão transcricional da OPNa em carcinoma medular da tireoide foi associada ao bom prognóstico dos pacientes (menor tamanho de tumor, alta expressão proteica de PTEN nuclear e ausência da mutação do RAS) (FERREIRA *et al.*, 2016a). Nesse estudo, uma linhagem celular de carcinoma medular da tireoide que superexpressava a OPNa apresentou redução significativa da sua capacidade proliferativa e viabilidade, demonstrando que essa isoforma pode contribuir para a prevenção da progressão desse tumor (FERREIRA *et*



*al.*, 2016a). Esses achados estão de acordo com o que observamos na série de casos utilizados como grupo comparativo do estudo, demonstrando uma possível relação existente entre a superexpressão da OPNa em células leucêmicas e características de prognóstico favorável. Por outro lado, outros estudos demonstraram um papel oposto da OPNa como no carcinoma papilar da tireoide (FERREIRA *et al.*, 2016b). Nesse modelo tumoral, foi observado que a superexpressão da OPNa está associada a tumores maiores, invasão vascular, extensão extratireoideia e mutação do *BRAFV600E*, contribuindo para um comportamento mais agressivo da doença. (FERREIRA *et al.*, 2016b). Outro estudo desenvolvido por Goparaju e colaboradores, também demonstrou um papel potencializador da agressividade tumoral promovido pela OPNa no câncer de pulmão de não pequenas células. Nesses achados, a OPNa mostrou-se superexpressa e associada a um aumento da capacidade proliferativa, migratória e invasiva dessas células tumorais (GOPARAJU *et al.*, 2010).

Conforme demonstrado no presente estudo, no grupo de pacientes contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1*, a isoforma OPNc apresentou-se superexpressa em relação às demais isoformas. De maneira similar, a superexpressão da OPNc já foi observada em outros modelos tumorais, como no câncer de próstata (TILLI *et al.*, 2012b), de mama (MIRZA *et al.*, 2008) e de ovário (TILLI *et al.*, 2011). No câncer de próstata, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a OPNc está associada ao aumento da capacidade proliferativa, migratória e da sobrevivência de linhagens celulares de câncer de próstata mediante a ativação da via de PI3K (TILLI *et al.*, 2012b), como também relacionada às características de mau prognóstico (TILLI *et al.*, 2012a). Já no modelo de câncer de ovário, outro estudo realizado por nosso grupo, demonstrou que a OPNc está relacionada a um fenótipo mais agressivo desta doença (TILLI *et al.*, 2011).

Neste estudo, a expressão transcricional desta isoforma foi associada a um aumento da proliferação, migração, invasão, sobrevivência e formação de colônias pelas células de câncer de ovário, através das vias de sinalização envolvendo as proteínas PI3K, AKT (TILLI *et al.*, 2011). Pang e colaboradores também observaram no câncer de mama que a superexpressão da OPNc prediz um fenótipo mais agressivo e um pior prognóstico da doença, uma vez que está associada a uma menor sobrevida livre de doenças e menor sobrevida global (PANG *et al.*, 2013). Em contrapartida, quando Goparaju e colaboradores superexpressaram a OPNc em células de câncer de pulmão, estas tiveram sua capacidade proliferativa, migratória e invasiva diminuídas, comprovando mais uma vez o papel tecido-tumor específico das isoformas da OPN (GOPARAJU *et al.*, 2010).

A razão pela qual essas isoformas da OPN apresentam um perfil de expressão e papéis tecido-tumor específicos contribuindo de maneiras distintas para um melhor ou pior



prognóstico, permanecem desconhecidas. Porém, a hipótese é de que as modificações pós transcricionais e pós traducionais ocorridas nessas variantes de *splicing* impactam em sua estrutura, influenciando sua interação com outras proteínas como também em suas funções. Estudos desenvolvidos por nosso grupo, demonstraram que existem sítios de fosforilação nos resíduos de aminoácidos de serina, tirosina e treonina nas regiões entre os éxons 3 e 6 da OPN. Desta maneira, com a deleção do éxon 4 na OPNc, seu padrão de fosforilação é modificado em relação a isoforma completa OPNa, modificando assim seus papéis e a maneira como interagem com outras proteínas e seus receptores (GIMBA & TILLI, 2013). Com a perda do éxon 4, a OPNc também perde seu domínio transglutaminase, tornando-se mais solúvel e com menor capacidade de formar complexos poliméricos. Os padrões de polimerização variam de acordo com cada tipo celular, o que pode justificar os diferentes papéis da OPNc em diferentes modelos tumorais (ANBORGH *et al.*, 2011). Além disto, o éxon 4 é uma região rica em prolina (GIMBA & TILLI, 2013), que apresenta um importante papel estrutural como também na interação proteína-proteína o que é essencial para determinar sua função como também os processos de sinalização celular (MATEOS *et al.*, 2019). Esses dados em conjunto nos permitem pensar que a perda do éxon 4 pode promover uma modificação estrutural e conseqüentemente funcional da OPNc em comparação não apenas a OPNa, como também com as demais isoformas de *splicing* da OPN.

Uma vez que a OPNc mostrou-se superexpressa no grupo de pacientes com *KMT2A-AFF1*, associamos a expressão transcricional da OPNc com características de risco prognóstico na LLA de acordo com os critérios estabelecidos pelo NCI e o acometimento do SNC. Nesta análise, observamos que pacientes classificados como alto risco prognóstico apresentaram maior nível de expressão transcricional da OPNc. Os pacientes com acometimento do SNC por blastos leucêmicos também apresentaram maior nível de expressão transcricional da OPNc, quando comparados àqueles sem acometimento. Esta seria a primeira evidência de que, dentre as diversas variantes da OPN, esta isoforma poderia servir como um biomarcador capaz de prever o acometimento desse sítio extramedular na LLA-B. Em consonância com estes achados, Incesoy-Özdemir e colaboradores já haviam observado elevados níveis de expressão proteica da OPNt no fluido cérebro espinhal de pacientes pediátricos ao diagnóstico que posteriormente apresentaram acometimento do SNC (INCESY-ÖZDEMİR *et al.*, 2013). Posteriormente, outros autores evidenciaram a existência de uma subpopulação de células B presentes na MO com elevados níveis de expressão proteica da OPNt em pacientes diagnosticados com LLA-B, os quais apresentaram recaída da doença no SNC (VAN DER VELDEN *et al.*, 2016). Apesar da limitação de utilizar uma série de casos com pequeno número amostral, comprometendo o poder estatístico, nossos

dados nos levaram a hipotetizar que a OPNc poderia estar envolvida no mecanismo de acometimento do SNC por blastos leucêmicos na LLA-B. Assim, a OPNc poderia ser um potencial alvo para o qual estratégias direcionadas poderiam ser desenhadas para fins terapêuticos.

Com base no perfil de superexpressão da OPNc e sua associação com características de risco prognóstico desfavoráveis nos pacientes com LLA-B com *KMT2A-AFF1*, seguimos nosso estudo com o objetivo de elucidar o papel funcional desta isoforma de *splicing* neste tipo de leucemia.

Assim, estabelecemos um modelo *in vitro* para a realização dos ensaios funcionais. Avaliamos o perfil de expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc na linhagem celular RS4;11 de LLA-B, a qual apresenta a fusão gênica *KMT2A-AFF1*. Observamos que esta linhagem celular expressava as três isoformas avaliadas neste estudo e que a OPNb e a OPNc apresentaram maiores médias de expressão transcricional que a OPNa. Em seguida, avaliamos a expressão em níveis proteicos da OPNc nesta linhagem celular e observamos um predomínio da OPNc no citoplasma em torno do núcleo das células desta linhagem celular. Estes achados reforçaram a escolha da linhagem celular RS4;11 como um modelo experimental para nosso estudo, dada a presença da fusão gênica *KMT2A-AFF1* e a expressão em níveis transcricionais e proteicos da OPNc.

Como abordagem para elucidar o papel funcional da OPNc na linhagem celular representativa de uma LLA-B contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1*, escolhemos o a abordagem de silenciamento gênico, através do uso de ASOs anti-OPNc. Os ASOs utilizados haviam sido desenhados e sintetizados especificamente para a OPNc e testados pelo nosso grupo de pesquisa em outros modelos tumorais (BRUM, 2018). Nesta abordagem, observamos que a transfecção da linhagem celular RS4;11 com 50nM de ASOs anti-OPNc no tempo de 36 h apresentou uma melhor eficiência na redução dos níveis transcricionais da OPNc que o tempo de 48 h. É possível que a expressão transcricional da OPNc tenha novamente aumentado no tempo de 48h devido ao fato da transfecção não ter sido uma abordagem estável, como já descrito em outros estudos com o uso de ASOs (DIAS *et al.*, 2002). Isso acontece porque os ASOs são incorporados na célula e ligam-se especificamente ao RNAm alvo degradando-o através da ação da RNase H. Posteriormente, esses oligômeros são rapidamente degradados por endonucleases presentes nas células, permitindo com o que o silenciamento do gene alvo aconteça apenas durante determinado período de tempo e logo volte a ser expresso pela célula (KOLE; KRAINER; AKOLLMAN, 2012) . De forma a validar o silenciamento dos níveis transcricionais de expressão da OPNc, também observamos o silenciamento desta isoforma em níveis proteicos com o uso de 50nM de ASOs anti-OPNc,

no tempo de 36h após a transfecção através de ensaios por RT-qPCR. Uma vez padronizada a abordagem de silenciamento da OPNc na linhagem celular RS4;11, o passo seguinte na caracterização de seu papel funcional foi avaliar os efeitos celulares e moleculares mediante a diminuição de sua expressão em níveis transcricionais e proteicos.

As células RS4;11 em que a OPNc estava silenciada apresentaram uma redução em sua viabilidade celular ao longo do tempo, quando comparadas àquelas em que a OPNc estava sendo expressa em maiores níveis. Esse dado nos sugere que a OPNc pode estar envolvida em vias de sobrevivência de células leucêmicas, como já foi demonstrado em um trabalho desenvolvido por nosso grupo de pesquisa em células de LLA-B que não apresentavam nenhuma fusão gênica (SANTORO *et al.*, 2019). Neste trabalho, a linhagem 207, após ser tratada com vincristina e etoposídeo, apresentou um aumento do nível de expressão transcricional da OPNc quando comparada às células sem tratamento com estes quimioterápicos. Quando a OPNc foi silenciada nessas células, as mesmas tornaram-se mais sensíveis ao tratamento com esses compostos, com uma redução significativa de sua viabilidade, quando comparadas as células em que a OPNc estava em maiores níveis, evidenciando o papel desta isoforma na viabilidade da linhagem 207 (SANTORO *et al.*, 2019). Outros estudos a respeito da OPNt na LMA também demonstraram que esta proteína estava envolvida na capacidade das células em sobreviverem à tratamentos quimioterápicos, mediante a ativação de vias de sinalização envolvendo as proteínas AKT, mTOR, PTEN e  $\beta$ -catenina. Com o silenciamento da OPNt, as células leucêmicas se tornaram mais sensíveis ao tratamento e foram induzidas a morte por apoptose (ZAHEDPANAHI *et al.*, 2016). Um resultado similar foi demonstrado por Mohammadi e colaboradores quando trataram células de LMA com quimioterápicos e observaram que mediante o tratamento as células começaram a superexpressar a OPNt quando comparadas àquelas células sem tratamento, destacando uma possível relação entre a superexpressão desta proteína e a quimioresistência. Essas mesmas células quando tiveram a OPNt silenciada, apresentaram uma maior suscetibilidade ao tratamento com partenólídeo (MOHAMMADI *et al.*, 2017). Já em tumores sólidos, como o de mama e de ovário, foi observado por nosso grupo de pesquisa que quando a OPNc se encontra silenciada nessas células, as mesmas tornam-se mais sensíveis ao tratamento com doxorubicina e cisplatina (BRUM, 2018). Em conjunto, estes dados evidenciam um importante papel da isoforma OPNc na manutenção da viabilidade das células tumorais, característica chave do processo de resistência e manutenção do fenótipo tumoral.

No presente estudo também avaliamos a proliferação das células RS4;11 ao longo do tempo e observamos que mediante o silenciamento da OPNc essas células apresentaram um aumento de sua capacidade proliferativa quando comparadas àquelas em que a OPNc estava

sendo expressa. Este resultado está de acordo com o que já foi visto por Nilsson e colaboradores sobre o papel da OPNt no nicho endosteal da MO. Como demonstrado por esses autores, no nicho endosteal da MO, a OPNt atua como um regulador negativo da proliferação das células-tronco hematopoiéticas, fenômeno este que não se deve a indução dessas células à apoptose. Quando as células-tronco hematopoiéticas apresentam a OPNt silenciada, sua capacidade proliferativa é aumentada e o número de células ativas no ciclo celular torna-se maior. Esses dados mostram um importante papel fisiológico da OPNt na regulação da localização das células-tronco hematopoiéticas na MO como também na sua capacidade proliferativa (NILSSON *et al.*, 2005). Por outro lado, conforme demonstrado por nosso grupo de pesquisa, em tumores sólidos, como no câncer de próstata e de ovário (TILLI *et al.*, 2011, 2012b), a isoforma OPNc estimulou a capacidade proliferativa das células tumorais por meio de vias de sinalização envolvendo a proteína PI3K, mostrando um papel oposto ao que observamos sobre esta isoforma na linhagem de LLA-B contendo *KMT2A-AFF1* no presente estudo.

Um dos principais mecanismos relacionados a recaída nas leucemias, é a capacidade das células leucêmicas em se manterem aderidas e dormentes no nicho endosteal da MO. Dessa maneira, essas células não ficam ativas no ciclo celular, escapando assim de serem sensibilizadas pela ação dos quimioterápicos (SAITO *et al.*, 2010). Boyerinas e colaboradores demonstraram que na LLA, a OPNt serve como “âncora” para as células leucêmicas se aderirem ao nicho endosteal da MO, auxiliando na manutenção do estado dormente dessas células e conseqüentemente permitindo que as mesmas sobrevivam ao tratamento com quimioterápicos (BOYERINAS *et al.*, 2013). Outro estudo desenvolvido por Marroquin e colaboradores, demonstrou que o aumento da capacidade de adesão das células leucêmicas é mediado pela interação entre a OPNt e o receptor CD44 (MARROQUIN *et al.*, 2004). Com base nesses dados descritos na literatura, decidimos avaliar a capacidade das células RS4;11 em se aderirem à matrigel mediante o silenciamento da OPNc, para assim entendermos o possível papel desta isoforma neste processo. Nossos dados demonstraram que as células RS4;11 em que a OPNc estava silenciada apresentaram uma diminuição da capacidade de se aderirem à matrigel, quando comparadas àquelas em que a OPNc estava expressa em maiores níveis, corroborando o que já havia sido descrito a respeito da OPNt.

Até o presente momento, existem poucas informações sobre como as células leucêmicas conseguem alterar o nicho da MO, tornando-o um ambiente permissivo para a sua sobrevivência e evasão ao tratamento com quimioterápicos. Entretanto, uma vez demonstrado que a OPNt desempenha um papel importante na regulação do microambiente da MO, por ser uma citocina e atuar como fator atrativo para que as células-tronco hematopoiéticas

permaneçam retidas neste nicho (HAYLOCK; NILSSON, 2006), é esperado que suas isoformas de *splicing* também estejam envolvidas nesse processo e na manutenção da leucemogênese na MO, hipótese esta que pode ser corroborada com nossos achados relativos ao papel da OPNc na modulação da viabilidade, adesão e proliferação celular.

Com a finalidade de melhor compreender o possível envolvimento da isoforma OPNc nesse mecanismo e mimetizar *in vitro* o microambiente da MO, após o silenciamento da OPNc, também avaliamos a capacidade das células RS4;11 em se aderir na matriz extracelular formada por osteoblastos da linhagem celular MC3T3-E1. Os osteoblastos são células com importantes funções no nicho endosteal da MO, executando um importante papel na regulação das células-tronco hematopoiéticas normais, estimulando sua expansão, mobilização e regulando a manutenção de sua quiescência. Também são responsáveis pela síntese do tecido ósseo e regulação da angiogênese na MO, sendo assim importantes na manutenção deste microambiente (ZHANG *et al.*, 2003; RAAIJMAKERS *et al.*, 2010; SHAFAT *et al.*, 2017). A análise da adesão nesta matriz nos permitiu testar esta propriedade das células de LLA-B contendo a fusão *KMT2A-AFF1* de se aderirem a uma matriz mais similar ao ambiente da MO. Neste experimento, observamos que as células RS4;11 em que a OPNc estava silenciada apresentaram uma diminuição da capacidade de adesão à matriz extracelular formada por osteoblastos quando comparadas àquelas em que a OPNc estava expressa em maiores níveis. Comparando os resultados obtidos do ensaio de adesão em matrigel com o ensaio de adesão em matriz formada por osteoblastos, observamos que as células RS4;11 em que a OPNc estava silenciada apresentaram uma maior capacidade de adesão na matriz formada por osteoblastos do que na matrigel. Esse dado poderia ser explicado pela conhecida expressão proteica elevada da OPNt na matriz extracelular formada por osteoblastos, cujas células são a principal fonte secretora de OPNt no nicho da MO (HAYLOCK & NILSSON, 2006). Em tumores sólidos também já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa que a OPNc pode atuar aumentando a capacidade adesiva das células tumorais. Observamos que o meio condicionado secretado por células tumorais células de câncer de próstata e de ovário que superexpressavam a OPNc era capaz de induzir um aumento da capacidade de células endoteliais humanas (HUVEC) em se aderir a um substrato (TILLI *et al.*, 2014). Em conjunto, estes dados corroboram nossos achados que sugerem que a OPNc estaria envolvida no processo de adesão das células leucêmicas de LLA-B contendo a fusão *KMT2A-AFF1*.

A habilidade de atravessar a barreira hematoencefálica é uma característica comum das células LLA-B, principalmente no grupo de pacientes *KMT2A-AFF1*, o qual apresenta elevada taxa de acometimento de sítios extramedulares, sendo o SNC o principal (WINTERS;

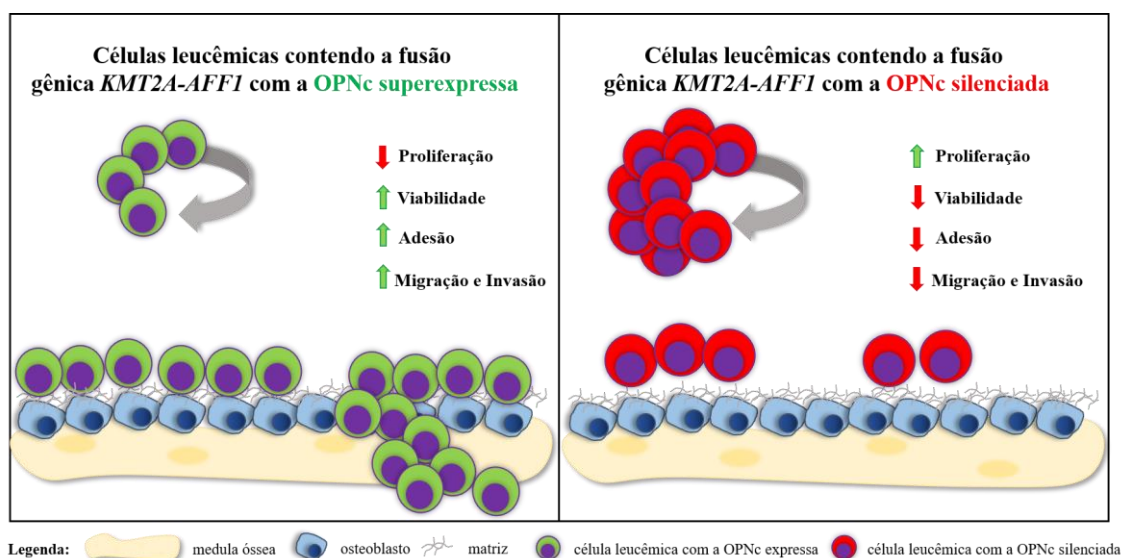
BERNT, 2017; LOPEZ-MILLAN *et al.*, 2019). Embora até o momento nenhum estudo tenha elucidado os mecanismos pelos quais a OPNt possa atuar no processo de acometimento de sítios extramedulares, alguns autores já demonstraram que nas leucemias pediátricas, elevados níveis de OPNt no fluido cérebro espinhal ou na MO dos pacientes, estão correlacionados com o posterior acometimento do SNC por blastos leucêmicos (FANG *et al.*, 2013; INCESoy-ÖZDEMIR *et al.*, 2013; VAN DER VELDEN *et al.*, 2016).

Com base nesses dados, buscamos entender se a isoforma OPNc poderia estar envolvida na indução da capacidade migratória e invasiva das células leucêmicas LLA-B contendo a fusão *KMT2A-AFF1*. Nossos resultados mostraram que as células RS4;11 em que a OPNc estava silenciada, tiveram uma redução da sua capacidade migratória e invasiva quando comparadas às células RS4;11 em que a OPNc estava expressa em maiores níveis. Estes achados evidenciam uma possível relação existente entre a isoforma OPNc e a capacidade das células em migrarem e invadirem outros sítios, como o SNC. Também em consonância com esses achados, estudos de nosso grupo de pesquisa demonstraram um importante papel da OPNc no aumento da capacidade migratória e invasiva das células de câncer de ovário. Em resposta a superexpressão da OPNc por essas células, também ocorreu o aumento da expressão transcricional de VEGF e metaloproteinases de matriz, como MMP2 e MMP9, associadas ao potencial metastático das células de câncer de ovário (TILLI *et al.*, 2011). No modelo de células de câncer de próstata, nosso grupo também demonstrou um aumento da capacidade migratória e invasiva das células tumorais mediante a superexpressão da OPNc, através da via de sinalização envolvendo a PI3K (TILLI *et al.*, 2012b). Adicionalmente, Yan e colaboradores demonstraram que a OPNc estava envolvida na capacidade invasiva de células de glioma, através da ativação de vias de sinalizações envolvendo PI3K, AKT, NF- $\kappa$ B e ligação com a integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3 (YAN *et al.*, 2010). Por outro lado, Lin e colaboradores demonstraram um papel oposto da OPNc em células de câncer de esôfago, onde células que superexpressavam a OPNc apresentaram uma diminuição de sua capacidade migratória e invasiva *in vivo* (LIN *et al.*, 2015).

Apesar de nossos estudos funcionais terem sido realizados demonstrando o papel funcional da OPNc na LLA-B contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1*, ressaltamos a necessidade de elucidarmos também o papel funcional das demais isoformas da OPN neste contexto. Além disto, identificar as vias de sinalização em que essas isoformas estão envolvidas estimulando as diversas etapas da manutenção do fenótipo leucêmico aqui estudadas, como viabilidade, proliferação, adesão, migração e invasão.

## 7) CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados do presente estudo fornecem novas informações a respeito da expressão transcricional das isoformas OPNa, OPNb e OPNc em amostras de pacientes com LLA-B contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1* ou *ETV6-RUNX1*. Demonstramos a associação existente entre a elevada expressão transcricional da OPNc e características de risco e prognóstico desfavoráveis da doença, principalmente o acometimento do SNC. Evidenciamos os possíveis papéis funcionais da OPNc na manutenção da LLA-B contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1*, uma vez que mediante o silenciamento desta isoforma as células leucêmicas apresentaram uma diminuição em sua viabilidade, capacidade adesiva, migratória e invasiva. Esses achados podem auxiliar no melhor entendimento da contribuição da OPNc na leucemogênese de células B, como ainda elucidar seus possíveis papéis como biomarcador e alvo de novas abordagens terapêuticas para esta doença que sejam direcionadas para esta variante de *splicing* (Figura 7.1).



**Figura 7.1 Modelo hipotético dos possíveis papéis da OPNc na modulação de distintos aspectos da biologia da LLA-B contendo a fusão gênica *KMT2A-AFF1*.** Os quadros demonstram os aspectos da biologia da LLA-B mediante a expressão basal (quadro da esquerda) ou diminuída (quadro da direita) da OPNc nas células leucêmicas contendo a fusão *KMT2A-AFF1*. Os aspectos demonstrados são proliferação, viabilidade, adesão, migração e invasão. As setas da cor verde indicam aumento enquanto as da cor vermelha diminuição dos aspectos avaliados. A seta da cor cinza indica a célula leucêmica ativa no ciclo celular.

## 8) PERSPECTIVAS

- Validar os dados em um número maior de amostras de pacientes pediátricos *KMT2A-AFF1* positivos;
- Avaliar o perfil de expressão das demais isoformas da OPN mediante o silenciamento da OPNc;
- Realizar ensaios funcionais de dormência celular, viabilidade celular após o tratamento com quimioterápicos, ciclo celular, apoptose, imunofluorescência para avaliação de proteínas de adesão e invasão celular em câmara transwell na presença de células endoteliais humanas;
- Avaliar se a fusão gênica *KMT2A-AFF1* é capaz de modular a expressão da OPNc



## 9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, D. et al. Osteopontin Identified as Lead Marker of Colon Cancer Progression , Using Pooled Sample Expression Profiling. **Journal of National Cancer Institute**, v. 94, n. 7, p. 513–521, 2002.

AL-SHEHHI, H. et al. Abnormalities of the der ( 12 ) t ( 12 ; 21 ) in *ETV6-RUNX1* Acute Lymphoblastic Leukemia. **Genes, Chromossomes & Cancer**, v. 213, n. 52, p. 202–213, 2013.

ALSADEQ, A.; SCHEW E, D. M. Acute lymphoblastic leukemia of the central nervous system : on the role of PBX1. **Haematologica**, v. 102, n. 4, p. 611–613, 2017.

ANBORGH, P. H. et al. New Dual Monoclonal ELISA for Measuring Plasma Osteopontin as a Biomarker Associated with Survival in Prostate Cancer: Clinical Validation and Comparison of Multiple ELISAs. **Clinical Chemistry**, v. 903, p. 895–903, 2009.

ANBORGH, P. H. et al. Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer. **J. Cell Cimmun. Signal**, v. 5, p. 111–122, 2011.

ANDERSON, K. et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 356–361, 2011.

ANDERSSON, A. K. et al. The landscape of somatic mutations in infant *MLL* rearranged acute lymphoblastic leukemias. **Nat Genet**, v. 47, n. 4, p. 330–337, 2015.

ARMSTRONG, S. A. et al. *MLL* translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. **Nat Genet**, v. 30, p. 41-47, 2001.

ARMSTRONG, S. A. et al. Inhibition of FLT3 in *MLL* : Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. **Cancer Cell**, v. 3, p. 173–183, 2003.

ATTARBASCHI, A. et al. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL / AML1 þ acute lymphoblastic leukemia : an interphase FISH analysis. **Leukemia**, v. 18, p. 1611–1616, 2004.

BAO, L. H. et al. Osteopontin in metastatic lesions as a prognostic marker in ovarian cancers. **Journal of Biomedical Science**, v. 14, p. 373–381, 2007.

BASTOS, A. C. S. F. et al. Osteopontin and their roles in hematological malignancies: Splice

variants on the new avenues. **Cancer Letters**, v. 408, p. 138-143, 2017

BELLAHCÈNE, A. et al. Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLINGs): Multifunctional proteins in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 3, p. 212-226, 2008.

BHOJWANI, D. et al. *ETV6-RUNX1*- positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. **Leukemia**, v. 26, n. 2, p. 265–270, 2013.

BHOJWANI, D. et al. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatr Clin North Am**, v. 62, n.1, p. 47-60, 2015.

BLASBERG, J. D. et al. Lung Cancer Osteopontin Isoforms Exhibit Angiogenic Functional Heterogeneity. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v.139, n. 6, p. 1587–1593, 2010

BOROWITZ, M. J. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. **Blood**, v. 111, p. 5477-5485, 2008

BOYERINAS, B. et al. Adhesion to osteopontin in the bone marrow niche regulates lymphoblastic leukemia cell dormancy. **Blood**, v. 21, n. 24, p. 4821-4831, 2013.

BRIONES-ORTA, M. A. et al. Osteopontin splice variants and polymorphisms in Cancer Progression and Prognosis. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, v. 1868, n. 1, p. 93-108, 2017

BRUM, Mariana Concentino. **Investigação do perfil de expressão e do papel funcional da Osteopontina-c na quimiorresistência no câncer**. 2018 (Dissertação Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional do Câncer, 2018

BÜRGER, B. et al. Diagnostic Cerebrospinal Fluid Examination in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: Significance of Low Leukocyte Counts With Blasts or Traumatic Lumbar Puncture. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 2, p. 184-188, 2003.

CASTELLO, L. M. et al. Osteopontin at the Crossroads of Inflammation and Tumor Progression. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1-22, 2017.

CEPPI, F. et al. Risk factors for relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia : prediction and prevention. **Informa Health Care**, p. 1-14, 2015.

- CHAE, S. et al. Osteopontin splice variants differentially modulate the migratory activity of hepatocellular carcinoma cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 35, p. 1409-1416, 2009.
- CHEN, R. et al. Down-regulation of osteopontin inhibits metastasis of hepatocellular carcinoma cells via a mechanism involving MMP-2 and uPA. **Oncology Reports**, v. 25, p. 803–808, 2011.
- CHEN, Y. B. et al. Prognostic significance of osteopontin in acute myeloid leukemia : A meta - analysis. **Molecular and Clinical Oncology**, n. 7, p. 275–280, 2017.
- CHEUNG, Y. T. et al. Association of Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Central Nervous System Injury With Neurocognitive and Brain Imaging Outcomes in Children Receiving Chemotherapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. **JAMA Oncology**, p. 1-7, 2018.
- CHESELLES, J. M. et al. Long-term follow-up of relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 123, p. 396-405, 2003.
- CHOW, E. J. et al. Glucocorticoids and insulin resistance in children with acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, v. 60, n. 4, p. 621–626, 2014.
- CHRISTENSEN, B. et al. Cell Type-specific Post-translational Modifications of Mouse Osteopontin Are Associated with Different Adhesive Properties \*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 27, p. 19463–19472, 2007.
- CHRISTENSEN, B.; PETERSEN, T. E.; SØRENSEN, E. S. Post-translational modification and proteolytic processing of urinary osteopontin. **Biochem J**, v. 411, p. 53–61, 2008.
- COBALEDA, C.; SÁNCHEZ-GARCÍA, I. B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin. **BioEssays**, v. 31, p. 600-609, 2009.
- CONTER, V. et al. Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Studies 82, 87, 88, 91 and 95 for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 24, p. 255-264, 2010.
- COURTER, D. et al. The RGD Domain of Human Osteopontin Promotes Tumor Growth and Metastasis through Activation of Survival Pathways. **Plos One**, v. 5, n. 3, 2010.
- DIAS, N.; STEIN, A. Antisense Oligonucleotides : Basic Concepts and Mechanisms

Minireview Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 347–355, 2002.

ECKERT, C. et al. Use of Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation Based on Minimal Residual Disease Response Improves Outcomes for Children With Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia in the Intermediate-Risk Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 21, 2013.

EDBERG, D. D. et al. Dynamic and Differential in Vivo Modifications of the Isoform HMGA1a and HMGA1b Chromatin Proteins. **The journal of biological chemistry**, v. 280, n. 10, p. 8961–8973, 2005.

EL-TANANI, M. K. et al. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 17, p. 463–474, 2006.

FABER, J. et al. HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. **Blood**, v. 113, n. 11, p. 2375-2385, 2008.

FANG, X. M. et al. Expression of osteopontin in central nervous system leukemia and its clinical significance. **ZSYXYXZZ**, v. 21, n. 2, p. 325-328, 2013.

FEDARKO, N. S. et al. Elevated Serum Bone Sialoprotein and Osteopontin in Colon, Breast, Prostate, and Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 4060–4066, 2001

FERREIRA, L. B. et al. Osteopontin expression is correlated with differentiation and good prognosis in medullary thyroid carcinoma. **European Journal of Endocrinology**, v. 174, n.4, p. 551-561, 2016a.

FERREIRA, L. B. et al. Osteopontin-a splice variant is overexpressed in papillary thyroid carcinoma and modulates invasive behavior. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 52003 - 52016, 2016b.

FERREIRA, L. B. et al. OPNa Overexpression Is Associated with Matrix Calcification in Thyroid Cancer Cell Lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1-16, 2018.

FISHER, L. W. et al. Flexible Structures of SIBLING Proteins , Bone Sialoprotein , and Osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 460–465, 2001.

- FLAMANT, S. et al. Osteopontin is upregulated by BCR-ABL. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, p. 1378–1384, 2005.
- FORD, A. M. et al. Protracted dormancy of pre-leukemic stem cells. **Leukemia**, v. 29, p. 2202–2207, 2015.
- FOROOTAN, S. S. et al. Prognostic significance of osteopontin expression in human prostate cancer. **Int J Cancer**, v. 118, p. 2255–2261, 2006.
- FRISHMAN-LEVY, L.; IZRAELI, S. Advances in understanding the pathogenesis of CNS acute lymphoblastic leukaemia and potential for therapy. **British Journal of Haematology**, v. 176, p.157-167, 2017.
- GAUDICHON, J. et al. Blood Reviews Mechanisms of extramedullary relapse in acute lymphoblastic leukemia : Reconciling biological concepts and clinical issues. **Blood Reviews**, v. 36, p. 40–56, 2019.
- GAYNON, P. S. et al. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. **British Journal of Haematology**, v. 131, p. 579-587, 2005
- GHAZAVI, F. et al. The molecular basis and clinical significance of genetic aberrations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Experimental Hematology**, 2015.
- GOPARAJU, C. M. V. et al. Functional Heterogeneity of Osteopontin Isoforms in Non-Small Cell Lung Cancer. **J Thorac Oncol**, v. 5, n. 10, p. 1516–1523, 2010.
- GIMBA, E. R.; TILLI, T. M. Human osteopontin splicing isoforms: Known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways. **Cancer Letters**, v. 331, n. 1, p. 11–17, 2013.
- GREAVES, M. Infection , immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nature Reviews**, v. 6, n. March, p. 193–203, 2006.
- HAO, C. et al. Prognostic Value of Osteopontin Splice Variant-c Expression in Breast Cancers : A Meta-Analysis. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-8, 2016.
- HAO, C. et al. Human osteopontin : Potential clinical applications in cancer (Review). **International journal of Molecular Medicine**, v. 39, p. 1327–1337, 2017.
- HAYLOCK, D. N.; NILSSON, S. K. Osteopontin : a bridge between bone and blood. **British**

**Journal of Haematology**, v. 134, p. 467-474, 2006.

HICKEY, F. B.; ENGLAND, K.; COTTER, T. G. Bcr-Abl regulates osteopontin transcription via Ras , PI-3K , aPKC, Raf-1, and MEK. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, p. 289- 300, 2005.

HOGAN, L. E. et al. Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. **Blood**, v. 118, n. 19, p.5218-5226, 2011.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **The new england journal o f medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541-1552, 2015.

IMANO, M. et al. Immunohistochemical Expression of Osteopontin in Gastric Cancer. **J Gastro Intest Surg**, v. 13, p. 1577–1582, 2009.

INCESoy-ÖZDEMİR, S. The relationship between cerebrospinal fluid osteopontin level and central nervous system involvement in childhood acute leukemia. **Turk J Pediatr**, v. 55, n. 1, p. 42-49, 2013.

INOUE, M.; SHINOHARA, M. L. Intracellular osteopontin ( iOPN ) and immunity. **Immunol Res**, n. 49, p. 160–172, 2011.

IRVING, J. A. E. et al. Integration of genetic and clinical risk factors improves prognostication in relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Trials and Observations**, v. 128, n. 7, p. 911–923, 2016.

JUNAID, A. et al. Osteopontin localizes to the nucleus of 293 cells and associates with polo-like kinase-1. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 292, p. 919–926, 2007.

KAZANECKI, C. C.; UZWIAK, D. J.; DENHARDT, D. T. Control of Osteopontin Signaling and Function by Post-Translational Phosphorylation and Protein Folding. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, p. 912–924, 2007.

KOLE, R.; E, R.; KRAINER, A. R.; AKOLLTMAN, S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. **Nature**, v. 11, p. 125-140, 2012.

KRIVTSOV, A. V et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL – AF9. **Nature**, v. 442, p. 818–822, 2006.

KRULL, K. R. et al. Neurocognitive Outcomes Decades After Treatment for Childhood

Acute Lymphoblastic Leukemia : A Report From the St Jude Lifetime Cohort Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 35, p. 4407- 4419, 2013.

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

KUMAR, B. et al. Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. **Leukemia**, v. 32, p. 575–587, 2018.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring harbor Protocols**, p. 469–472, 2018.

KUNII, Y. et al. The immunohistochemical expression profile of osteopontin in normal human tissues using two site-specific antibodies reveals a wide distribution of positive cells and extensive expression in the central and peripheral nervous systems. **Med Mol Morphol**, v. 42, p. 155–161, 2009.

LE VISEUR, C. et al. In Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Blasts At Different Stages Of Immunophenotypic Maturation Have Stem Cell Properties. **Cancer Cell**, v. 14, n. 1, p. 47-58, 2008.

LENK, L.; ALSADEQ, A.; SCHEWE, D. M. Involvement of the central nervous system in acute lymphoblastic leukemia : opinions on molecular mechanisms and clinical implications based on recent data. **Cancer and Metastasis Reviews**, 2020.

LIERSCH, R. et al. Osteopontin is a prognostic factor for survival of acute myeloid leukemia patients. **Blood**, v. 119, n. 22, p. 5215–5220, 2012.

LIN, J. et al. Osteopontin ( OPN / SPP1 ) isoforms collectively enhance tumor cell invasion and dissemination in esophageal adenocarcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 22239-22257, 2015.

LOCATELLI, F. et al. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 2012.

LOGHAVI, S.; KUTOK, J. L.; JORGENSEN, J. L. B-Acute Lymphoblastic Leukemia / Lymphoblastic Lymphoma. **Am J Clin Pathol**, p. 393–410, 2015.

- LOPEZ-MILLAN, B. et al. NG2 antigen is a therapeutic target for MLL -rearranged B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, p. 1557–1569, 2019.
- MARROQUIN, C. E. et al. Osteopontin increases CD44 expression and cell adhesion in RAW 264 . 7 murine leukemia cells. **Immunology Letters**, v. 95, p. 109–112, 2004.
- MARTIN, A.; MORGAN, E.; HIJIYA, N. Relapsed or Refractory Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Current and Emerging Treatments. **Pediatric Drugs**, v. 14, n. 6, p. 377–387, 2012.
- MATEOS, B. et al. The ambivalent role of proline residues in an intrinsically disordered protein: from disorder promoters to compaction facilitators. **Journal of Molecular Biology**, 2019.
- MENG, H. et al. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 216, p. 147–155, 2004.
- MEYER, C. et al. The *MLL* recombinome of acute leukemias. **Leukemia**, v. 20 p. 777–784, 2006.
- MEYER, C. et al. New insights to the *MLL* recombinome of acute leukemias. **Leukemia**, v. 23, p. 1490–1499, 2009.
- MIRZA, M. et al. Osteopontin-c is a selective marker of breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 4, p. 889–897, 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. ESTIMATIVA/2020 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) - Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2020.
- MOHAMMADI, S. et al. Osteopontin plays a unique role in resistance of CD34+/CD123+ human leukemia cell lines KG1a to parthenolide. **Life Sciences**, 2017.
- MOORMAN, A. V et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia : results from the UK Medical Research Council ALL97 / 99 randomised trial. **Lancet Oncology**, v. 11, n. 5, p. 429–438, 2010.
- MOORMAN, A. V. Blood Reviews The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Blood**, v. 26, n. 3, p. 123–135, 2012.



- MOORMAN, A. V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 101, n. 4, p. 407–416, 2016.
- MORROW, M. et al. *TEL-AML1* promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. **Blood**, v. 103, n. 10, p. 3890–3896, 2004.
- MULLIGHAN, C. G. Review series Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 10, p. 3407-3415, 2012a.
- MULLIGHAN, C. G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. **ASH Publication**, 2012b.
- MULLIGHAN, C. G. et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 446, p. 758-764, 2007.
- MULLIGHAN, C. G. et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. **Science**, v. 322, n. 5906, p. 1377–1380, 2008.
- MÜNCH, V. et al. Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia is mediated by vascular endothelial growth factor. **Blood**, v. 130, n. 5, p. 643–654, 2017.
- NILSSON, S. K. et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1232-1239, 2005.
- NGUYEN, K. et al. Factor Influencing Survival After Relapse From Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children's Oncology Group Study. **Leukemia**, v. 22, n. 12, p. 2142–2150, 2010.
- PANG, H. et al. Prognostic values of osteopontin-c, E-cadherin and  $\beta$ -catenin in breast cancer. **Cancer Epidemiology**, 2013.
- PARKER, H. et al. The Complex Genomic Profile of *ETV6-RUNX1* Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Highlights a Recurrent Deletion of *TBL1XR1*. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 47, p. 1118–1125, 2008.
- PIERRO, J. et al. New Targeted Therapies for Relapsed Pediatric Lymphoblastic Leukemia. **Expert Ver Anticancer Ther**, v. 17, n. 8, p. 725–736, 2018.
- PIETERS, R. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised

- trial. **Lancet**, v. 370, n. 9583, p. 240–250, 2007.
- PRIETO, C. et al. NG2 antigen is involved in leukemia invasiveness and central nervous system infiltration in MLL-rearranged infant B-ALL. **Leukemia**, v. 32, p. 633–644, 2018.
- PUI, C. Acute lymphoblastic leukemia. **Williams Hematology**, 2012.
- PUI, C. Acute lymphoblastic leukemia in children. **Leukemia**, v. 12, n. 1, p. 3-12, 2000.
- PUI, C. et al. Mechanisms of disease Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. **Mechanisms of disease**, v. 359, p. 1909–1915, 2002.
- PUI, C.; HOWARD, S. C. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. **Lancet Oncol**, v. 9, p. 257-268, 2008.
- PUI, C; RELLING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 350, n. 350, p. 1535-48, 2004
- RAAIJMAKERS, M. H. G. P. et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. **Nature**, v. 464, n. 7290, p. 852–857, 2010.
- RAETZ, E. A. et al. Reinduction Platform for Children With First Marrow Relapse of Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children’s Oncology Group Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 24, p. 3971-3978, 2008.
- RAGUSA, D. et al. The RS4; 11 cell line as a model for leukaemia with t ( 4; 11 ) ( q21 ; q23 ): Revised characterisation of cytogenetic features. **Cancer Reports**, p. 1–11, 2019.
- RANGASWAMI, H.; BULBULE, A.; KUNDU, G. C. Osteopontin : role in cell signaling and cancer progression. **Cell Biology**, v. 16, n. 2, p.79-87, 2006.
- REHE, K. et al. Acute B lymphoblastic leukaemia- propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, p. 38–51, 2013.
- RODRIGUES, R. et al. The Role of Osteopontin in Tumor Progression and Metastasis in Breast Cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n. 6, p. 1087–1098, 2007.
- ROGANOVIC, J. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **Leukemia**, 2013

RUBNITZ, J. E. et al. Prospective Analysis of TEL Gene Rearrangements in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group Study. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 13, p. 2186–2191, 2008.

SAARINEN-PIHKALA, U. M. et al. Pathways Through Relapses and Deaths of Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: Role of Allogeneic Stem- Cell Transplantation in Nordic Data. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 36, p. 5750-5762, 2006.

SAITO, Y. et al. Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 275–280, 2010.

SANCHEZ, R. et al. Clinical characteristics of patients with central nervous system relapse in *BCR-ABL1*-positive acute lymphoblastic leukemia: the importance of characterizing *ABL1* mutations in cerebrospinal fluid. **Ann Hematol**, v. 96, p. 1069–1075, 2017.

SANTORO, J. C. et al. Reinforcing osteopontin as a marker of central nervous system relapse in paediatric B-cell acute lymphoblastic leukaemia: SPP1 splice variant 3 in the spotlight . **British Journal of Haematology**, v. 16, p. 4–6, 2019.

SUN, S-J. et al. Integrin  $\beta 3$  and CD44 levels determine the effects of the OPN-a splicing variant on lung cancer cell growth. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55572- 55584, 2016.

SCHNABEL, C. A.; JACOBS, Y.; CLEARY, M. L. HoxA9-mediated immortalization of myeloid progenitors requires functional interactions with TALE cofactors Pbx and Meis. **Oncogene**, v. 19, p. 608–616, 2000.

SCHRAPPE, M. Risk-adapted stratification and treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 132, n. 2, p. 130–133, 2008.

SEEGER, B. K. et al. Relapse of TEL-AML1 – Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood: A Matched-Pair Analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 13, p. 3188–3193, 2011.

SHAFAT, M. S. et al. Blood Reviews The bone marrow microenvironment – Home of the leukemic blasts. **Blood Reviews**, 2017.

SHINOHARA, M. L. et al. Osteopontin expression is essential for interferon-  $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells. **Nature**, v. 7, n. 5, p. 498–506, 2006.

SHINOHARA, M. L. et al. Alternative translation of osteopontin generates intracellular and

secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. **PNAS**, v. 105, n. 20, p. 7235-7239, 2008.

SINGH, B.; EYRAS, E. The role of alternative splicing in cancer. **Transcription**, v. 8, n. 2, p. 91–98, 2017.

SPINELLA, J. et al. Mutational dynamics of early and late relapsed childhood ALL : rapid clonal expansion and long-term dormancy. **Blood advances**, v. 2, n. 3, p. 177-187, 2018.

STAMS, W. A. G. et al. Incidence of additional genetic changes in the TEL and AML1 genes in DCOG and COALL-treated t ( 12 ; 21 ) -positive pediatric ALL , and their relation with drug sensitivity and clinical outcome. **Leukemia**, v. 20, p. 410–416, 2006.

SUN, S. et al. Integrin  $\beta$ 3 and CD44 levels determine the effects of the OPN-a splicing variant on lung cancer cell growth. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55572- 55584, 2016.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, v. 7, n. 6, p. e577, 2017.

TILLI, T. M. et al. Osteopontin-c Splicing Isoform Contributes to Ovarian Cancer Progression. **Molecular Cancer Research**, v. 9, n. 3, p. 280–293, 2011.

TILLI, T. M. et al. Expression analysis of osteopontin mRNA splice variants in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 92, n. 1, p. 13–19, 2012a.

TILLI, T. M. et al. Both Osteopontin-c and Osteopontin-b Splicing Isoforms Exert Pro-T umorigenic Roles in Prostate Cancer Cells. **The Prostate**, p. 1-12, 2012b.

TILLI, T. M. et al. Changes in the transcriptional profile in response to overexpression of the osteopontin-c splice isoform in ovarian ( OvCar-3 ) and prostate ( PC-3 ) cancer cell lines. **BMC Cancer**, v. 14, p. 1–11, 2014.

TUCK, A. B. et al. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. **Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)**, v. 79, p. 502–508, 1998.

TORRANO, V. et al. ETV6-RUNX1 promotes survival of early B lineage progenitor cells via a dysregulated erythropoietin receptor. **Blood**, v. 118, n. 18, p. 4910–4918, 2011.

VAN DER VELDEN, V. H. J. et al. New cellular markers at diagnosis are associated with

isolated central nervous system relapse in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 172, n. 5, p. 769–781, 2016.

VEJDA, S.; PIWOCKA, K.; MCKENNA, S. L. Autocrine secretion of osteopontin results in degradation of I j B in Bcr-Abl-expressing cells. **British Journal of Haematology**, v. 128, p. 711-721, 2005.

WAI, P. Y.; KUO, P. C. The Role of Osteopontin in Tumor Metastasis. **Journal of Surgical Research**, v. 121, p. 228–241, 2004.

WAI, P. Y.; KUO, P. C. Osteopontin : regulation in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 27, p. 103–118, 2008.

WARRIS, L. T. et al. Acute Activation of Metabolic Syndrome Components in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Treated with Dexamethasone. **PLOS ONE**, p. 1–15, 2016.

WATTS, J. K.; COREY, D. R. Gene silencing by siRNAs and antisense oligonucleotides in the laboratory and the clinic. **J Pathol**, v. 226, n. 2, p. 365–379, 2012.

WEI, R. et al. Osteopontin -- a promising biomarker for cancer therapy. **Journal of Cancer**, v. 8, p.2173-2183, 2017.

WINTERS, A. C.; BERNT, K. M. *MLL*-Rearranged Leukemias — An Update on Science and Clinical Approaches. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, n. 4, p. 11–13, 2017.

WOO, J. S.; ALBERTI, M. O.; TIRADO, C. A. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia : a genetic update. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 3, n. 16, p. 1-14, 2014.

WUNG, J. K. et al. Increased Expression of the Remodeling- and Tumorigenic-Associated Factor Osteopontin in Pyramidal Neurons of the Alzheimer ' s Disease Brain. **Current Alzheimer Research**, v. 4, n.1, p. 67–72, 2007.

YAN, K. et al. The Associations Between Maternal Factors During Pregnancy and the Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia : A Meta-Analysis The Characteristics of Eligible Studies. **Pediatr Blood Cancer**, p. 1–9, 2015.

YAN, W. et al. Expression pattern of osteopontin splice variants and its functions on cell apoptosis. **Neuro-Oncology**, v. 12, n. 8, p. 765–775, 2010.

YANG, G. et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 112, n.10, p. 4178-4183, 2008.

YANG, G. et al. Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Inhibit the Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells into Osteoblasts In Vitro by Activating Notch Signaling. **Stem Cells International**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

ZAHEDPANA, M. et al. Anti-Apoptotic Effects of Osteopontin via the Up-Regulation of AKT/mTOR/ $\beta$ -Catenin Loop in Acute Myeloid Leukemia Cells. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**, v. 11, n. 2, p. 148-157, 2016.

ZDUNIAK, K. et al. Nuclear osteopontin-c is a prognostic breast cancer marker. **British Journal of Cancer**, v. 112, p. 729–738, 2015.

ZEISIG, B. B. et al. Hoxa9 and Meis1 Are Key Targets for MLL-ENL-Mediated Cellular Immortalization. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 2, p. 617–628, 2004.

ZHANG, H. et al. An integrated procedure of selective injection , sample stacking and fractionation of phosphopeptides for MALDI MS analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 581, p. 268–280, 2007.

ZHANG, H. et al. Genetic variants and clinical significance of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Annals of Translational Medicine**, v. 7, n. 14, p. 1-12, 2019.

ZHANG, J. et al. Differential osteopontin expression in lung cancer. **Cancer Letters**, v. 171, p. 215–222, 2001.

ZHANG, J. et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Letters to nature**, v. 425, n. 23, p. 836–841, 2003.

ZHAO, B. et al. Osteopontin as a potential biomarker of proliferation and invasiveness for lung cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 7, p. 1061–1070, 2011.

ZHU, B. et al. Osteopontin Modulates CD44-Dependent Chemotaxis of Peritoneal Macrophages Through G-Protein-Coupled Receptors : Evidence of a Role for an Intracellular Form of Osteopontin. **Journal of Cellular Physiology**, v. 198, p. 155–167, 2004.

## 10) ANEXOS

Artigos científicos publicados com parte dos resultados descritos na dissertação:

ANEXO 1: **BASTOS, A. C. S. F.**; BLUNCK, C. B.; EMERENCIANO, M.; GIMBA, E. R. P. Osteopontin and their roles in hematological malignancies: Splice variants on the new avenues. **Cancer Letters**, v. 408, p. 138-143, 2017 (doi: 10.1016/j.canlet.2017.08.022)

ANEXO 2: SANTORO, J. C.; **BASTOS, A. C. S. F.**; GIMBA, E. R. P.; EMERENCIANO, M. Reinforcing osteopontin as a marker of central nervous system relapse in paediatric B-cell acute lymphoblastic leukaemia: *SPP1* splice variant 3 in the spotlight. **British Journal of Haematology**, v. 186, n. 4, p. 88-91, 2019 (doi: 10.1111/bjh.15917)

ANEXO 3: **BASTOS, A. C. S. F.**; REZENDE, A. C. S.; FERREIRA, L. B.; BLUNCK, C. B.; POMBO-de-OLIVEIRA, M. S.; EMERENCIANO M., GIMBA, E. R. P. Osteopontin-c is overexpressed in *KMT2A-AFF1* positive pediatric B-cell lymphoblastic leukemia when compared to those with *ETV6-RUNX1*. **Leukemia Research**, v. 91, p. 1-4, 2020 (doi: 10.1016/j.leukres.2020.106316)