



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

BRUNO DE ALMEIDA LOPES

Análise genômica de deleções completas de *IKZF1* em  
leucemias linfoblásticas agudas pediátricas

Orientadora: Dra. Mariana Emerenciano

Coorientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Rio de Janeiro

2016



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

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

Bruno de Almeida Lopes

Análise genômica de deleções completas de *IKZF1* em  
leucemias linfoblásticas agudas pediátricas

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

Orientadora: Dra. Mariana Emerenciano

Coorientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Rio de Janeiro

2016



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Pós-Graduação em Oncologia**

**BRUNO DE ALMEIDA LOPES**

Análise genômica de deleções completas de *IKZF1* em  
leucemias linfoblásticas agudas pediátricas

**Orientadora:** Dra. Mariana Emerenciano

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

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Miguel Angelo Martins Moreira  
**Prof. Dr.** Leonardo Augusto Karam Teixeira  
**Prof. Dr.** José Andrés Yunes  
**Prof. Dr.** Francisco Meirelles Bastos de Oliveira  
**Prof. Dra.** Etel Rodrigues Pereira Gimba  
**Prof. Dra.** Claudia de Alencar Santos Lage

Rio de Janeiro

2016

L864a Lopes, Bruno de Almeida.

Análise genômica de deleções completas de IKZF1 em leucemias linfoblásticas agudas pediátricas / Bruno de Almeida Lopes. – Rio de Janeiro, 2016.

156 f.: il.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2016.

Orientador: Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá.

Co-orientador: Maria do Socorro Pombo de Oliveira.

1. Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras B.  
2. Genômica. 3. IKZF1. 4. Genes RAG-1 5. Criança. 6. Adolescente.  
I. Sá, Mariana Emerenciano Cavalcanti de (Orient.). II. Oliveira, Maria do Socorro Pombo de (Co-orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99419

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Dra. Mariana Emerenciano pela oportunidade concedida para o desenvolvimento deste trabalho acadêmico, por instigar o pensamento científico e captar os insumos para a realização do mesmo.

À Dra. Maria S. Pombo de Oliveira pela oportunidade de estudar no programa e por tornar factível a captação de amostras, a produção e análise dos dados gerados neste trabalho, além de sua supervisão para o aperfeiçoamento científico do estudo.

Ao INCA, que através da pós-graduação em oncologia, consegue patrocinar a pesquisa em excelência na área.

Aos meus pais, Sandra Lopes e Paulo Lopes, e ao meu irmão, Marcelo Lopes, que foram o grande apoio para a realização desta etapa acadêmica. Há muito tempo são a fonte da minha motivação e dedicação à pesquisa.

À Gisele Brisson por ajudar-me a manter o foco no objetivo de ser um cientista, motivar-me e capacitar-me intelectual e moralmente na minha profissão.

Aos meus amigos do PHOP, que fazem a rotina da pesquisa muito mais prazerosa através de companheirismo e criatividade. Em especial, não posso deixar de agradecer ao Júlio César Santoro, Caroline Barbieri e Thayana Barbosa por transformarem suas companhias em amizade.

Outro agradecimento importante deve ser feito ao grupo de estudo de leucemias de células precursoras B do PHOP, INCA, que constroem a base de dados e conservam as amostras direcionadas aos estudos deste grupo de leucemias pediátricas.

Às crianças e mães participantes deste estudo, por transformarem a presente luta em conhecimento para melhores condutas na prevenção e tratamento da leucemia.

*"Viver sem filosofar é o que se chama ter os olhos  
fechados sem nunca os haver tentado abrir."*

René Descartes

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xv
<b>RESUMO</b> .....	xix
<b>ABSTRACT</b> .....	xx
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Leucemia linfoblástica aguda pediátrica.....	1
1.1.1 Grupos citogenético-moleculares .....	3
1.1.2 Alterações moleculares submicroscópicas adicionais .....	11
1.1.3 Marcadores de risco terapêutico.....	14
1.2 <i>Ikaros (IKZF1)</i> .....	16
1.2.1 Aspectos gerais .....	16
1.2.2 Alterações no gene <i>Ikaros</i> .....	18
1.2.3 Impacto prognóstico de alterações no <i>Ikaros</i> .....	22
1.2.4 Deleções em <i>IKZF1</i> e alterações concomitantes.....	25
1.2.5 Métodos de detecção de alterações em <i>Ikaros</i> .....	26
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 Objetivos gerais .....	34
3.2 Objetivos específicos .....	34
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 Desenho do estudo .....	35
4.2 Casuística .....	37
4.3 Amostras .....	37

4.4	Purificação de DNA.....	38
4.5	Ensaio de microarranjo .....	38
4.6	PCR multiplex (MP-PCR).....	39
4.7	Amplificação Multiplex Dependente de Ligação de Sondas (MLPA).....	41
4.8	Análise dos dados de MLPA .....	45
4.9	PCR invertida de longa distância (LDI-PCR).....	45
4.10	Reação da transcriptase reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase .....	47
4.11	Hibridização in situ Fluorescente .....	48
4.12	Identificação de motivos associados às regiões de quebra do DNA.....	48
4.13	Análise de dados de DNase-seq e ChIP-seq.....	49
4.14	Análise estatística .....	49
5	RESULTADOS.....	50
5.1	Características demográficas dos pacientes.....	50
5.2	Comparação entre LLA-CPB com <i>IKZF1</i> $\Delta$ 1-8 e outras deleções.....	52
5.3	Perfil genômico de amostras de LLA-CPB com <i>IKZF1</i> $\Delta$ 1-8 .....	57
5.4	Identificação de rearranjo <i>PAX5-AUTS2</i> em amostra com deleção completa de <i>IKZF1</i> .....	62
5.5	Desenvolvimento e padronização de ensaio de MLPA para avaliação de número de cópias no cromossomo 7.....	67
5.6	Análise de CNAs no cromossomo 7 por MLPA.....	70
5.7	Sequenciamento das regiões de quebra por MP-PCR.....	73
5.8	Sequenciamento das regiões de quebra por LDI-PCR .....	78
5.9	Identificação de rearranjos no <i>COBL</i> em amostras com deleção intragênica de <i>IKZF1</i> .....	80
5.10	Estudo de mecanismos de recombinação nas regiões de quebra.....	82
5.10.1	Sequências sinais de recombinação no cromossomo 7.....	83
5.10.2	Sequências sinais de recombinação nas proximidades dos pontos de quebra	86



5.10.3	Estrutura da cromatina nas regiões de quebra.....	93
5.10.4	Estruturas secundárias das regiões de quebra .....	96
6	DISCUSSÃO .....	100
6.1	Alterações adicionais associadas à deleção completa de <i>IKZF1</i> .....	100
6.2	Translocações não balanceadas envolvendo o cromossomo 7 promovem deleções completas de <i>IKZF1</i> .....	103
6.3	Alterações de número de cópia no cromossomo 7 que promovem deleções completas de <i>IKZF1</i> .....	107
6.4	Mecanismo relacionado com a quebra do DNA nas deleções completas de <i>IKZF1</i> .....	113
7	CONCLUSÕES .....	117
8	REFERÊNCIAS.....	119
9	ANEXOS .....	128
9.1	Anexo I .....	128
9.2	Anexo II .....	130
9.3	Anexo III .....	136

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Oligonucleotídeos para detecção de alterações da amostra S24 por MP-PCR.....	41
Tabela 5.1. Comparação de características clínicas-demográficas de pacientes com IKZF1 $\Delta$ 1-8. ....	51
Tabela 5.2. Avaliação de CNAs pelo ensaio de MLPA SALSA P335 de acordo com o status de IKZF1. ....	53
Tabela 5.3. Avaliação de CNAs pelo ensaio de MLPA SALSA P202 de acordo com o status de IKZF1. ....	55
Tabela 5.4. Características demográficas e laboratoriais da coorte de descoberta. ....	57
Tabela 5.5. Características demográficas da coorte de investigação. ....	70
Tabela 5.6. Sumário das estruturas secundárias presentes nas amostras com deleção de IKZF1. ....	99
Tabela 6.1. Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com PAX5-AUTS2.....	105

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Incidência das leucemias pediátricas por faixa etária nos países nórdicos. ....	2
Figura 1.2. Frequência de alterações citogenéticas nos subtipos de LLA-CPB por faixa etária em crianças, adolescentes e adultos. ....	4
Figura 1.3. Agrupamento de subtipos de LLA de acordo com o perfil de expressão gênica e descoberta do perfil “semelhante ao BCR–ABL1” .....	7
Figura 1.4. Grupos genéticos da LLA-CPB Ph-like. ....	8
Figura 1.5. Sobrevida livre de eventos em diferentes grupos citogenéticos.....	15
Figura 1.6. Isoformas de IKZF1 e sua função biológica. ....	17
Figura 1.7. Perfil das mutações em IKZF1. ....	19
Figura 1.8. Recombinação gênica mediada por RAG. ....	21
Figura 1.9. Incidência cumulativa de recaídas em pacientes com LLA-CPB. ....	22
Figura 1.10. Prognóstico de casos com deleções de IKZF1. ....	24
Figura 1.11. CNAs nos subgrupos de LLA-CPB com maior frequência de deleções em IKZF1.....	26
Figura 1.12. Metodologia de MP-PCR fluorescente para detecção de deleções recorrentes em IKZF1. ....	29
Figura 1.13. Metodologia de MP-PCR para o rastreamento de deleções em IKZF1.	31
Figura 4.1. Fluxograma do estudo.....	35
Figura 4.2. Estratégia de MLPA customizado para análise de CNAs no cromossomo 7.....	42
Figura 4.3. Estratégia de MLPA customizado para análise de CNAs em amostra com deleção a partir do íntron 7 de COBL.....	43
Figura 4.4. Desenho das LDI-PCR para a amplificação e sequenciamento dos pontos de quebra em COBL.....	46
Figura 5.1. Alterações de CNAs no genoma de pacientes analisados por microarranjo. ....	59
Figura 5.2. Perfil de alterações no cromossomo 9 em pacientes com deleções completas do IKZF1. ....	60
Figura 5.3. Perfil de alterações no cromossomo 7 em pacientes com deleções completas do IKZF1. ....	61
Figura 5.14. Perfil genômico de CNAs em amostra com rearranjo PAX5-AUTS2.....	63

Figura 5.15. Transcrito PAX5-AUTS2 e consequências na estrutura das proteínas na amostra S24. ....	64
Figura 5.16. Eletroforese em gel de agarose 2% da MP-PCR e nested-PCR para identificação da fusão do derivativo 1 na amostra S24. ....	65
Figura 5.17. Perda do derivativo 7 na amostra S24. ....	66
Figura 5.4A. Validação do ensaio de MLPA in-house para o cromossomo 7. ....	68
Figura 5.5B. Validação do ensaio de MLPA in-house para o cromossomo 7. ....	69
Figura 5.6. CNAs em amostras com IKZF1 $\Delta$ 1-8 rastreadas pelo MLPA customizado. ....	71
Figura 5.7. Rearranjo no íntron 7 de COBL identificado pelo MLPA customizado na amostra S03. ....	72
Figura 5.8. Confirmação do ponto de quebra no íntron 5 do COBL da amostra S35. ....	74
Figura 5.9. Confirmação do ponto de quebra no íntron 5 do COBL na amostra S36. ....	75
Figura 5.10. Região de deleção do cromossomo 7 e genes envolvidos. ....	77
Figura 5.11. Amostra (S10) com inversão envolvendo o COBL. ....	79
Figura 5.12. Eletroforese em gel de agarose 2% da LDI-PCR no íntron 7 de COBL na amostra S03. ....	80
Figura 5.13. Identificação da fusão IKZF1-COBL no paciente S48. ....	81
Figura 5.18. Sequências RSS ao longo do cromossomo 7. ....	83
Figura 5.19. Sequências RSS ao longo de IKZF1. ....	84
Figura 5.20. Sequências RSS ao longo de COBL. ....	85
Figura 5.21. Sequências RSS na região do ponto de quebra nas amostras com deleção completa de IKZF1 e rearranjo de COBL. ....	87
Figura 5.22. Sequências RSS na região do ponto de quebra nas amostras com deleção intragênica de IKZF1 consequente da fusão IKZF1-COBL. ....	88
Figura 5.23. Sequências RSS na região do ponto de quebra de amostras com deleção completa de IKZF1 e fusão PAX5-AUTS2. ....	89
Figura 5.24. Comparação entre sequências de ponto de quebra de deleções intragênicas e completas de IKZF1 nas LLA-CPB pediátricas. ....	91
Figura 5.25. Mapeamento da distância entre motivos CG e CAC e os pontos de quebra de deleções intragênicas e completas de IKZF1 nas LLA-CPB pediátricas. ....	92
Figura 5.26. Avaliação do estado da cromatina nas regiões de quebra envolvendo COBL. ....	94

Figura 5.27. Avaliação do estado da cromatina nas regiões de quebra de PAX5-AUTS2.....	95
Figura 5.28. Estruturas secundárias encontradas em ácidos nucleicos.....	96
Figura 5.29. Estrutura secundária do DNA na região de quebra de amostras com rearranjo de COBL.....	97
Figura 5.30. Estrutura secundária do DNA na região de quebra de amostras com rearranjo de COBL e PAX5-AUTS2.....	98
Figura 6.1. Sumário de pontos de quebra presentes no COBL em amostras com IKZF1 $\Delta$ 1-8.....	112

## LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de MP-PCR. ....	40
Quadro 4.2. Descrição dos ensaios de MLPA customizados. ....	43
Quadro 4.3. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de LDI-PCR. ....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ABL1</i>	Gene ABL proto-oncogene 1
<i>AF4</i>	Gene da família <i>AF4/FMR2</i> , membro 1 ( <i>AFF1</i> )
<i>AF6</i>	Gene <i>MLL</i> translocado com o 4 ( <i>MLLT4</i> )
<i>AF9</i>	Gene <i>MLL</i> translocado com o 3 ( <i>MLLT3</i> )
<i>AF10</i>	Gene <i>MLL</i> translocado com o 10 ( <i>MLLT10</i> )
<i>AF1P</i>	Gene do Substrato 15 da via do Fator de Crescimento Epidérmico
<i>AFF1</i>	Gene da família <i>AF4/FMR2</i> , membro 1 ( <i>AF4</i> )
<i>AML1</i>	Gene do Fator de Transcrição 1 relacionado ao Runt ( <i>RUNX1</i> )
<i>AUTS2</i>	Gene Candidato de Susceptibilidade ao Autismo 2
<i>BCR</i>	Região com alta frequência de quebra do DNA
CFSSs	Sítios frágeis comuns
CNAs	Alterações de número de cópias do DNA
<i>COBL</i>	Gene <i>Cordon-bleu</i>
CRA	Região comum de amplificação na <i>iAMP21</i>
CRD	Região comum de deleção na <i>iAMP21</i>
<i>CRLF2</i>	Gene Fator semelhante ao receptor de citocina 2
<i>DDC</i>	Gene <i>dopa descarboxilase</i> ( <i>descarboxilase do aminoácido leucina aromático</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRM	Doença Residual Mínima
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfato
<i>E2A</i>	Gene fator de transcrição 3 ( <i>TFPT</i> )

EDTA	Ácido Etileno-diamino Tetra-acético
ERFSs	Sítios frágeis de replicação inicial
<i>ELL</i>	Gene <i>Fator de alongamento RNA polimerase II</i>
<i>ENL</i>	Gene da <i>Subunidade do complexo de super alongamento (MLLT1)</i>
<i>EPS15</i>	Gene <i>Subtrato 15 da via do Fator de Crescimento Epidérmico (AF1P)</i>
<i>ETV6</i>	Gene <i>variante ets 6 (TEL)</i>
FAM	Fluorocromo Carboxifluoresceína
<i>FIGNL1</i>	Gene “ <i>fidgetin-like 1</i> ”
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
GL	Germinativo ( <i>Germline</i> )
<i>GRB10</i>	Gene <i>Proteína 10 ligada ao receptor de fator de crescimento</i>
GWAS	Estudos de associação genômica global
H3K9 <sub>ac</sub>	Acetilação da lisina 9 da histona 3
H3K4 <sub>me</sub>	Metilação da lisina 4 da histona 3
HPA	Eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal
<i>HOX</i>	Gene “ <i>Homeobox</i> ”
iAMP21	Amplificação intracromossomal do 21
ICCC	Classificação Internacional do Câncer Pediátrico
<i>IKZF1</i>	Gene <i>Ikaros</i>
<i>IKZF2</i>	Gene <i>Helios</i>
<i>IKZF3</i>	Gene <i>Aiolos</i>
<i>IKZF4</i>	Gene <i>Eos</i>
<i>IKZF5</i>	Gene <i>Pegasus</i>
ID	Índice de DNA



INCA	Instituto Nacional de Câncer
Kb	Quilo bases
<i>KMT2A</i>	Gene <i>Leucemia de Linhagem Mista (MLL)</i>
LDI-PCR	PCR invertida de longa distância
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-CPB	Leucemia Linfoblástica Aguda de células precursoras B
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LPO	Sonda de Oligonucleotídeo da Esquerda
Mb	Megabases
<i>MLL</i>	Gene da Leucemia de Linhagem Mista ( <i>KMT2A</i> )
<i>MLL-r</i>	Gene <i>MLL (KMT2A)</i> rearranjado
MLPA	Amplificação Multiplex Dependente de Ligação de Sondas
MO	Medula óssea
NCI	Instituto Nacional de Câncer dos EUA
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAR1	Região Pseudoautosômica 1
<i>PAX5</i>	Gene " <i>Paired Box 5</i> "
pb	Pares de base
<i>PBX1</i>	Gene " <i>pre-B-cell leukemia homeobox 1</i> "
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Ph	Cromossomo " <i>Philadelphia</i> "
PHOP	Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico

<i>POM121</i>	Gene <i>Nucleoporina Transmembranar POM121</i>
rpm	Rotações por minuto
RPO	Sonda de oligonucleotídeo da direita
RSSs	Sequências de Sinal de Recombinação
RT-PCR	Transcrição Reversa acoplada à PCR
<i>RUNX1</i>	Gene do <i>Fator de Transcrição 1 relacionado ao Runt (AML1)</i>
SLE	Sobrevida livre de eventos
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Sangue Periférico
<i>TEL</i>	Gene <i>variante ets 6 (ETV6)</i>
<i>TFPT</i>	Gene <i>Parceiro de fusão do TCF3 (E2A)</i>
TMACL	Cloreto de tetrametilamônio
trxG	Grupo <i>trithorax</i>
<i>VWC2</i>	Gene com conteúdo do domínio “ <i>von Willebrand factor C</i> ”
WH2	Motivo de homologia ao WASP 2
<i>ZPBP</i>	Gene <i>Proteína ligadora à zona pelúcida</i>



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

Análise genômica de deleções completas de *IKZF1* em leucemias linfoblásticas agudas pediátricas

**RESUMO**

Bruno de Almeida Lopes

**Introdução:** A leucemia de células precursoras B (LLA-CPB) pediátrica é caracterizada por alterações citogenético-moleculares recorrentes, cuja identificação é essencial para a estratificação de risco terapêutico e adequação do tratamento ao risco de recaída em cada paciente. Recentemente estudos genômicos identificaram que deleções em *IKZF1* ( $\Delta IKZF1$ ) podem ser preditivas de maior risco de recaída. As  $\Delta IKZF1$  foram rastreadas inicialmente por amplificação *multiplex* dependente de ligação de sondas (MLPA), no entanto, a metodologia é pouco sensível para a avaliação de doença residual mínima. Para tanto, estudos recentes desenvolveram técnicas de PCR *multiplex* (MP-PCR). Como as MP-PCR não detectam *IKZF1*  $\Delta 1-8$  (~30% das LLA-CPB pediátricas), este trabalho teve como objetivo investigar as características das *IKZF1*  $\Delta 1-8$  nas LLA-CPB pediátricas. **Metodologia:** Os sujeitos desta pesquisa foram crianças e adolescentes (< 18 anos) com LLA-CPB e *IKZF1*  $\Delta 1-8$ . Inicialmente uma coorte de descoberta ( $n = 6$ ) foi caracterizada por microarranjo. Em seguida, alterações de número de cópias (CNAs) no cromossomo 7 foram avaliadas na coorte de investigação ( $n = 45$ ) através de MLPA customizado. A partir dos dados de CNA, os pontos de quebra das deleções foram sequenciados por PCR multiplex ou PCR invertida de longa distância. Com as sequências de ponto de quebra, investigamos sequências sinais de recombinação de RAG (RSSs), além de motivos CpG, estrutura secundária do DNA nas regiões de quebra e dados públicos do ENCODE de DNase e CHIP-seq. Características demográficas e CNAs de amostras com *IKZF1*  $\Delta 1-8$  e demais deleções foram comparadas no programa SPSS 18, enquanto diferenças na distribuição de motivos nas regiões de quebra foram avaliados no GraphPad Prism 5. Valores  $p < 0,05$  foram interpretados como estatisticamente significantes. **Resultados:** A maioria dos casos de LLA-CPB incluídos no estudo foi do sexo masculino e diagnosticada com leucemia entre 1 e 9 anos de idade. Os subgrupos citogenético-moleculares hiperdiploides e *ETV6-RUNX1* corresponderam à maioria dos casos. Inicialmente a avaliação de CNAs entre amostras com deleções focais e não focais em *IKZF1* revelou que as *IKZF1*  $\Delta 1-8$  também envolvem genes adjacentes (*ZPBP*, *FIGNL1* e *DDC*). A análise de microarranjo na coorte de descoberta revelou quatro perfis de CNAs no cromossomo 7, que foram utilizados como base para o desenho do MLPA customizado. A análise na coorte de investigação identificou seis perfis de CNAs no cromossomo 7 em *IKZF1*  $\Delta 1-8$ : deleção intersticial no 7p (28%), monossomia 7 (19%), deleção com ponto de quebra no *COBL* (17%), *IKZF1*  $\Delta 1-8$  sem comprometimento de outras regiões analisadas (14%), isocromossomo (7q) (11%) e perda completa do 7p (11%). A avaliação das sequências de quebra revelou ausência de RSSs nas *IKZF1*  $\Delta 1-8$ , mostrando que tais deleções não devem ser promovidas por RAG. **Conclusão:** As *IKZF1*  $\Delta 1-8$  são caracterizadas por alterações numéricas e estruturais do cromossomo 7, principalmente pela monossomia e por extensas deleções intersticiais que podem apresentar ponto de quebra no *COBL*, localizado a 611 Kb de *IKZF1*. Como os resultados excluem a participação de RAG na promoção de *IKZF1*  $\Delta 1-8$ , o estudo sugere que tais alterações sejam formadas em estágios mais imaturos, em uma célula-tronco mielóide-linfoide comum.

**Palavras-chave:** LLA-CPB, *IKZF1*, *COBL*, RAG.



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

GENOMIC ANALYSIS OF COMPLETE *IKZF1* DELETIONS IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

**ABSTRACT**

Bruno de Almeida Lopes

**Background:** Childhood B-cell precursor acute leukemia is characterized by recurrent cytogenetic and molecular alterations. Their identification is crucial for both risk stratification and treatment management of patients. Recently, genomic studies have identified *IKZF1* deletions ( $\Delta IKZF1$ ) as a valuable predictor of relapse.  $\Delta IKZF1$  have been screened by multiplex probe amplification assay (MLPA) in various studies, although the methodology lacks sensitivity for minimal residual disease evaluation. Therefore, novel studies have developed multiplex PCR (MP-PCR) tests with greater sensitivity. Since MP-PCR is still unable to identify *IKZF1*  $\Delta 1-8$  (~30% of recurrent deletions of BCP-ALL), this study aimed to investigate the main characteristics of childhood BCP-ALL cases with *IKZF1*  $\Delta 1-8$ . **Methods:** This study enrolled children aged <18 years diagnosed with BCP-ALL and *IKZF1*  $\Delta 1-8$ . First, a discovery cohort ( $n = 6$ ) was analyzed with CytoScan HD array. Thereafter, CNAs within chromosome 7 were analyzed in a validation cohort ( $n = 45$ ) using an in-house MLPA. The breakpoints were sequenced after multiplex (MP-PCR) and long-distance inverse PCR (LDI-PCR). After all, the possible mechanisms underlying occurrence of deletions were also investigated using a nucleotide-based similarity approach, along with DNase and ChIP-seq data retrieved from ENCODE database. Statistical analysis of demographic characteristics were compared with SPSS 18, while sequence motifs analyzed on GraphPad Prism software. **Results:** The majority of patients with *IKZF1*  $\Delta 1-8$  included in this study were males and diagnosed with BCP-ALL between 1-9 years-old. The main cytogenetic alterations were high hyperdiploid and *ETV6-RUNX1*. Patients with *IKZF1*  $\Delta 1-8$  generally presented deletions of neighboring genes: *ZPBP*, *FIGNL1*, and *DDC*. The array analysis in the discovery cohort identified four CNA profiles within chromosome 7, which were used to design a customized MLPA assay. In the investigation cohort, we identified six sorts of alterations within chromosome 7 of *IKZF1*  $\Delta 1-8$ : interstitial deletions within 7p arm (28%), monosomy 7 (19%), *IKZF1*  $\Delta 1-8$  with breakpoints within *COBL* (17%), *IKZF1*  $\Delta 1-8$  without involvement of surrounding regions (14%), isochromosome 7q (11%), and 7p loss (11%). The investigation of sequence motif revealed absence of RSSs at the breakpoint sites, suggesting that *IKZF1*  $\Delta 1-8$  are not associated with RAG recombination. **Conclusion:** *IKZF1*  $\Delta 1-8$  are defined by several numeric and structural changes on chromosome 7, mainly represented by monosomy and large interstitial deletions, which recurrently have breakpoints within *COBL*, a novel hotspot located ~611 Kb downstream of *IKZF1*. Because RAG-type rearrangements are not associated to *IKZF1*  $\Delta 1-8$  generation, this study suggests that such alterations occur at even more immature stages of B-cell differentiation, such as a common myeloid-lymphoid progenitor cell.

**Key words:** BCP-ALL, *IKZF1*, *COBL*, RAG.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leucemia linfoblástica aguda pediátrica

O câncer infanto-juvenil apresenta manifestação clínica em crianças e adolescentes (0 e 18 anos de idade) e representa cerca de 1-3% dos tumores malignos de todas as idades. Em 2011, foram registrados 2.812 óbitos por câncer em crianças e adolescentes, colocando as neoplasias como a segunda causa de morte neste grupo no Brasil, ficando atrás apenas das causas externas (traumatismos, lesões e outros agravos consequentes de acidentes ou violência) (Estimativa INCA, 2014).

De acordo com a Classificação Internacional do Câncer Pediátrico (ICCC, *International Classification of Childhood Cancer*) da Organização Mundial de Saúde (OMS), os tumores pediátricos são agrupados em doze subtipos: (1) leucemias agudas, doenças mieloproliferativas e mielodisplásicas, (2) linfomas e neoplasias reticuloendoteliais, (3) neoplasias do sistema nervoso central (SNC), intracraniais e intraespinhais, (4) neuroblastoma e tumores de outras células nervosas periféricas, (5) retinoblastoma, (6) tumores renais, (7) tumores hepáticos, (8) tumores ósseos malignos, (9) sarcomas de tecido mole e outros tumores extra ósseos, (10) tumores de célula germinativa, trofoblásticos e gonadais, (11) outras neoplasias malignas epiteliais e melanomas malignos, e (12) outras neoplasias e tumores não especificados (VARDIMAN, 2010).

Dentro do grupo de tumores pediátricos, as leucemias são as neoplasias mais incidentes. Elas compreendem diversas neoplasias do sistema hematopoiético e, em termos gerais, são classificadas como agudas ou crônicas e como de origem linfóide ou mieloide. O termo aguda ou crônica referia-se originalmente ao tempo de sobrevivência destes pacientes quando o tratamento ainda não era muito efetivo e indicava a presença de leucemias de sobrevivência curta e longa, respectivamente. No entanto, atualmente o termo é empregado para definir um grupo de leucemias com presença de células imaturas denominadas blastos nas leucemias agudas, ou células mais diferenciadas nas leucemias crônicas (PUI, C.H., 2006). Desta forma, as leucemias compreendem quatro subtipos básicos: leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crônica (LLC) e leucemia mieloide crônica (LMC). A Figura 1.1 mostra a incidência dos principais tipos de leucemia na população infanto-juvenil escandinava. O subtipo de leucemia

característico da população pediátrica é a LLA, incidente em 75-80% dos casos. A LMA compreende cerca de 20% das leucemias desta faixa etária, enquanto as leucemias crônicas são extremamente raras nesta população. A LMC, por exemplo, representa apenas 2% dos casos de leucemia em crianças e adolescentes (PUI, C.H., 2006).

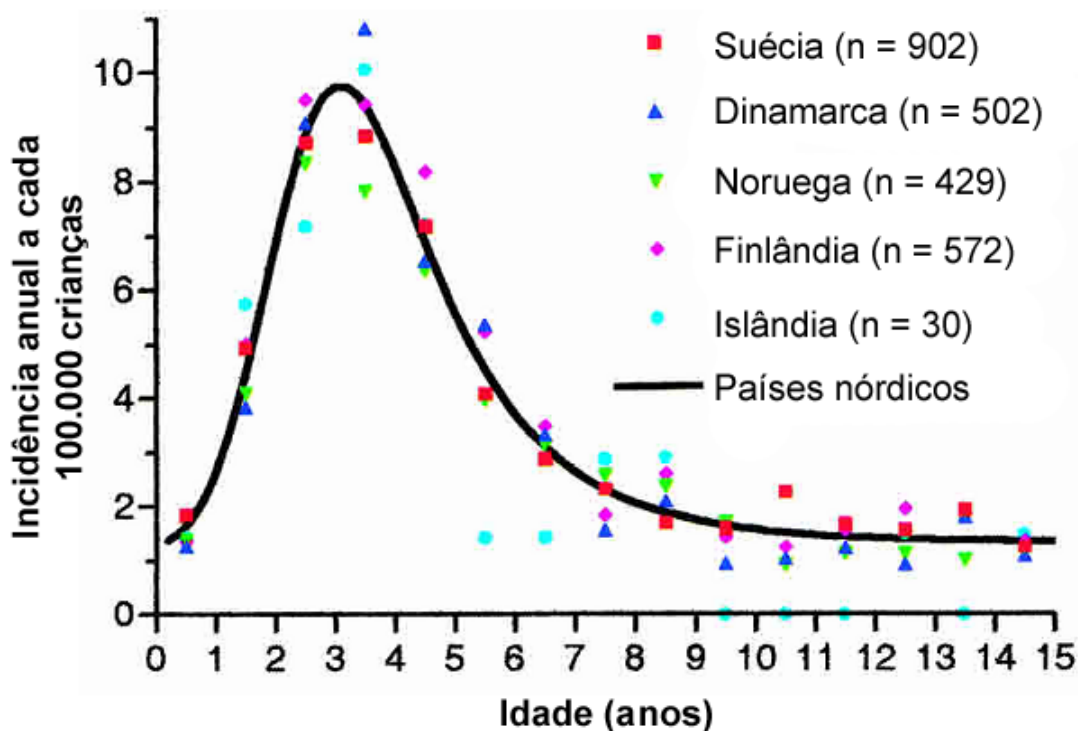


Figura 1.1. Incidência das leucemias pediátricas por faixa etária nos países nórdicos.

Adaptado de: (HJALGRIM *et al.*, 2003).

No ano de 2014, estimou-se 9.370 casos novos de leucemia na população brasileira (5.050 em homens e 4.320 em mulheres). Um estudo brasileiro analisou bancos de dados de 16 registros de base populacional e encontrou uma taxa de incidência mediana ajustada por idade de 53,3 casos de leucemia em crianças (0-14 anos de idade) por milhão de habitantes (DE SOUZA REIS *et al.*, 2011). Conforme ilustrado na Figura 1.1, o pico de incidência de LLA ocorre aos três anos de idade (DE SOUZA REIS *et al.*, 2011; HJALGRIM *et al.*, 2003).

A OMS reconhece dois tipos distintos de leucemias linfoblásticas agudas. De acordo com o padrão imunofenotípico, elas são classificadas em leucemias

linfoblásticas agudas de células precursoras B (LLA-CPB) ou leucemias linfoblásticas agudas de células T (LLA-T) (ARBER *et al.*, 2016). As LLA-CPB são o tipo mais frequente de LLA e compreendem cerca de 75-85% dos casos, enquanto as LLA-T correspondem a 15-25% dos casos (PUI *et al.*, 2004).

### 1.1.1 Grupos citogenético-moleculares

Ainda de acordo com a OMS, as LLA-CPB são estratificadas em dois grupos com base nas alterações citogenéticas para fins preditivos de risco: (1) leucemias linfoblásticas B sem alterações específicas e (2) leucemias linfoblásticas B com anormalidades genéticas recorrentes. O segundo grupo abrange nove subgrupos citogenético-moleculares: t(9;22)(q34;q11.2)/*BCR-ABL1*; t(v;11q23)/rearranjo de *KMT2A (MLL)*; t(12;21)(p13;q22)/*ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)*; com hiperdiploidia; com hipodiploidia; t(5;14)(q31;q32)/*IL3-IGH*; t(1;19)(q23;p13.3)/*TCF3-PBX1* e, mais recentemente, os grupos “*BCR-ABL1-like*” e *iAMP21* (ARBER *et al.*, 2016). As características das alterações citogenéticas e moleculares utilizadas pela OMS para a classificação de subtipos de LLA-CPB, além de outras anormalidades, serão reportadas abaixo.

Primeiramente, cabe destacar que as alterações citogenéticas na LLA-CPB compreendem basicamente dois tipos de alterações: numéricas e estruturais. As variações numéricas correspondem a aneuploidias, ou seja, perdas (hipodiploidia) ou ganhos (hiperdiploidia) de alguns cromossomos. Alterações estruturais referem-se principalmente a translocações cromossômicas, que podem produzir rearranjos gênicos e consequente expressão de transcritos de fusão ou desregulação das isoformas selvagens (ROBERTS; MULLIGHAN, 2015). As principais alterações citogenético-moleculares das LLA-CPB estão representadas na Figura 1.2, onde também é possível notar que a frequência das mesmas varia de acordo com a idade em que a doença é diagnosticada.

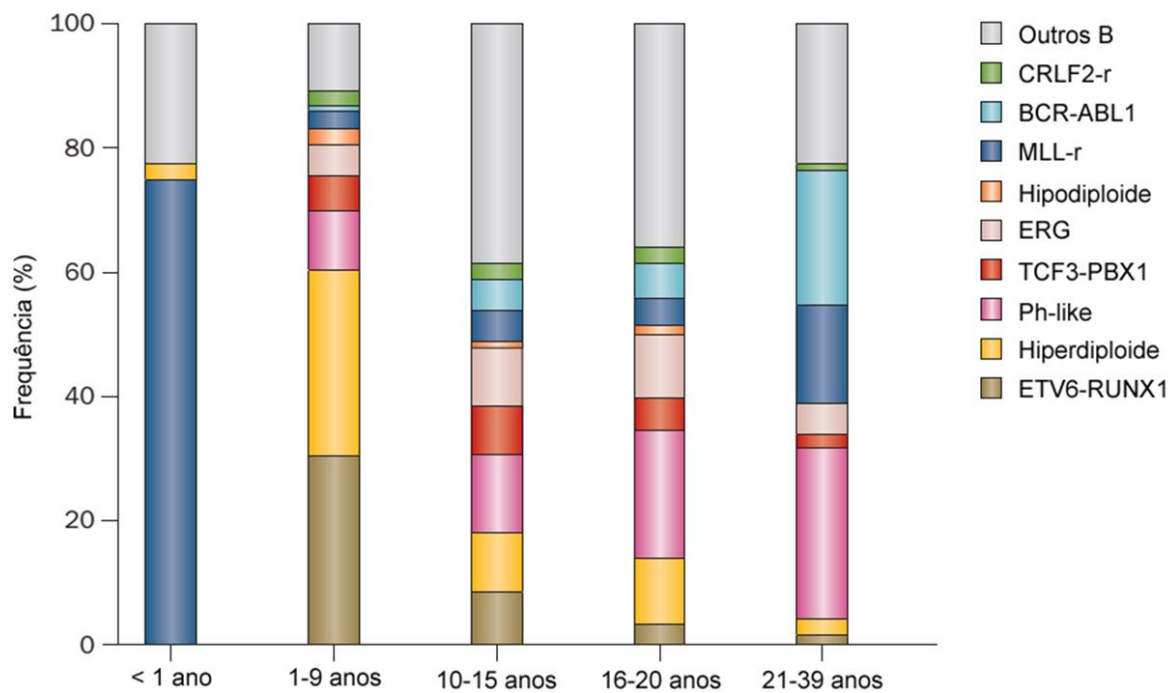


Figura 1.2. Frequência de alterações citogenéticas nos subtipos de LLA-CPB por faixa etária em crianças, adolescentes e adultos.

Adaptado de: (ROBERTS; MULLIGHAN, 2015).

### 1.1.1.1 *ETV6-RUNX1*

A fusão *ETV6-RUNX1* (anteriormente denominada *TEL-AML1*) está presente em 20-22% das LLA-CPB e resulta da translocação (12;21)(p13;q22). Por definição essa é uma translocação críptica, já que os segmentos rearranjados estão presentes próximos aos telômeros dos cromossomos e, portanto, sua detecção torna-se difícil pela cariotipagem convencional. A fusão pode ser detectada por técnicas de biologia molecular através da amplificação do transcrito da fusão (RT-PCR) ou por hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A proteína quimérica *ETV6-RUNX1* provavelmente induz o fenótipo leucêmico através de sua interação com N-CoR, promovendo assim o remodelamento da cromatina para um estado desacetilado e inativo em regiões promotoras de genes importantes para a hematopoese normal. No contexto clínico, as LLA-CPB com *ETV6-RUNX1* são classificadas como de baixo risco terapêutico (PUI, C.H., 2006).



### **1.1.1.2 Alta hiperdiploidia**

A alteração numérica mais frequente na LLA-CPB pediátrica é a hiperdiploidia, caracterizada pelo aumento do número total de cromossomos. Ela é classificada em dois grupos: hiperdiploidia com 47 a 50 cromossomos, ou alta hiperdiploidia, com 51 a 65 cromossomos. A alta hiperdiploidia ocorre em cerca de 20-30% das LLA-CPB pediátricas e geralmente se manifesta a partir do ganho de mais de cinco cromossomos, sendo o X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 e 21 os mais recorrentemente envolvidos. Essa alteração numérica está associada com um prognóstico favorável em pacientes com LLA-CPB (PAULSSON; JOHANSSON, 2009).

### **1.1.1.3 *TCF3-PBX1***

A translocação  $t(1;19)(q23.3;p13.3)$  está presente em 2-6% das LLA-CPB, sendo mais incidente em afro-americanos. Ela possui duas variantes citogenéticas, com presença da translocação balanceada  $t(1;19)$  ou, mais frequentemente, de uma translocação não balanceada que gera um cromossomo derivativo do 19,  $der(19)$ , trissomia do cromossomo 1 e monossomia do 19. Cerca de 90-95% dos casos com a translocação apresentam a fusão *TCF3-PBX1* (também chamada *TFPT-PBX1* ou *E2A-PBX1*). A proteína TCF3 é uma ativadora transcricional, com domínios de ativação na porção N-terminal da proteína e um domínio hélice-alça-hélice na região C-terminal; o último domínio é perdido na proteína de fusão e trocado por domínios de ligação ao DNA de PBX1, alterando assim a função de regulação da linfopoese B da proteína TCF3. Estudos experimentais demonstraram que a proteína de fusão funciona como um oncogene potente e, portanto, tem um papel relevante na leucemogênese (HUNGER, 1996; ASPLAND; BENDALL; MURRE, 2001). Os estudos clínicos em pacientes com *TCF3-PBX1* apresentam resultados variáveis, mas os primeiros estudos a investigarem a relevância clínica dessa alteração concluíram que *TCF3-PBX1* está associado a um prognóstico adverso em crianças, com recaídas no SNC e desfecho desfavorável após a primeira recaída; no entanto, estudos mais recentes permitiram uma maior intensificação da quimioterapia e trouxeram maior benefício terapêutico para esse grupo de pacientes (MOORMAN, 2016).

#### 1.1.1.4 Translocações envolvendo *IGH*

As translocações envolvendo o *locus* da cadeia pesada da imunoglobulina (*IGH*) promovem a justaposição de sua região ativadora da transcrição (*enhancer*) com um gene parceiro, levando à superexpressão do último. O *IGH* está localizado na região telomérica do braço longo do cromossomo 14, banda 14q32.33. Por estar localizado em região críptica, sua identificação foi amplamente facilitada pela utilização de sondas de FISH localizadas centromericamente à região constante de *IGH* e telomericamente à região variante de *IGH*. Como as duas sondas devem estar colocalizadas, a translocação é identificada pela mudança de uma das sondas para um cromossomo derivativo (DYER *et al.*, 2010).

As translocações de *IGH* mais comuns envolvem o *CRLF2* (*Fator Semelhante ao Receptor de Citocina 2*), em 25% dos casos; o *ID4* (*Inibidor 4 da ligação ao DNA*) em 7% dos casos, e membros da família *CEBP* (proteína de ligação ao *enhancer* CCAAT), que juntos somam 10% dos casos. A frequência destas alterações tem relação com a idade, sendo menos frequente (< 3%) em pacientes com menos de dez anos e consideravelmente mais presente (10%) em adolescentes e adultos jovens (DYER *et al.*, 2010; RUSSELL *et al.*, 2014). Estudos revelam que pacientes com translocações envolvendo *IGH* apresentam prognóstico desfavorável (RUSSELL *et al.*, 2014).

#### 1.1.1.5 LLA de células precursoras B-*other*

Cerca de 70% das LLA-CPB pediátricas apresentam alguma alteração genética recorrente. Apesar de serem categorizadas de acordo com o perfil citogenético pela OMS, uma proporção das LLA-CPB não apresenta alterações estabelecidas como marcadores diagnósticos e/ou prognósticos, sendo associada a alterações submicroscópicas identificadas através de técnica de sequenciamento em larga escala (GWAS). Como inicialmente este grupo não foi associado com as alterações até então recorrentes em leucemia, ele foi denominado como leucemia de células precursoras “B-*other*”.

A partir de 2009, diversos estudos de citogenética, sequenciamento de genoma e alteração de números de cópias buscaram revelar os perfis genético-moleculares presentes neste grupo. Den Boer e colaboradores realizaram um estudo genômico em 190 crianças com LLA-T e LLA-CPB (DEN BOER *et al.*, 2009). A análise não supervisionada de expressão gênica destes pacientes foi realizada em duas coortes, alemã (COALL)-92/97 e holandesa (DCOG)-ALL-8/9, e permitiu a identificação de um grupo de 30 amostras (20% dos casos com LLA-CPB) e de 14 amostras (15% dos casos), respectivamente, com perfil de expressão muito semelhante ao encontrado em pacientes com *BCR-ABL1* (Figura 1.3). A análise de sobrevida livre de eventos (SLE) mostrou que eles apresentavam um prognóstico adverso, semelhante ao de pacientes com *BCR-ABL1* positivo. Com isso, eles caracterizaram um novo grupo de LLA-CPB denominado “semelhante ao *BCR-ABL1*” (do inglês *BCR-ABL1-like* ou *Ph-like*).

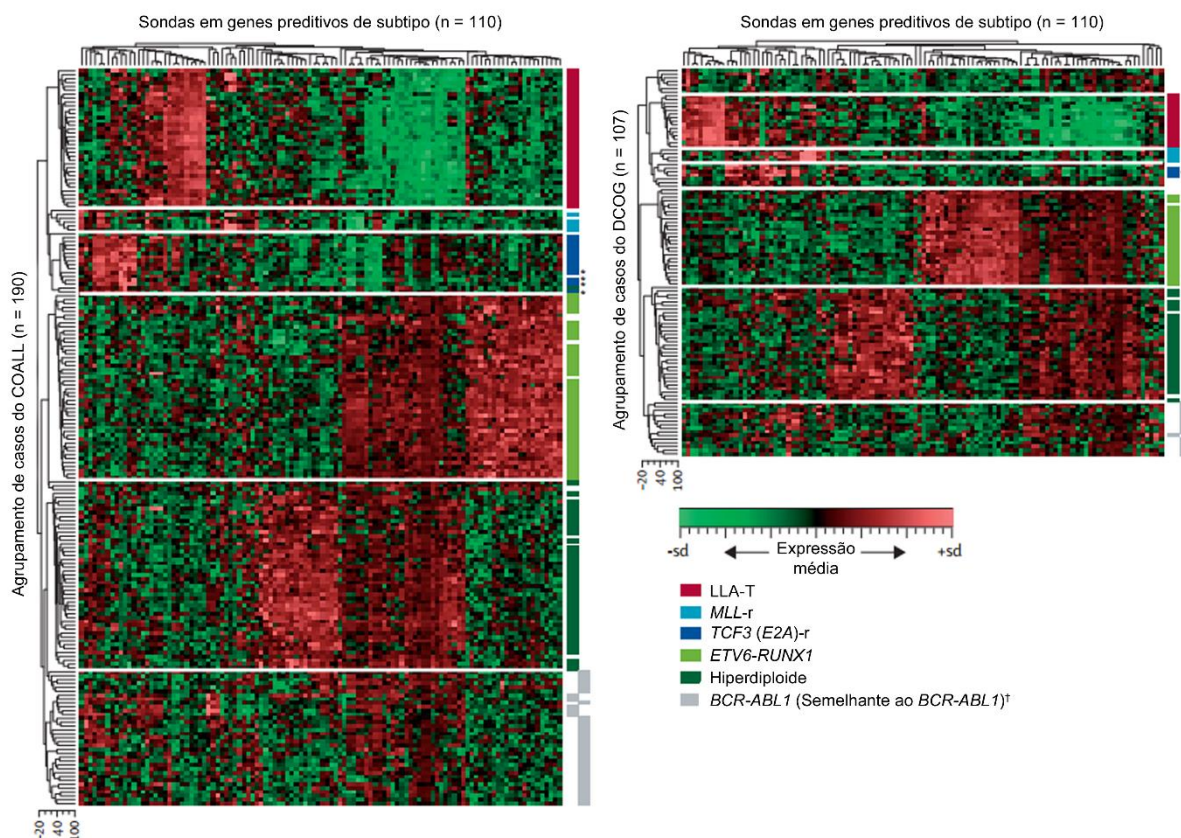


Figura 1.3. Agrupamento de subtipos de LLA de acordo com o perfil de expressão gênica e descoberta do perfil “semelhante ao *BCR-ABL1*”

As cores vermelha e verde indicam maior e menor expressão dos genes comparada à média.

\* Pacientes com subclones com rearranjo de *TCF3* (15-26% de células positivas). † Coluna da direita da barra cinza denota casos “semelhantes ao *BCR-ABL1*”. Adaptado de: (DEN BOER *et al.*, 2009).

Este grupo *Ph-like* constitui aproximadamente 10-15% das LLA-CPB pediátricas e está associado a diversas alterações genéticas em receptores de citocinas e tirosina-quinases, incluindo rearranjos de *CRLF2* (*IGH-CRLF2* e *P2RY8-CRLF2*), de genes da classe do *ABL*, *JAK2* e *EPOR* (Receptor de Eritropoietina), além de mutações ativadoras na via de Ras (*NRAS*, *KRAS*, *PTPN11* e *NF1*) e JAK-STAT (*IL7R*, *FLT3*, *IL2RB*, *JAK1*, *JAK3* e *SH2B3*). A frequência de alterações genéticas no grupo *Ph-like* em (A) crianças e (B) adolescentes está ilustrada na Figura 1.4.

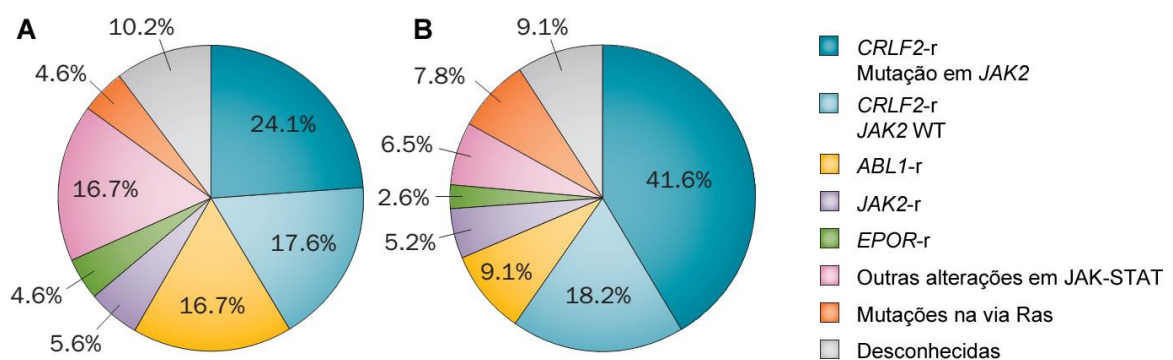


Figura 1.4. Grupos genéticos da LLA-CPB “Ph-like”.

Distribuição de frequência de alterações em (A) crianças entre 1 e 15 anos de idade e (B) adolescentes, de 16 a 20 anos de idade. Adaptado de: (ROBERTS; MULLIGHAN, 2015).

Os rearranjos do *CRLF2* constituem a principal alteração molecular da LLA-CPB *Ph-like* (até 50% dos casos). Eles também ocorrem em mais de 50% das LLA-CPB associadas à síndrome de Down, contando com cerca de 5-16% do total das LLA-CPB. O *CRLF2* localiza-se na região pseudoautossômica 1 (PAR1), comum entre Xp22.3/Yp11.3, e codifica o receptor da linfopietina estromal tímica. O rearranjo do *CRLF2* promove a superexpressão do gene e ativação da via JAK-STAT. A alteração ocorre em duas regiões, a partir de uma translocação envolvendo o locus da cadeia pesada da imunoglobulina na região 14q32 (*IGH-CRLF2*), ou através de uma deleção intersticial no cromossomo X/Y que leva à fusão com o gene *P2RY8* (*P2RY8-CRLF2*) (MULLIGHAN; COLLINS-UNDERWOOD; *et al.*, 2009).

É importante destacar que as *B-other* são definidas como leucemias agudas que não apresentam alguma das alterações citogenéticas definidas pela OMS para a classificação de subgrupos de LLA-CPB. Por outro lado, as *Ph-like* constituem um subgrupo de LLA-CPB com perfil de expressão semelhante ao do subgrupo com a fusão gênica *BCR-ABL1*.

#### **1.1.1.6 *BCR-ABL1***

O *BCR-ABL1* foi o primeiro oncogene de fusão descrito na LLA-CPB. Ele é gerado pelo derivativo der(22), também denominado cromossomo “Philadelphia” (Ph), resultante da translocação t(9;22)(q34;q11.2). A fusão *BCR-ABL1* é característica da leucemia mieloide crônica, presente em 95% dos casos (PUI, C.H., 2006). Apesar disso, ela também é encontrada em 25% das LLA-CPB de adulto e 2-4% das LLA-CPB pediátricas (ROBERTS; MULLIGHAN, 2015).

O *BCR* possui duas regiões de concentração de pontos de quebra: uma região maior (M-bcr) e uma menor (m-bcr), com ~55 Kb. Nas LLA-CPB pediátricas, a fusão *BCR-ABL1* é produzida através da quebra do DNA em uma região de ~200 Kb entre os éxons 1 e 3 de *ABL1*, além da uma quebra em m-bcr do *BCR*, formando uma oncoproteína de fusão com 190 KDa (p190) (KURZROCK *et al.*, 1987).

A proteína ABL selvagem é uma tirosina quinase ativada em resposta a danos ao DNA e induz a parada do ciclo através da ativação de p53. A presença do oncogene de fusão produz uma oncoproteína capaz de induzir a proliferação celular e desregular a apoptose e diferenciação, contribuindo assim para a leucemogênese. Na leucemia pediátrica, *BCR-ABL1* está associado com pacientes mais velhos, com maior leucometria ao diagnóstico e com envolvimento do sistema nervoso central e, portanto, estão relacionados ao grupo de alto risco de recaída (CRIST *et al.*, 1990; MOORMAN, 2016). Pacientes com *BCR-ABL1* também são candidatos à terapias-alvo com inibidores de tirosina-quinases, como Imatinib e Desatinib, que bloqueiam o o domínio catalítico de ABL1 (DRUKER, 2008).

### 1.1.1.7 Rearranjos do *KMT2A* (*MLL*)

Os rearranjos do gene *KMT2A* (*MLL*), localizado na região 11q23 representam ~6% das alterações moleculares da LLA-CPB. Os rearranjos de *KMT2A* (*KMT2A-r*) são característicos da leucemia de lactentes (crianças com idade inferior a 12 meses) e são detectados em cerca de 80-90% dos lactentes diagnosticados com LLA-CBP (EMERENCIANO *et al.*, 2007). O gene codifica a proteína *KMT2A*, que pertence ao grupo *trithorax* (*trxG*) e induz a transcrição de genes da família *HOX* através de sua atividade histona 3 lisina 4 (H3K4) metiltransferase (MILNE *et al.*, 2002; RINGROSE; PARO, 2004). Tendo em vista a importância dos genes da família *HOX* para a regulação da hematopoese normal, o *KMT2A-r* com inúmeros parceiros de fusão conduz à manifestação clínica da leucemia. Cabe ressaltar que o gene *KMT2A* possui 79 parceiros de fusão caracterizados molecularmente, sendo somente nove responsáveis por 91% das translocações em lactentes: *AFF1* (*AF4*), *MLLT3* (*AF9*), *MLLT1* (*ENL*), *MLLT10* (*AF10*), *MLLT4* (*AF6*), *ELL*, *EPS15* (*AF1P*) (MEYER, C.; HOFMANN, J.; *et al.*, 2013). Pacientes com rearranjos envolvendo *KMT2A* são tidos como de alto risco (BEHM *et al.*, 1996).

### 1.1.1.8 iAMP21

A amplificação intracromossômica do 21 (iAMP21) está presente em 2% das LLA-CPB. Ela é mais frequente em crianças com diagnóstico de LLA-CPB em idade mediana de 9 anos, com baixa leucometria e apresenta um prognóstico ruim. Portanto, estas crianças são classificadas como de alto risco e tratadas com terapias mais intensivas. Esta anomalia foi identificada na rotina de investigação da fusão *ETV6-RUNX1* por FISH. Apesar de não apresentarem o sinal característico para a fusão, os blastos leucêmicos apresentaram múltiplos sinais de *RUNX1*, indicando uma amplificação da porção do cromossomo 21 contendo este gene. Com isso, atualmente a iAMP21 é determinada pela detecção de cinco ou mais sinais da sonda de *RUNX1* no cromossomo 21 (HAREWOOD *et al.*, 2003; SOULIER *et al.*, 2003).

### 1.1.1.9 Hipodiploidia

A hipodiploidia é uma aneuploidia caracterizada pela presença de menos de 44 cromossomos. Ela ocorre em 1-3% das LLA-CPB pediátricas e pode ser subclassificada em “quase haploides” (24 a 31 cromossomos), “baixa hipodiploidia” (32 a 39 cromossomos) e “alta hipodiploidia” (40 a 43 cromossomos), sendo referida como uma alteração de alto risco. Em contraste, casos quase diploides (com 44 a 45 cromossomos) podem apresentar outras alterações cromossômicas e, portanto, não têm sido associados com um prognóstico adverso (HARRISON *et al.*, 2004; INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013).

### 1.1.2 Alterações moleculares submicroscópicas adicionais

Da mesma forma que alterações citogenético-moleculares recorrentes variam de acordo com a idade de manifestação da leucemia, as alterações moleculares adicionais também diferem de acordo com a faixa etária dos pacientes. Por exemplo, indivíduos com *KMT2A-AFF1*, cuja alteração é prevalente em lactentes, apresentam em média apenas uma alteração molecular adicional, enquanto crianças com fusões típicas de idades mais tardias (*ETV6-RUNX1* e *BCR-ABL1*) possuem cerca de 6-8 alterações adicionais, uma observação coerente com a ideia de que as alterações adicionais são acumuladas temporalmente. A exceção existe para casos com fenótipo hipermutante, que apresentam inúmeras alterações adicionais. Esse desbalanço pode ser explicado pela presença de mutações em genes relacionados ao reparo do DNA nesse grupo de pacientes (INABA *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2015).

As alterações adicionais geralmente representam variações do número de cópias do DNA ou mutações pontuais e ocorrem em genes chave para processos de regulação da hematopoese normal. Portanto, essas mutações incidem principalmente em genes que codificam fatores de transcrição relacionados à hematopoese e desenvolvimento de células B (*ETV6*, *PAX5* e *IKZF1*), genes relacionados ao controle do ciclo celular (*CDKN2A/B*, *TP53* e *NT5C2*), à sinalização e ativação de vias de citocina (*CRLF2* e *JAK1/JAK2*) e modificação de histonas (*CREBBP*).

Os genes *ETV6*, *PAX5* e *IKZF1* estão alterados em cerca de 22%, 31,7% e 13-15% das LLA-CPB, respectivamente. Como as alterações moleculares adicionais não ocorrem de forma randômica nas LLA-CPB, elas apresentam maior frequência em subgrupos citogenéticos específicos. Por exemplo, deleções em *ETV6* ocorrem em cerca de 54% dos pacientes com a fusão *ETV6-RUNX1*. Essas deleções podem ser detectadas tanto por sondas de FISH para a investigação da translocação, quanto pela técnica de MLPA. Alterações em *PAX5* e *IKZF1* ocorrem principalmente nos subgrupos com *BCR-ABL1* (45% e 64%, respectivamente) e LLA-CPB B-*other* (36% e 24%, respectivamente). Além disso, deleções em *IKZF1* estão associadas com hiperdiploidias (9%) e raramente ocorrem em conjunto com a fusão *ETV6-RUNX1* (3%) (SCHWAB *et al.*, 2013).

A deleção de *CDKN2A/B* é a alteração molecular adicional mais frequente na LLA-CPB. Ela acontece em cerca de 16% das LLA-CPB com hiperdiploidia e 47% das LLA-CPB B-*other*. Geralmente ela está associada a perdas do 9p visíveis citogeneticamente e, portanto, à deleção de *PAX5*, localizado na mesma região. Além disso, a deleção de *CDKN2A/B* no cromossomo 9 também pode acontecer concomitantemente com a deleção de *IKZF1* no cromossomo 7 e a frequência da codeleção aumenta gradualmente com a idade em que o paciente é diagnosticado com LLA-CPB (SCHWAB *et al.*, 2013).

Em 2014, um estudo identificou através de hibridização genômica comparativa a presença de deleções intragênicas de *ERG* (*Gene Relacionado ao Ets*) exclusivamente nas LLA-CPB B-*other*. A literatura mostra que as deleções de *ERG* estão presentes em 10-15% das LLA-CPB desse grupo, ou seja, cerca de 3-5% de todas as LLA-CPB. As deleções em *ERG* foram frequentemente encontradas em conjunto com deleções de *IKZF1* (~40% dos casos), principalmente  $\Delta 4-7$ . Além disso, as codeleções de *ERG* e *IKZF1*  $\Delta 4-7$  conferiram uma sobrevida livre de eventos em oito anos igual a 85,7%, enquanto pacientes com deleção exclusiva em *IKZF1* tiveram uma SLE de apenas 51,3% no mesmo período. Apesar de deleções em *ERG* poderem definir este grupo de leucemias, estas alterações parecem ser subclonais e, portanto, podem ser adquiridas ou perdidas entre o diagnóstico e a recaída (CLAPPIER *et al.*, 2014; ZALIOVA *et al.*, 2014).



As alterações adicionais nas LLA-CPB também são caracterizadas por mutações pontuais em genes como *TP53*, *NT5C2*, *JAK1/2* e *CREBBP*. Mutações em *TP53* são encontradas em apenas 3% das LLA-CPB. Elas são herdadas em 50% dos casos de LLA-CPB, ou presentes em clones minoritários ao diagnóstico e presentes majoritariamente na recaída (HOF *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2015). Uma caracterização genômica de 124 crianças com LLA-CPB e hipodiploidia revelou que mais de 70% dos casos “quase haploides” apresentam alterações nas vias de sinalização de Ras e de receptores tirosina quinase. Além disso, a “baixa hipodiploidia” foi associada com alterações em *TP53* (91,2%), *IKZF2* (52,9%) ou *RB1* (41,2%) (HOLMFELDT *et al.*, 2013).

O gene *NT5C2* codifica a 5'-nucleotidase, sendo importante no metabolismo intracelular de purinas e apresenta mutações observadas em até 20% das recaídas de LLA-CPB, as quais estão associadas com recaídas precoces. As mutações presentes na recaída (Arg238Trp, Arg367Gln e Ser445Phe) aumentam a atividade da enzima comparada à proteína selvagem e provavelmente levam à resistência contra a quimioterapia com análogos de purina, considerando que clones com a mutação tornam-se majoritários a partir do manutenção do tratamento com este grupo de medicamento (MEYER, J. A. *et al.*, 2013).

Mutações em Janus quinase 1 e 2 (*JAK1/JAK2*) foram reportadas em 18-35% das LLA-CPB associadas à síndrome de Down e 10,7% da LLA-CPB de alto risco com *BCR-ABL1* negativo (GAIKWAD *et al.*, 2009; MULLIGHAN; ZHANG; *et al.*, 2009). Estas mutações ocorrem em resíduos altamente conservados do domínio quinase e pseudoquinase das proteínas e levam à ativação constitutiva da via JAK-STAT, importante para a transformação maligna de células com a fusão *BCR-ABL1* (XIE *et al.*, 2001; XIE *et al.*, 2002).

Por fim, mutações e deleções focais em *CREBBP* ocorrem em 19% das recaídas de LLA-CPB e estão associadas com a resistência ao tratamento com glicocorticoides. O gene *CREBBP* codifica a proteína de ligação à CREB e tem papel importante no remodelamento da cromatina para a ligação de fatores de transcrição ao DNA (MULLIGHAN *et al.*, 2011).

### 1.1.3 Marcadores de risco terapêutico

A estratificação de risco na LLA-CPB é importante para o estabelecimento da intensidade do tratamento, que consiste em três fases: indução da remissão (fase do tratamento com duração de 4-6 semanas), intensificação/consolidação (duração de 6-9 meses, com o objetivo de depletar alguma doença residual) e manutenção/continuação (tratamento prolongado e menos agressivo), com duração total de cerca de dois anos. Além disso, os protocolos incluem o tratamento direcionado ao sistema nervoso central (SNC) desde a fase de indução para evitar recaída neste local e eventualmente o transplante alogênico de medula óssea (MO) para pacientes com alto risco de recaída ou que não apresentam resposta ao tratamento (INABA *et al.*, 2013).

Os critérios que determinam os grupos de risco terapêutico na LLA-CPB foram definidos pelo Instituto Nacional de Câncer dos EUA através de análise de dados de estudos clínicos de vários grupos de pesquisa em LLA-CPB. Desta forma, pacientes com alto risco terapêutico foram definidos segundo a idade (< 1 ano e ≥ 10 anos) e leucometria ( $\geq 50.000 \times 10^6/L$ ). Atualmente outras variáveis também foram relacionadas ao alto risco terapêutico em pacientes com LLA-CPB; são elas: sexo (masculino), envolvimento do SNC ou dos testículos, alterações citogenéticas (hipodiploidia, *BCR-ABL1*, *KMT2A-AFF1* e *iAMP21*) e moleculares (deleções de *IKZF1*), além da baixa resposta à indução, com presença de doença residual mínima (DRM) ou falha na indução (SMITH *et al.*, 1996; PUI, C. H. *et al.*, 2011; WAANDERS *et al.*, 2011; CAMPANA, 2012).

Por outro lado, alterações citogenéticas como a alta hiperdiploidia e a fusão *ETV6-RUNX1* estão associadas a um prognóstico favorável. Conseqüentemente, a maior frequência destas aberrações citogenético-moleculares em pacientes diagnosticados com LLA-CPB com idade entre 1 e 10 anos é uma das explicações para esta faixa etária estar associada ao risco padrão. A sobrevida livre de eventos de grupos citogenético-moleculares das LLA-CPB está representada na Figura 1.5.

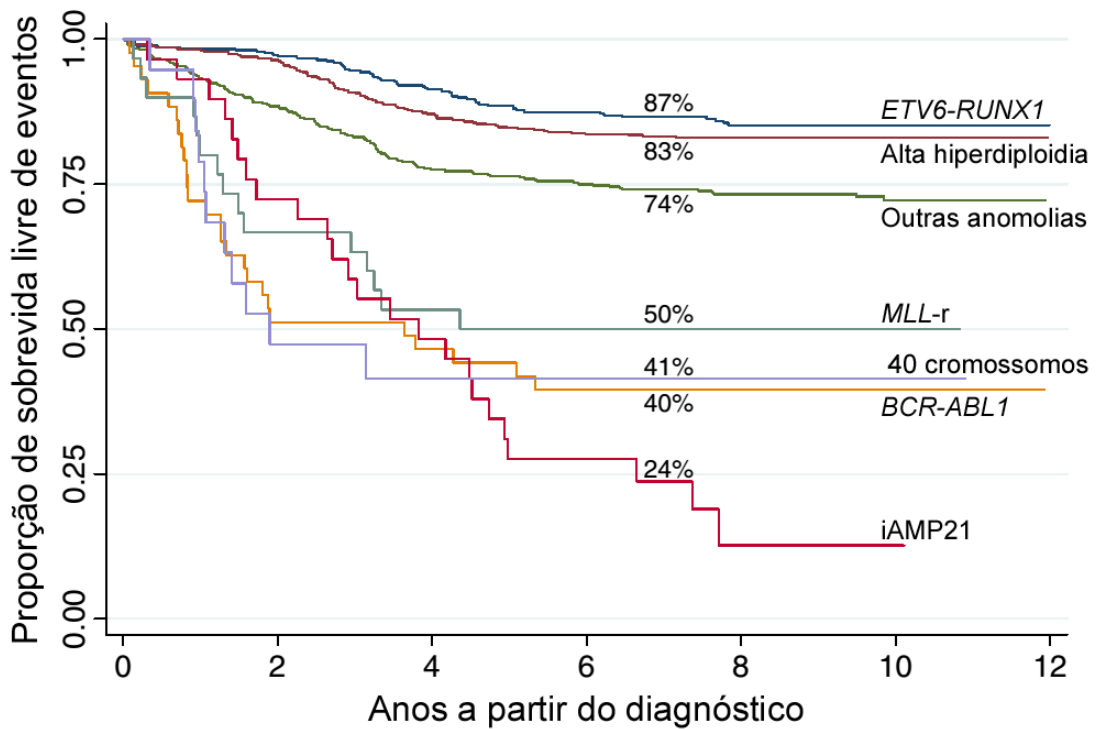


Figura 1.5. Sobrevivência livre de eventos em diferentes grupos citogenéticos.

Foram destacadas as SLE em sete anos para cada grupo. Adaptado de: (MOORMAN, 2012).

Cabe ressaltar que o gene *Ikaros* (*IKZF1*) é um novo marcador na predição de risco de recaída na LLA-CPB e tem sido alvo de intensa investigação, com base na diversidade de alterações presentes no gene e na sua importância para a classificação de pacientes com alto risco terapêutico (MULLIGHAN; SU; *et al.*, 2009). Tendo em vista a importância clínica de *IKZF1*, o próximo capítulo abordará com mais detalhe a função, os tipos de alteração no gene, seu impacto na terapia e os métodos diagnósticos atuais para a detecção de anomalias no gene.

## 1.2 *Ikaros* (*IKZF1*)

### 1.2.1 Aspectos gerais

O gene *Ikaros* (*IKZF1*) está localizado na região cromossômica 7p12 e abrange uma sequência de ~121 Kb. Ele codifica o fator de transcrição Ikaros, uma proteína com 519 resíduos de aminoácidos essencial para o desenvolvimento da linhagem linfóide. O *IKZF1* possui 8 éxons e apresenta seis domínios “*zinc-finger*”, codificados pelos éxons 4, 5, 6 e 8. Nos éxons 4-6, são codificados quatro domínios “*zinc-finger*”, dos quais três são necessários para a ligação ao DNA. No éxon 8 são codificados dois domínios adicionais presentes na porção C-terminal da proteína. Eles são necessários tanto para a homo dimerização de Ikaros com suas diferentes isoformas quanto para sua dimerização com outros membros da família (REBOLLO; SCHMITT, 2003). A família Ikaros possui cinco genes: *Ikaros* (*IKZF1*, presente na região 7p12); *Helios* (*IKZF2*, região 2q34), *Aiolos* (*IKZF3*, região 17q12-21.1), *Eos* (*IKZF4*, região 12q13.2) e *Pegasus* (*IKZF5*, região 10q26.13). Todos os membros compartilham a mesma estrutura gênica, exibem um número variável de isoformas e estão envolvidos na diferenciação da linhagem linfóide (GEORGOPOULOS; MOORE; DERFLER, 1992; REBOLLO; SCHMITT, 2003).

O *IKZF1* codifica onze isoformas diferentes: cinco destas isoformas são traduzidas em proteínas ativadoras da transcrição (IK1, IK2, IK2a, IK3, IK3a), enquanto seis isoformas resultam nas versões de Ikaros têm função dominante-negativa (IK4, IK4a, IK5, IK6, IK7, IK8). Em geral, as proteínas codificadas pelas isoformas dominante-negativas carecem de um domínio de ligação ao DNA e, por não exercerem sua função normal, competem com isoformas selvagens. Portanto, o acoplamento de qualquer isoforma dominante-negativa de Ikaros com uma isoforma ativa resulta na supressão de sua função (REBOLLO; SCHMITT, 2003). Fisiologicamente, Ikaros está envolvida na regulação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) através da expressão das isoformas IK1 e IK2 (EZZAT *et al.*, 2006). Esta expressão é essencial para o desenvolvimento do sistema neuroendócrino, conhecido por controlar reações de estresse corporal e por coordenar a resposta imune/inflamatória (CHROUSOS; KINO, 2005).

A proteína Ikaros compõe um complexo regulador que envolve os fatores de transcrição hematopoiéticos E2A, EBF(1-3) e PAX5 com função de direcionar o desenvolvimento linfóide. Esta afirmativa se sustenta em estudo com modelo

transgênico murino em que Ikaros, quando inativado, resultou na perda completa de células B (GEORGOPOULOS *et al.*, 1994).

Mutações na família *Ikaros* são identificadas em diversas leucemias agudas (*IKZF1* está associado com LLA-CPB, LLA-T e LMA; alterações de *IKZF2* foram encontradas em LLA-T; deleções de *IKZF3* foram identificadas em LLA-CPB). Um resumo das isoformas codificadas por *IKZF1* está ilustrado na Figura 1.6. Ela destaca a isoforma IK1 de *IKZF1*, com uma região de ligação ao DNA (DBD, do inglês *DNA binding domain*), um domínio de ativação (AD) e um domínio de dimerização (DD), além das onze isoformas de *IKZF1*, que controlam positiva ou negativamente a ativação de genes reguladores da diferenciação linfóide.

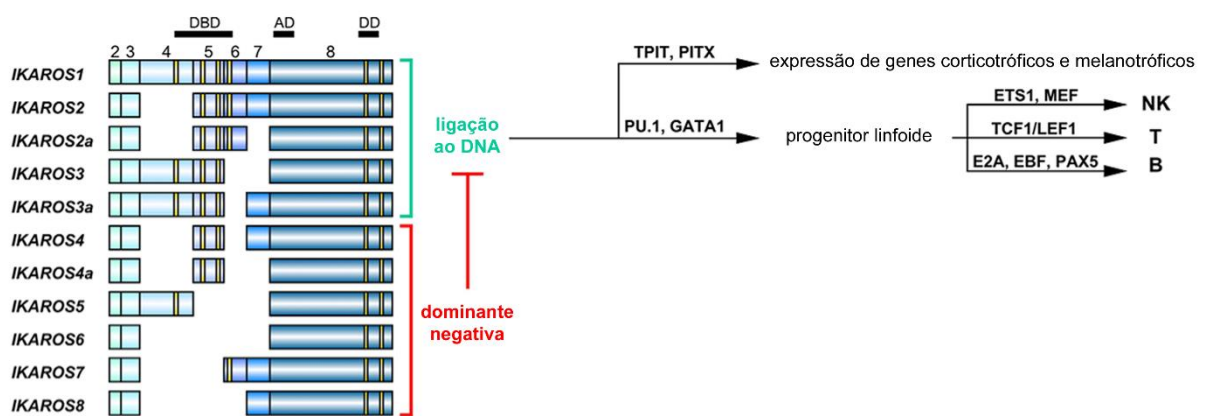


Figura 1.6. Isoformas de *IKZF1* e sua função biológica.

Na esquerda da figura, estão ilustradas todas as isoformas do transcrito de *IKZF1*, sendo *IKAROS1* (IK1) a isoforma selvagem. Diferentes isoformas de *splicing* codificam proteínas IKAROS sem alguns domínios *zinc-finger*, que estão associadas o fenótipo dominante-negativo da proteína. As isoformas IK1-3 apresentam pelo menos três domínios *zinc-finger* e são capazes de se ligar ao DNA para controlarem a expressão de genes importantes para a hematopoiese, principalmente no processo de diferenciação linfóide. Adaptado de: (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013).

## 1.2.2 Alterações no gene *Ikaros*

O primeiro estudo que demonstrou a importância da deleção em *IKZF1* na LLA-CPB pediátrica foi publicado em 2007 (MULLIGHAN *et al.*, 2007). Uma análise genômica de 242 pacientes revelou que vários genes envolvidos na diferenciação da linhagem B podem conter mutações em casos de LLA-CPB (MULLIGHAN *et al.*, 2007). Estes esforços identificaram as primeiras deleções em *IKZF1* e *IKZF3* (além de *PAX5*, *E2A*, *EBF1* e *LEF1*). Estes achados iniciais foram validados em 40 pacientes com LLA-CPB pediátrica e novamente mostrou deleções submicroscópicas recorrentes em vários genes ligados ao desenvolvimento da célula B (*IKZF1*, *PAX5*, *TCF4*, *EBF1* e outros) (KUIPER *et al.*, 2007).

As deleções de *IKZF1* ocorrem em cerca de 15% das LLA-CPB pediátricas (KUIPER *et al.*, 2007). Estas deleções são mais frequentes nos grupos citogenéticos *BCR-ABL1* (75% com  $\Delta IKZF1$ ) e do grupo citogenético da LLA-CPB *B-other* (30% com  $\Delta IKZF1$ ); por outro lado, deleções de *IKZF1* são raras no grupo citogenético com a fusão *ETV6-RUNX1* (3-6% apresentam  $\Delta IKZF1$ ) (MULLIGHAN *et al.*, 2008; OLSSON; JOHANSSON, 2015). Além disso, as deleções de *IKZF1* também foram encontradas em outras neoplasias hematológicas, como a LMC na crise blástica (60% dos casos) e LMA decorrente de doença mieloproliferativa (21% dos casos) (NAKAYAMA *et al.*, 1999; JAGER *et al.*, 2010).

Através do uso de diferentes estratégias genômicas de PCR, Iacobucci *et al.* investigaram uma série de 106 pacientes com LLA-CPB e *BCR-ABL1* (IACOBUCCI *et al.*, 2009). Destes, 80 pacientes (75%) possuíam deleções de *IKZF1*, sendo 85% destas deleções do tipo monoalélica. Foram encontrados dois perfis de deleção mais frequentes nos casos com *BCR-ABL1* e deleção de *IKZF1*:  $\Delta 4-7$  (42%) e  $\Delta 2-7$  (18%). Apenas os pacientes com deleções  $\Delta 4-7$  ( $n = 44$ ) expressaram a isoforma de Ikaros dominante-negativa IK6, demonstrando que a isoforma é exclusiva deste perfil de deleção. Por outro lado, deleções envolvendo os éxons 1 e 2 tem sido associadas à haploinsuficiência de Ikaros, visto que há ausência da região de iniciação da transcrição e do códon de iniciação da tradução do gene. Outras deleções de *IKZF1* incluem  $\Delta 1-3$ ,  $\Delta 1-7$ ,  $\Delta 1-8$ ,  $\Delta 2-3$ ,  $\Delta 2-8$ ,  $\Delta 3-7$  e  $\Delta 4-8$ .

As lesões focais no *IKZF1* estão associadas com a expressão de transcritos alternativos e variantes dominante-negativas, enquanto as lesões amplas (deleção  $\Delta 1-8$ ) levam à perda completa de um dos alelos do gene, ou seja, a hemizigose do

gene. Iacobucci *et al.* identificaram 13 pacientes (12%) com LLA-CPB e monossomia do cromossomo 7 e, conseqüentemente, hemizigose de *IKZF1*. Além disso, um caso com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 também apresentou  $\Delta$ 4-7 no outro alelo (IACOBUCCI *et al.*, 2009). Um resumo do perfil e da frequência das deleções em *IKZF1* está ilustrado abaixo (Figura 1.7).

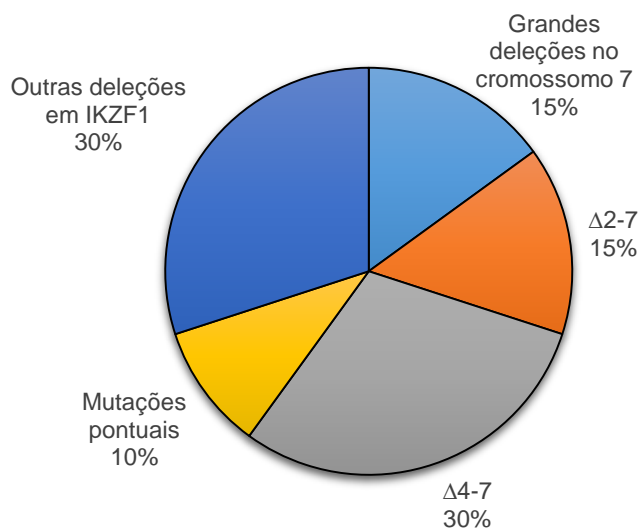


Figura 1.7. Perfil das mutações em *IKZF1*.

Adaptado de: (KASTNER *et al.*, 2013).

Com o objetivo de explorar os mecanismos que levariam às deleções de *IKZF1*, Mullighan e colaboradores sequenciaram amostras com *IKZF1*  $\Delta$ 4-7 e encontraram sequências sinalizadoras de recombinação (do inglês *recombination signal sequences*, RSSs) nas proximidades do ponto de quebra das deleções, além de um número variável de nucleotídeos adicionais. Como as sequências RSS são reconhecidas pela enzima de ativação da recombinação (RAG) para realizar o rearranjo V(D)J das imunoglobulinas e a enzima deoxinucleotidil terminal transferase (TdT) adiciona nucleotídeos a esta sequência, estes dados levaram os autores a sugerirem que as deleções de *IKZF1* acontecem através de um mecanismo de recombinação mediado por RAG (MULLIGHAN *et al.*, 2008).

Conforme revisado por Schatz e Yanhong, RAG1 e RAG2 são essenciais para o rearranjo V(D)J. A iniciação da recombinação é orquestrada pela (1) hiperexpressão das proteínas RAG durante estágios iniciais da linfopoese, (2) acessibilidade de sítios RSS na cromatina e (3) pela estrutura tridimensional do

cromossomo e da região de recombinação, visto que a aproximação de estruturas distintas é vital para o rearranjo de segmentos de genes afastados entre si (SCHATZ; JI, 2011).

As sequências RSS localizam-se nas adjacências da região onde será feita a recombinação. As RSSs consistem de dois elementos conservados, um heptâmero (5'-CACAGTG-3') e um nonâmero (5'-ACAAAACC-3'), separados por uma região menos conservada de 12 ou 23 pares de base; estes espaçadores definem as chamadas 12RSS e 23RSS, respectivamente. Cabe ressaltar que o rearranjo geralmente ocorre entre uma 12RSS e uma 23RSS.

O processo de recombinação inicia-se com a ligação de RAG1 à sequência do nonâmero. O heptâmero auxilia a ligação e especifica o local da quebra do DNA, provavelmente a partir de uma alteração na estrutura do DNA. Os três primeiros nucleotídeos do heptâmero (5'-CAC) são essenciais para esta mudança e são invariáveis em sequências RSSs funcionais. As proteínas RAG1, RAG2 e HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) ligam-se a uma RSS para formar um complexo sinalizador que captura outra RSS, formando o complexo sináptico ou de pareamento. A clivagem do DNA ocorre em duas etapas: primeiro a RAG faz uma clivagem entre o heptâmero e o segmento do gene, expondo assim o grupo 3'-OH que liga-se à outra fita. Isso gera uma dupla quebra no DNA e formação de um grampo no complexo pareado. O corte das fitas pode acontecer em ambos os complexos, sinalizador ou de pareamento (SWANSON, 2004). A sequência RSS e todas as reações e etapas necessárias para a recombinação mediada por RAG estão ilustradas na Figura 1.8.



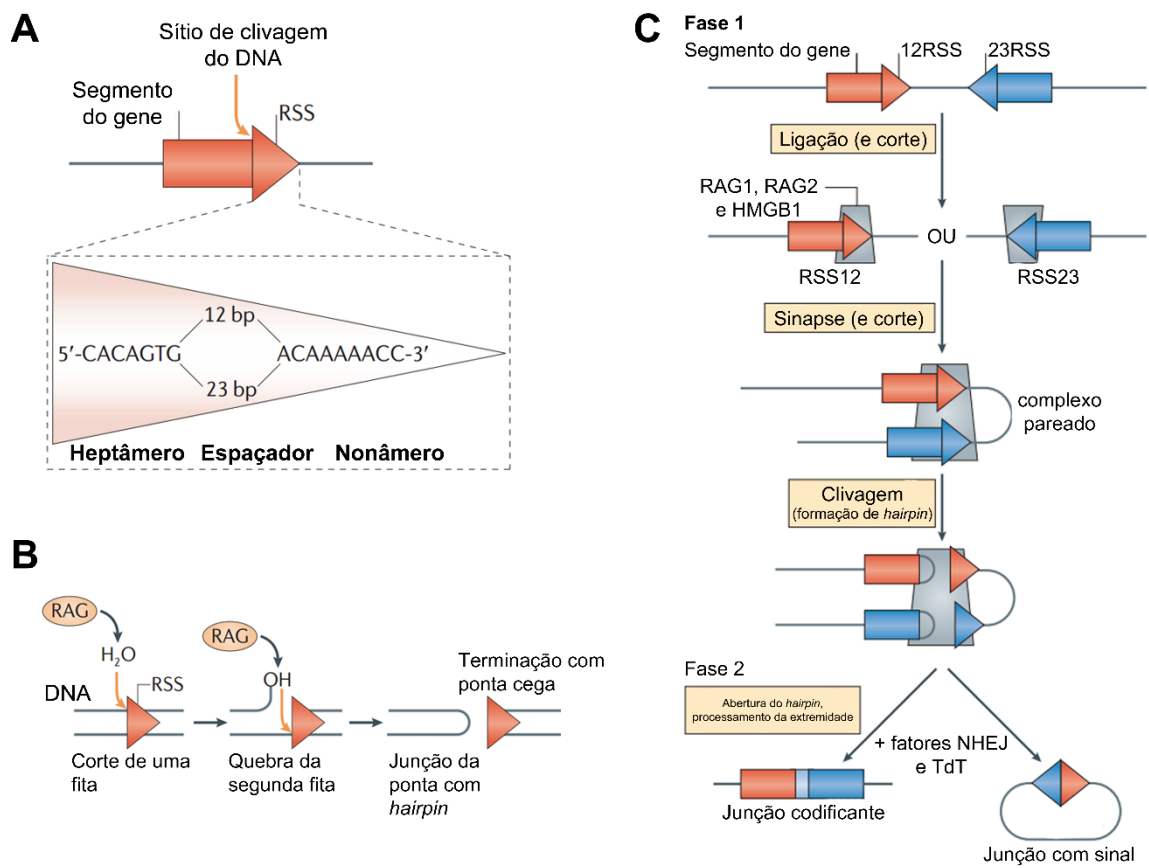


Figura 1.8. Recombinação gênica mediada por RAG.

A figura ilustra (A) a sequência sinal de recombinação (RSS) de RAG e do segmento do gene que será rearranjado através de uma seta vermelha. A RSS foi representada pela ponta triangular da seta, sendo formada pelo conjunto de um heptâmero (5'-CACAGTG-3') e um nonâmero (5'-ACAAAACC-3') separados por 12 ou 23 pares de base. (B) Representação dos passos para a quebra do DNA por RAG, onde primeiramente há clivagem de uma das fitas, seguido de corte da segunda fita e junção das pontas no segmento do gene e presença de ponta cega na região da RSS. (C) As etapas do rearranjo V(D)J são resumidas em duas fases, com (1) reconhecimento das RSSs, pareamento de RSSs (geralmente 12-RSS com 23 RSS) e corte das fitas. Em seguida, ocorre a ligação dos segmentos de DNA e adição de nucleotídeos pela proteína TdT, produzindo o rearranjo do DNA. Adaptado de: (SCHATZ; JI, 2011).

### 1.2.3 Impacto prognóstico de alterações no *Ikaros*

Apesar da alta taxa de cura na LLA-CPB, cerca de 20% destes pacientes ainda apresentam recaída após alcançarem a remissão. Com base neste fato, inúmeros estudos buscam novos marcadores de risco terapêutico que possam contribuir para uma melhor estratificação de risco e aperfeiçoamento do tratamento em grupos de pacientes com alto risco de recaída e para evitar o emprego desnecessário de terapias tóxicas em pacientes com baixo risco. Em 2009, Mullighan e colaboradores publicaram um trabalho onde revelaram o *IKZF1* como um importante marcador na predição de risco de recaída na LLA-CPB (MULLIGHAN; SU; *et al.*, 2009). Neste estudo foram avaliadas alterações de número de cópias em 221 crianças com LLA-CPB de alto risco. Após verificarem que deleções e mutações (seis novas alterações, incluindo trocas de resíduo de aminoácido, do inglês *missense*: G158S; mudanças do código de leitura, *frameshift*: L117fs, H224fs, S402fs e E504fs, e uma mutação sem sentido, *nonsense*: R111) em *IKZF1* estão associadas ao maior risco de recaída na LLA-CPB de alto risco (Figura 1.9A), eles elegeram uma coorte de validação independente, com 258 pacientes diagnosticados com LLA-CPB, na qual confirmaram o papel de *IKZF1* como um marcador preditivo de prognóstico adverso (Figura 1.9B). O mesmo resultado foi encontrado após a exclusão de pacientes com a fusão *BCR-ABL1* (Figura 1.9C).

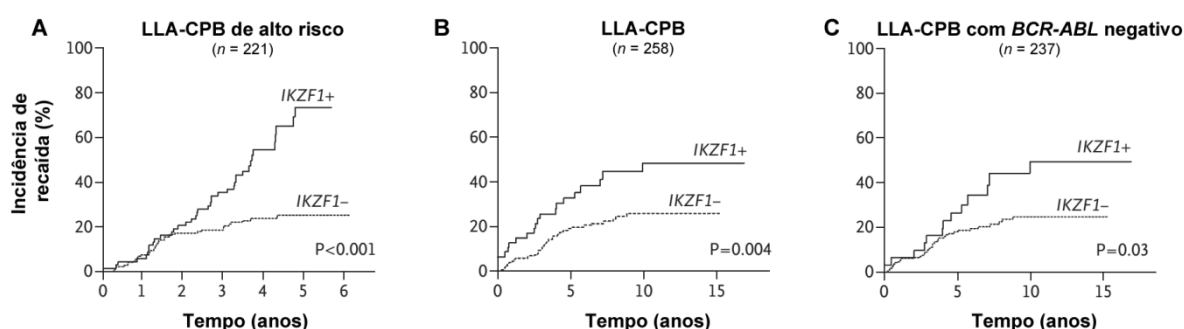


Figura 1.9. Incidência cumulativa de recaídas em pacientes com LLA-CPB.

As curvas de sobrevida ilustram a incidência de recaídas na coorte de validação do estudo de Mullighan e colaboradores de acordo com o *status* de *IKZF1* em diferentes subgrupos de LLA-CPB, os quais incluem (A) LLA-CPB de alto risco, (B) em todos os casos de LLA-CPB incluídos no estudo e (C) pacientes *BCR-ABL1* negativos. Na análise *IKZF1* positivo (+) e negativo (-) referem-se aos pacientes com *IKZF1* deletado e selvagem, respectivamente. Adaptado de: (MULLIGHAN; SU; *et al.*, 2009).

A deleção de *IKZF1* e de outros genes importantes para o desenvolvimento normal da célula B leva à depleção ou bloqueio de proteínas essenciais para a hematopoese da célula B e provavelmente resultam no acúmulo de células imaturas, contribuindo assim para um pior prognóstico. Este fato também foi observado no estudo clínico do grupo de Martinelli e colaboradores, que investigou o prognóstico de pacientes em LLA-CPB e *BCR-ABL1* positivo (MARTINELLI *et al.*, 2009). O trabalho mostrou que pacientes com deleções em *IKZF1*, quando comparados com aqueles sem deleção, apresentaram redução significativa no tempo de sobrevida livre de doença (de 32 para 10 meses, respectivamente) e na incidência cumulativa de recaída (de 56,1 para 10,1 meses, respectivamente). É importante notar que deleções em *IKZF1* foram associadas ao pior prognóstico independente da presença da fusão *BCR-ABL1* e de outros marcadores de risco. Portanto, as alterações em *IKZF1* passaram a ser um marcador adicional na classificação destes pacientes como alto risco.

Vários estudos subsequentes têm demonstrado o efeito negativo de deleções em *IKZF1* no prognóstico de LLA-CPB (MARTINELLI *et al.*, 2009; MULLIGHAN; SU; *et al.*, 2009; KUIPER *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2011; ASAI *et al.*, 2013; DORGE *et al.*, 2013; OLSSON *et al.*, 2014; VAN DER VEER *et al.*, 2014). Os efeitos clínicos das deleções de *IKZF1* e os resultados dos estudos biológicos foram compilados em revisão (ROBERTS; MULLIGHAN, 2011). Uma meta-análise recente estudou a associação entre *IKZF1* e o prognóstico da LLA-CPB, a partir da identificação de 15 estudos com um total 5.021 pacientes (JIA *et al.*, 2014). O trabalho confirmou o papel das deleções em *IKZF1* como marcador de alto risco, mostrando que estas deleções apresentam impacto negativo tanto na sobrevida livre de eventos (HR = 2,32; 95%CI: 1.97–2.74) quanto na sobrevida global (HR = 2,56; 95%CI: 1.75–3.74) de pacientes com LLA-CPB.

Apesar do conhecimento da existência de diversos tipos de deleção de *IKZF1*, a relevância clínica de cada tipo de alteração ainda era desconhecida até recentemente. Em 2014, van der Veer e colaboradores buscaram responder essa questão ao analisarem o prognóstico de pacientes com LLA-CPB e *BCR-ABL1* positivo de acordo com o tipo de deleção de *IKZF1* (VAN DER VEER *et al.*, 2014). Eles compararam os grupos com deleções associadas com fenótipos dominante negativos ( $\Delta$ 4-7), haploinsuficientes (deleções completas,  $\Delta$ 1-8, ou deleções focais incluindo o éxon 1 ou 2, como  $\Delta$ 2-7) e deleções raras ( $\Delta$ 1-3) com o grupo

selvagem, sem deleções de *IKZF1* (Figura 1.10). O resultado mostrou que a sobrevida livre de doença em quatro anos nos pacientes com haploinsuficiência foi inferior à de pacientes sem deleção (37,1% contra 78,6%, respectivamente). Os grupos com isoformas dominantes negativas e outras alterações não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo selvagem. Após esse trabalho, um estudo colaborativo internacional incluiu 134 casos de LLA-CPB com deleções em *IKZF1* e concluiu que casos com  $\Delta$ 4-7,  $\Delta$ 1-8 (deleção completa do gene) e deleções raras de *IKZF1* apresentam prognóstico desfavorável, independentemente do tipo de deleção (VAN DER VEER *et al.*, 2015).

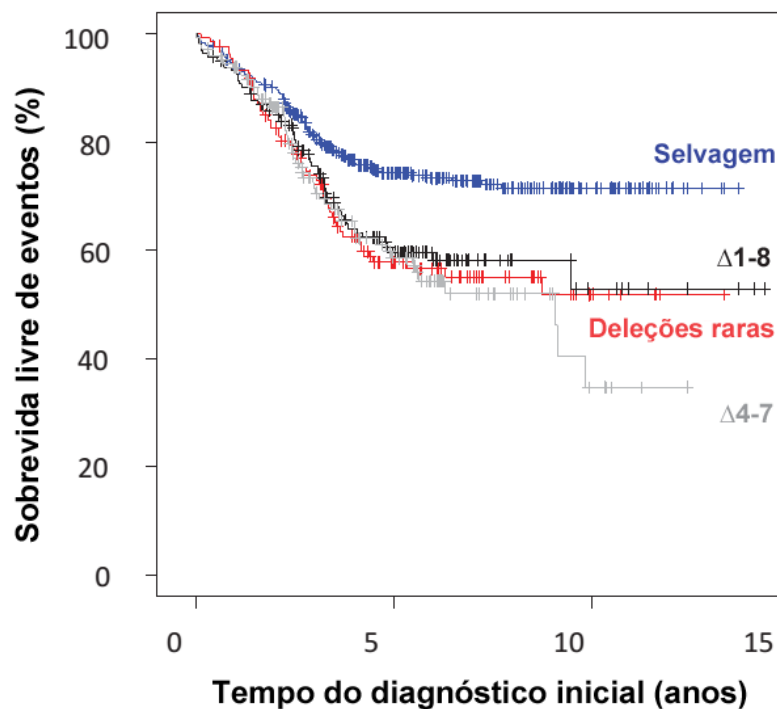


Figura 1.10. Prognóstico de casos com deleções de *IKZF1*.

Adaptado de: (VAN DER VEER *et al.*, 2015).

A explicação para o desfecho clínico desfavorável em pacientes de LLA-CPB com deleções de *IKZF1* começou a ser esclarecida a partir de um estudo recente (IMAMURA *et al.*, 2016), onde esses pacientes apresentaram resistência à prednisona, um medicamento amplamente utilizado na fase de indução do tratamento das LLAs. Células pré-B com deleções de *IKZF1* apresentam maior

adesão ao estroma e maior taxa de proliferação e auto renovação, contribuindo para a insensibilidade de blastos ao tratamento com medicamentos quimioterápicos (JOSHI *et al.*, 2014).

#### 1.2.4 Deleções em *IKZF1* e alterações concomitantes

Frequentemente as deleções em *IKZF1* são acompanhadas de outras alterações de número de cópias (Figura 1.11). Por exemplo, deleções de *PAX5* (9p13.2) estão presentes em muitos casos com deleções no *IKZF1* (7p12.2), sugerindo que ambas as alterações contribuem para a transformação maligna. Outro exemplo é dado pela presença de deleções de *CDKN2A* (9p21.3) com *IKZF1* na LLA-CPB com *BCR-ABL1* positivo. Estes fatos levaram Mullighan e colaboradores a concluir que a atividade atenuada de Ikaros pode colaborar para a perturbação de vias supressoras tumorais (MULLIGHAN *et al.*, 2008).

Schwab e colaboradores estudaram alterações de número de cópias através de MLPA nos genes *IKZF1*, *PAX5*, *RB1*, *CDKN2A/B*, *ETV6*, *EBF1*, *BTG1* e *PAR1* (SCHWAB *et al.*, 2013). Eles rastrearam 1.427 crianças e adolescentes diagnosticados com LLA-CPB e identificaram variações do número de cópias do DNA (CNAs) em 59% das amostras, sendo que 30% das CNAs afetaram um único gene, 18% dois genes, 9% três genes e 2% quatro ou mais genes. Deleções em *IKZF1* foram encontradas em 196 amostras (14% do total) e coincidiram com outras deleções em genes relacionados a vias de diferenciação de células B e de controle do ciclo celular, como *PAX5* e *CDKN2A/B*, presentes em 45% e 48% dos casos, respectivamente. Apesar dos rearranjos de *CRLF2* estarem presentes em apenas 5,3% da coorte, 48% dos pacientes com rearranjos de *CRLF2* também apresentaram perda de *IKZF1*. No entanto, as deleções em *IKZF1* foram mais frequentes em pacientes com o rearranjo *IGH@-CRLF2* (82%) do que naqueles com *P2RY8-CRLF2* (37%).

Estudo brasileiro recente publicado por Barbosa e colaboradores investigou CNAs em 274 amostras de LLA-CPB pediátricas. As CNAs foram encontradas em 83% das amostras, sendo que 15,0% dos casos apresentaram até duas alterações e 51,5% tiveram três ou mais alterações. Amostras com deleção em *IKZF1* (19,3%) geralmente apresentaram deleções simultâneas em *CDKN2A/2B*, *PAX5*, *BTG1* e

*EBF1*. As deleções em *IKZF1*, *PAX5* e *CDKN2A/2B* foram mais frequentemente encontradas no grupo de pacientes com *BCR-ABL1*. Apesar do grupo com *KMT2A-r* ter menos CNAs e de deleções em *IKZF1* serem mais frequentes em crianças mais velhas, três pacientes com deleção no éxon 1 de *IKZF1* (9,7%) possuíam *KMT2A-r*, sendo que dois casos apresentaram a fusão *KMT2A-MLLT10* (BARBOSA *et al.*, 2015).

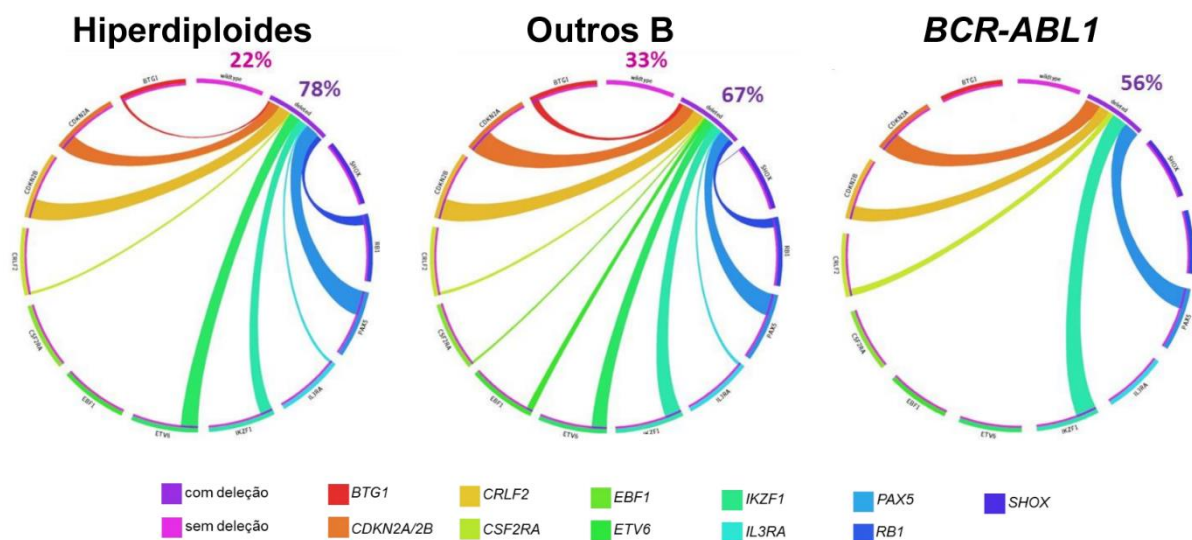


Figura 1.11. CNAs nos subgrupos de LLA-CPB com maior frequência de deleções em *IKZF1*.

Adaptado de: (BARBOSA *et al.*, 2015).

### 1.2.5 Métodos de detecção de alterações em *Ikaros*

O conhecimento do *status* do *IKZF1* apresenta importância para a conduta do tratamento em pacientes com LLA-CPB. A investigação de deleções em *Ikaros* pode ser realizada por diferentes metodologias, como ensaios de microarranjo e hibridização genômica comparativa (CGH), FISH, MLPA e reação em cadeia da polimerase *multiplex* (MP-PCR), com utilização de vários pares de oligonucleotídeos na reação.

Ensaios de microarranjo possuem grande valor para o conhecimento de CNAs, apesar de ser falho na detecção de translocações balanceadas. A resolução do método permite determinar deleções em *IKZF1* e outras alterações adicionais em todo o genoma. Por isso, o método foi essencial na pesquisa e identificação dos

perfis de deleção de *IKZF1* presentes em amostras de LLA-CPB, no entanto o alto custo do ensaio inviabiliza sua utilização na rotina clínica.

A técnica de FISH é muito restrita para a determinação de deleções em *IKZF1*, visto que as sondas geralmente hibridizam entre os éxons 4-6 de *IKZF1* e, portanto, são capazes de detectar poucos tipos de deleções, como  $\Delta 4-7$  e  $\Delta 1-8$ , e não permitem a identificação exata de quais éxons estão envolvidos na deleção.

A técnica mais empregada para esta análise tem sido o ensaio de amplificação multiplex dependente de ligação de sondas (do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, MLPA). A metodologia é empregada para o estudo de alterações do número de cópias do *IKZF1* e consiste basicamente em quatro etapas: (1) desnaturação do DNA, (2) hibridização do DNA com pares de sondas, (3) ligação de sondas específicas para regiões do genoma de interesse e (4) amplificação *multiplex* de todas as sondas com um par de oligonucleotídeos universais, sendo o oligonucleotídeo senso marcado com fluorocromo. Os fragmentos amplificados são então separados por tamanho em eletroforese capilar e sua fluorescência é detectada por sequenciador em análise de fragmentos. A comparação da intensidade dos picos de leitura entre sondas controle e sondas-alvo, as últimas localizadas nos diferentes éxons do *IKZF1*, permite a detecção de alterações (deleções ou ampliações) em quaisquer éxons do gene.

Foram desenvolvidos dois ensaios comerciais para a investigação de alterações em *IKZF1* através do MLPA. O primeiro ensaio (SALSA MLPA *probemix* P335-B1) é mais abrangente e avalia vários genes relacionados à patogênese da LLA-CPB. A validação do teste de MLPA foi realizada por Schwab e colaboradores, que compararam o método com a FISH e com PCR quantitativo do DNA genômico (qPCR) em 43 amostras de LLA-CPB (SCHWAB *et al.*, 2010). Neste trabalho, os resultados de MLPA tiveram concordância com os da FISH em 32 amostras (73%); como a sonda de FISH hibridiza entre os éxons 4-6 de *IKZF1* (para detectar as principais deleções,  $\Delta 4-7$ ), ela não consegue detectar deleções restritas a outros éxons, o que justifica a diferença de nível de detecção encontrada. O segundo ensaio (SALSA MLPA *probemix* P202-B1 *IKZF1*) é específico para alterações em genes da família *Ikaros* e permite a identificação de diferentes perfis de deleção do *IKZF1*, tendo em vista a presença de duas sondas para cada éxon do gene. Como o

P202-B1 possui maior quantidade de sondas-alvo para o *IKZF1*, o ensaio é o mais indicado para a investigação de deleções em *IKZF1* por MLPA.

Com o objetivo de aprimorar o rastreamento de deleções em *IKZF1* e utilizá-la como suporte na detecção de doença residual mínima (DRM), dois grupos lançaram novos métodos moleculares baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) para o diagnóstico destas deleções. O primeiro trabalho foi publicado pelo grupo alemão do Centro Diagnóstico de Leucemias Agudas em colaboração com o grupo brasileiro do Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico, no Instituto Nacional de Câncer (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013). Em seguida, um grupo francês publicou um ensaio de PCR *multiplex* com fluorescência para a detecção de deleções intragênicas em *IKZF1* recorrentes em LLA-CPB (CAYE *et al.*, 2013).

O estudo francês, publicado por Caye e colaboradores, buscou desenvolver uma metodologia para detecção de deleções em *IKZF1* (CAYE *et al.*, 2013). O trabalho desenvolveu uma técnica de MP-PCR fluorescente para a detecção da maioria das deleções focais no *IKZF1*. Inicialmente foi utilizada uma série de 60 amostras de LLA-CPB com *BCR-ABL1* positivo para o mapeamento das regiões de quebra por microarranjo. Os pontos de quebra no *IKZF1* foram então confirmados por LD-PCR seguida do sequenciamento dos amplicons. Desta forma, os autores conseguiram desenhar o mapa dos pontos de quebra do gene para desenhar os oligonucleotídeos a serem utilizados na reação de MP-PCR fluorescente. Eles adicionaram um oligonucleotídeo reverso interno no íntron 3 do *IKZF1* para amplificar a sequência genômica selvagem de 731 pb, além de outros oligonucleotídeos para a detecção das deleções  $\Delta 4-7$ ,  $\Delta 4-8$ ,  $\Delta 2-7$  e  $\Delta 2-8$ . O esquema com o desenho dos oligonucleotídeos da reação de MP-PCR fluorescente pode ser visto na Figura 1.12A e o resultado da análise de sequenciamento com a detecção dos picos de amplicons referentes às deleções de *IKZF1* e do controle interno (GL) estão ilustrados na Figura 1.12B.

Este trabalho também destaca a importância da metodologia de MP-PCR para a detecção de DRM em LLA-CPB. Enquanto a MLPA possui uma sensibilidade de apenas 50%, a MP-PCR fluorescente atingiu níveis de detecção abaixo de  $10^{-2}$ , sensibilidade essencial para a avaliação de DRM utilizando o marcador *IKZF1* e a



identificação de deleções de *IKZF1* em clones minoritários. A metodologia foi validada em uma coorte de 512 amostras de LLA-CPB com *BCR-ABL1* negativo e apresentou alta sensibilidade quando comparada à MLPA.

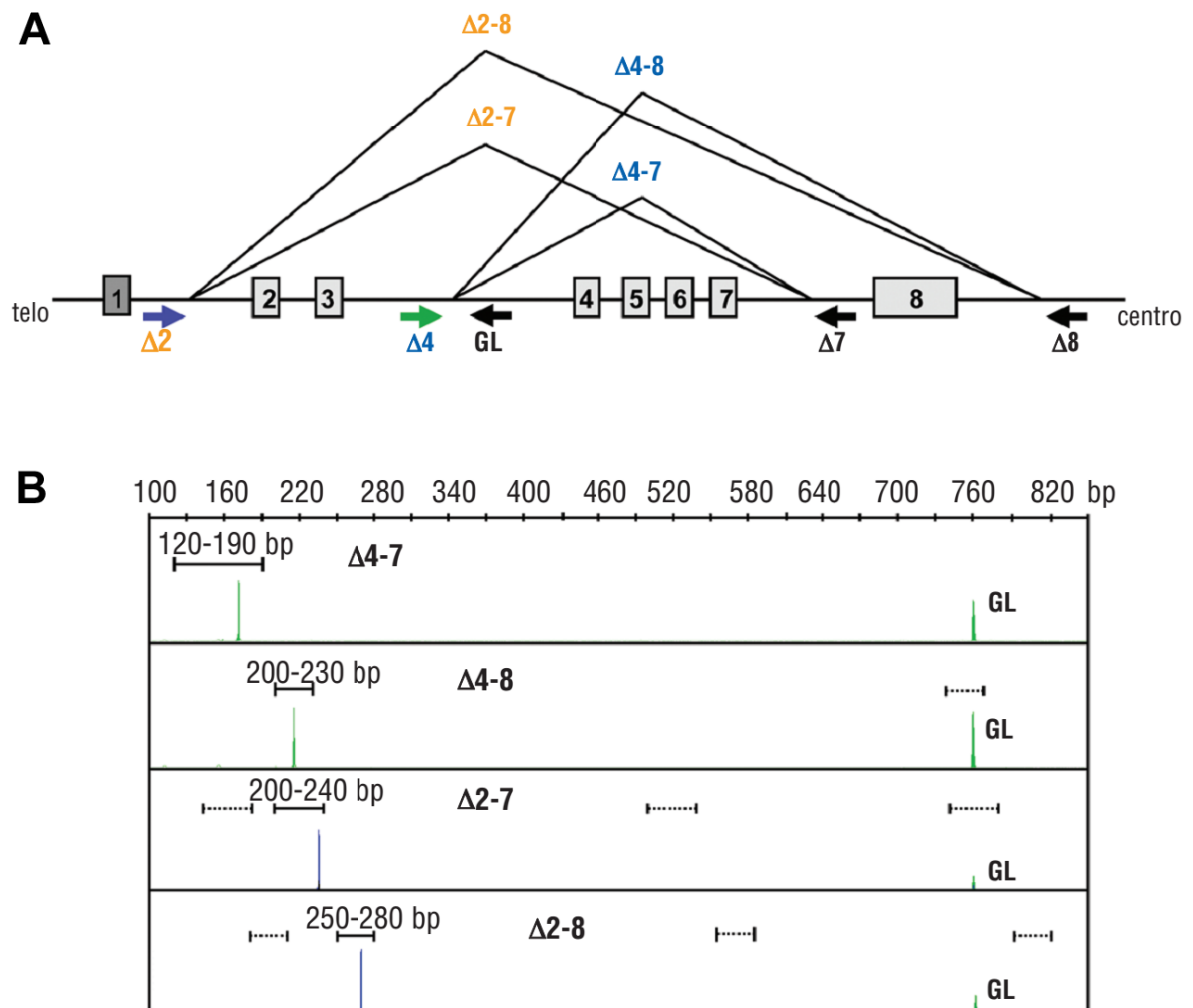


Figura 1.12. Metodologia de MP-PCR fluorescente para detecção de deleções recorrentes em *IKZF1*. (A) Representação do gene *IKZF1* e deleções intragênicas recorrentes, além dos oligonucleotídeos (setas) usados na MP-PCR específica para amplificar o ponto de quebra. As caixas em cinza representam os éxons e a caixa cinza escuro representa o éxon 1 não codificante. As setas azul e verde destacam os oligonucleotídeos marcados com fluorocromos e as setas pretas ilustram os oligonucleotídeos não marcados. GL (*germline*) refere-se ao oligonucleotídeo para amplificação da sequência selvagem de *IKZF1*. (B) Gráfico que representa cada perfil de amplificação da MP-PCR. O tamanho dos amplicons foi indicado. As linhas pontilhadas informam os tamanhos dos amplicons em pontos de quebra variantes. GL indica o amplicon do controle com 760 pb. Adaptado de: (CAYE *et al.*, 2013).

O estudo alemão de Meyer e colaboradores analisou 356 amostras de LLA-CPB pediátricas através de MLPA e, com isso, selecionou 72 amostras com deleções de *IKZF1* (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013). As localizações dos pontos de quebra de deleções focais no *IKZF1* foram determinadas com base em reações de PCR invertida de longa distância (LDI-PCR) e PCR de longa distância (LD-PCR). A partir dos dados da sequência dos pontos de quebra, Meyer *et al.* encontraram quatro regiões ricas em quebras (*hotspots*, HS1-4) de quebra do DNA e estabeleceram duas reações de MP-PCR (MP-PCR com reação A e B) para investigar as principais deleções de *IKZF1* já descritas:  $\Delta 2-3$ ,  $\Delta 2-8$ ,  $\Delta 4-7$  e  $\Delta 4-8$ , com exceção de deleções maiores, que incluem o éxon 1 de *Ikaros*:  $\Delta 1-7$  e  $\Delta 1-8$  (Figura 1.13). Após desenhar as duas MP-PCR, os autores validaram a técnica em uma coorte de 88 pacientes com LLA-CPB e identificaram 8 amostras com deleções em *IKZF1*, sendo duas amostras com deleção bialélica. A Figura 1.13A ilustra os quatro *hotspots* encontrados no *IKZF1* e as respectivas deleções encontradas. Além disso, a Figura 1.13B apresenta a eletroforese em gel de agarose com a presença de bandas correspondentes aos produtos da MP-PCR para amplificar as regiões que flanquearam a deleção. Amostras com deleções  $\Delta 1-8$ , correspondentes a 30% dos casos, não puderam ser determinadas por esta metodologia.

A avaliação de pontos de quebra no *IKZF1* realizada por Meyer *et al.* permitiu a identificação de um novo ponto de quebra localizado no gene *COBL* (*Cordon-bleu*), marcado em rosa na Figura 1.13A. A deleção intersticial de ~800 Mb entre o íntron 1 de *IKZF1* e o íntron 5 de *COBL* permitiu a identificação de *IKZF1*  $\Delta 2-8$  pela técnica de LDI-PCR (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013).

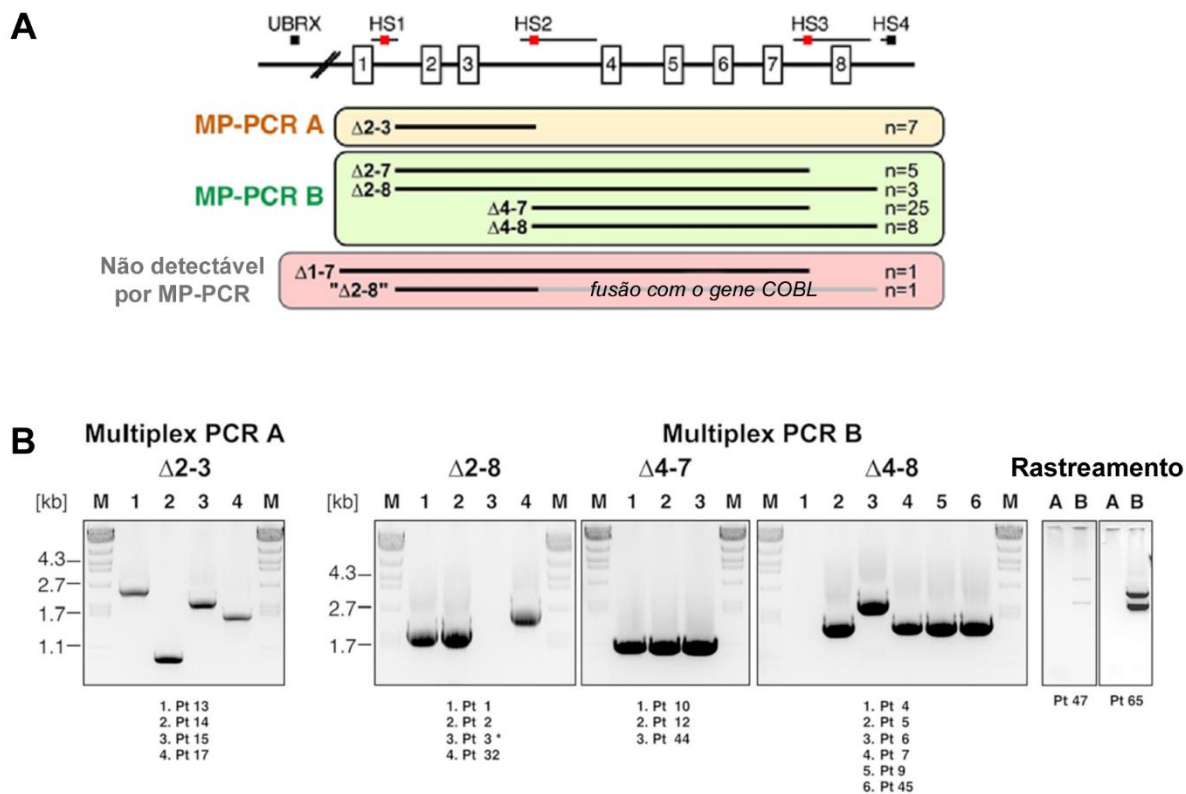


Figura 1.13. Metodologia de MP-PCR para o rastreamento de deleções em *IKZF1*.

(A) Resultado da análise de MLPA de 48 casos de LLA-CPB com deleção de *IKZF1*. Todas as deleções podem ser agrupadas em quatro regiões *hotspots* (HS1-4) e uma única quebra anterior ao *UBRX*. Algumas classes de deleções podem ser detectadas pelas reações MP-PCR A e B, respectivamente. O terceiro grupo só pode ser detectado por MLPA até o momento. (B) Resultado das MP-PCR para investigação de deleções em *IKZF1* nos pacientes. Na esquerda, a MP-PCR A é capaz de detectar deleções  $\Delta 2-3$ ; a reação de MP-PCR B pode verificar deleções  $\Delta 2-8$ ,  $\Delta 4-7$  e  $\Delta 4-8$ ; à direita foi representado o resultado do rastreamento de deleções parciais em *IKZF1* em dois pacientes (#47 e #65), que apresentaram *IKZF1*  $\Delta 4-7$  e  $\Delta 4-8$ , respectivamente. Adaptado de (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013).

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar do alto índice de cura (~75-90%) dos casos, alguns subtipos de LLA-CPB pediátrica apresentam risco de recaída elevado e o tratamento pode trazer efeitos colaterais indesejáveis para o paciente. Dessa forma, a identificação de biomarcadores para a estratificação de risco terapêutico é essencial para a adequação do tratamento ao risco de recaída em cada paciente.

Estudos genômicos identificaram o gene *IKZF1* como um promissor biomarcador de risco terapêutico. As alterações no gene são diversas e compreendem principalmente deleções entre os éxons  $\Delta 4-7$  (30-45%),  $\Delta 2-7$  (10-20%) e  $\Delta 1-8$  (~30%) (KASTNER *et al.*, 2013; SCHWAB *et al.*, 2013). A determinação de deleções no gene foi realizada inicialmente através de MLPA; no entanto, o método não apresenta sensibilidade suficiente para a investigação de DRM em amostras de seguimento de pacientes com LLA-CPB. Sabendo que pacientes com deleções de *IKZF1* são classificados como alto risco, recentes estudos realizaram o mapeamento dos principais pontos de quebra de *IKZF1* e desenvolveram testes de rastreamento específicos (MP-PCR) com alta sensibilidade para detecção das principais deleções, permitindo o monitoramento destas alterações na DRM. A sensibilidade de testes como estes permite identificar células tumorais numa frequência entre  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  (CAYE *et al.*, 2013; MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013).

Uma estratificação terapêutica precisa e o acompanhamento do tratamento podem ser determinantes no sucesso terapêutico e na sobrevida a longo prazo. Dois estudos recentes já demonstraram que esta é uma estratégia possível para o acompanhamento terapêutico e que necessita de aprimoramento para a transferência para a rotina clínica (VENN *et al.*, 2012; CAYE *et al.*, 2013). Desta forma, a análise das deleções em *IKZF1* pode não somente ser de interesse científico, como também pode trazer um benefício direto para o monitoramento molecular da resposta ao tratamento. Nesse contexto, a deleção em *IKZF1* detectada ao diagnóstico pode ser monitorada durante o tratamento do paciente para verificar se a população de blastos com tal alteração foi depletada com o tratamento.

As metodologias de MP-PCR para determinação do *status* do *IKZF1* não são capazes de detectar deleções completas do gene ( $\Delta 1-8$ ), correspondentes a 30% das deleções em *IKZF1*, e outras deleções mais raras. Portanto, o conhecimento do perfil genômico de deleções  $\Delta 1-8$  é essencial para o aperfeiçoamento de técnicas de MP-PCR para o diagnóstico e monitoramento de DRM na LLA-CPB, assim como para o entendimento da etiologia da LLA-CPB e o conhecimento da biologia das deleções em *IKZF1*. Por este motivo, o projeto busca compreender o perfil molecular de pacientes com LLA-CPB e deleção completa do *IKZF1* através da utilização conjunta da técnica de MLPA, que aumentará a cobertura do mapeamento de quebras em regiões do cromossomo 7, e de MP-PCR/LDI-PCR/sequenciamento, para a identificação das sequências dos pontos de quebra.

Apesar de estudos sugerirem que as deleções focais de *IKZF1* estejam associadas a mecanismos dependentes de RAG, a literatura carece de dados que ressaltem a possível participação destas proteínas na geração de deleções completas do gene. Para tanto, este estudo também se propõe a estudar sequências sinais de recombinação de RAG1/2 nas proximidades dos pontos de quebras de *IKZF1*  $\Delta 1-8$ .

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

Investigar o perfil genômico das deleções *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 nas LLA-CPB pediátricas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Descrever a demografia e as características laboratoriais de pacientes com deleção completa de *IKZF1*;
- Relacionar o perfil de alterações de número de cópias em diversos genes com as deleções completas de *IKZF1*;
- Investigar o tipo e a frequência de alterações no cromossomo 7 que estão relacionadas com deleções completas do gene *IKZF1* em LLA-CPB pediátrica;
- Descrever as regiões de quebra das *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 e seus possíveis *hotspots*;
- Compreender os mecanismos envolvidos na geração de deleções completas;
- Implantar a detecção das *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 na metodologia de MP-PCR para o diagnóstico do *status* de *IKZF1*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Desenho do estudo

Este trabalho foi desenhado com o objetivo de avaliar o perfil de alterações moleculares presentes nas LLA-CPB pediátricas com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 e o possível mecanismo relacionado com a formação das mesmas. Além disso, o trabalho busca a aplicação deste conhecimento no aperfeiçoamento de técnicas de rastreamento de deleções em *IKZF1* por MP-PCR de longa distância para a inclusão de *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 no ensaio. O desenho do estudo está ilustrado na Figura 4.1.

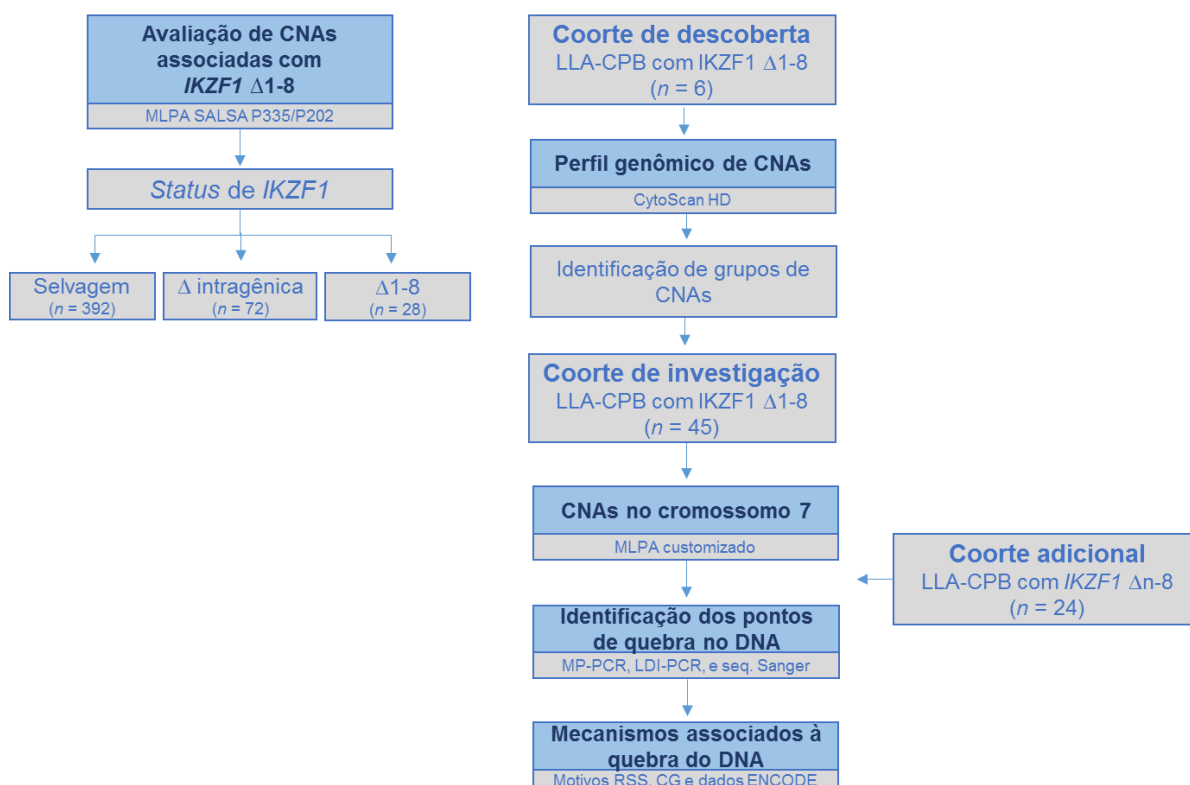


Figura 4.1. Fluxograma do estudo.

Na parte esquerda da figura foi esquematizada a análise de avaliação das CNAs características das amostras de LLA-CPB com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8. Para isso, o perfil de CNA em genes cobertos pelos ensaios MLPA SALSA P335 e P202 (MRC Holland) foram comparados entre os grupos de casos de LLA-CPB com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 e *IKZF1* selvagem ou deleção intragênica ( $\Delta$ intragênica) de *IKZF1*. Na parte direita da figura foi ilustrado o fluxograma da análise de CNAs no cromossomo 7 de amostras com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8. Primeiramente, foi incluída uma coorte de descoberta com seis casos de LLA-CPB com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 para a avaliação do perfil genômico através de ensaio de microarranjo CytoScan HD (Affimetrix).

Após identificação dos tipos de CNA presente no cromossomo 7 dessas amostras, foi incluída no estudo uma coorte de investigação com 45 amostras de LLA-CPB com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8. Nesta etapa, um ensaio de MLPA customizado foi desenhado para avaliar CNAs no cromossomo 7 dessa coorte. Os resultados obtidos nessa etapa levaram à adição de uma coorte com 24 amostras de LLA-CPB com deleção da região 3'-terminal de *IKZF1* (*IKZF1*  $\Delta$ n-8). Em seguida, o trabalho investigou a sequência do ponto de quebra no DNA através de amplificação por MP-PCR ou LDI-PCR seguido de sequenciamento de Sanger. Com os dados de sequência de quebra, o estudo avaliou os mecanismos associados à quebra do DNA através da identificação de motivos da sequência sinal de recombinação (RSS), dinucleotídeos CpG, além de inferir o nível de abertura da cromatina através de dados de ChIP-seq e DNase-seq obtidos do ENCODE.

Inicialmente, dados de ensaios comerciais de MLPA (P335 e P202) foram utilizados para a obtenção da frequência de alterações de número de cópias do DNA (CNAs) entre três grupos de amostras, de acordo com o *status* de *IKZF1*: (1) selvagem, (2) deleções intragênicas e (3) deleções completas, *IKZF1*  $\Delta$ 1-8. Na segunda parte do trabalho, a análise citogenético-molecular foi realizada em uma coorte de descoberta ( $n = 6$ ) para a identificação dos perfis de CNAs esperados para o cromossomo 7 nesse grupo de pacientes. Com isso, foi possível desenhar um ensaio de MLPA customizado que permitiu conhecer os tipos de CNAs presentes em toda a coorte de investigação ( $n = 45$ ). A partir da descoberta de recorrência de rearranjos de *COBL* em deleções completas de *IKZF1*, concluímos que seria importante investigarmos a presença de fusões entre *IKZF1* e *COBL* em uma coorte adicional com deleções da região terminal de *IKZF1*, aqui denominadas *IKZF1*  $\Delta$ n-8 ( $n = 24$ ). Após sequenciamento das regiões de quebra por PCR multiplex de longa distância (MP-PCR) ou PCR invertida de longa distância (LDI-PCR), seguido de sequenciamento de Sanger, foi possível identificar a sequência das regiões de quebra de algumas amostras. Com isso, foi possível analisar os mecanismos provavelmente relacionados com a promoção das quebras no DNA através da busca de motivos de reconhecimento por RAG e AID, além da análise da estrutura secundária do DNA nas regiões de quebra e associação com dados do estado da cromatina em células hematopoiéticas obtidos de base pública (ENCODE).



## 4.2 Casuística

Os sujeitos desta pesquisa são crianças e adolescentes (idade inferior a 18 anos) com diagnóstico de LLA-CPB de acordo com os critérios da OMS. Foram incluídas amostras recebidas no laboratório do Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrica (PHOP), INCA no período de 2004 a 2015 e caracterizadas com deleções completas do gene *IKZF1* ( $\Delta 1-8$ ) através de MLPA. Os dados clínicos foram enviados pelos médicos participantes da rede de colaboração do PHOP através do preenchimento de formulário (Anexo I) de plataforma eletrônica ([imunomolecular.inca.gov.br](http://imunomolecular.inca.gov.br)). As informações utilizadas nas análises demográficas e comparativas entre grupos com *IKZF1*  $\Delta 1-8$  e demais deleções em *IKZF1* foram coletadas do banco de dados do PHOP, INCA no período de 2004 a 2015 (BARBOSA *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2015).

Este estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (#005/06;33243214.7.0000.5274), conforme documento do Anexo II. Foram excluídas do estudo amostras com material biológico insuficiente para as análises laboratoriais, com identificação de baixo percentual de blastos (< 30%) nas amostras de medula óssea ao diagnóstico, ou amostras de pacientes cujos responsáveis discordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

## 4.3 Amostras

Amostras de aspirados de medula óssea coletados em EDTA foram caracterizadas através de análises morfológicas, imunofenotípicas e citogenético-moleculares pela equipe do PHOP, conforme os critérios de diagnóstico padronizados para LLA-CPB de acordo com a OMS (CATOVSKY *et al.*, 1991; VARDIMAN *et al.*, 2009; MOORMAN *et al.*, 2014). Todas as análises realizadas para estratificação de grupos de risco foram baseadas nos critérios do NCI: idade, leucometria e marcadores citogenético-moleculares: hiperdiploidia, hipodiploidia, *BCR-ABL1*, *KMT2A-AFF1*, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1* e *P2RY8-CRLF2* (SMITH *et al.*, 1996; VARDIMAN *et al.*, 2009).

As deleções de *IKZF1* foram caracterizadas através de ensaio de MLPA com sondas comerciais (MRC Holland, Holanda). Em resumo, amostras de DNA de

medula óssea ao diagnóstico de LLA-CPB foram analisadas através do ensaio SALSA MLPA P335-B1. Amostras com suspeita de deleção em *IKZF1* foram também analisadas pelo ensaio SALSA MLPA P202-B1 para a confirmação do tipo de deleção de *IKZF1*.

#### 4.4 Purificação de DNA

O DNA foi obtido a partir de células mononucleares de medula óssea com infiltração de blastos. As células foram isoladas através da exclusão de hemácias por lise osmótica e armazenadas a -80°C. A extração foi realizada através do ensaio *HiYield™ Genomic DNA Mini Kit, Blood/Bacteria/Cultured cells (Real Biotech Corporation, Taiwan)* de acordo com protocolo do fabricante.

#### 4.5 Ensaio de microarranjo

Para o estudo de microarranjo, 250 ng de gDNA foram analisados com o ensaio *CytoScan HD Array (Affymetrix. Inc., EUA)*. O protocolo de ensaio de mapeamento *GeneChip® (Affymetrix. Inc., EUA)* foi usado na preparação da biblioteca de DNA, composta por fragmentos amplificados que variam entre 250 e 2000 pb. O DNA genômico (250 ng de uma solução com 50 ng/μL) foi digerido com 0,5 U/μL das enzimas de restrição *XbaI/HindIII (New England Biolab, EUA)*. Uma sequência adaptadora (*Adaptor Xba/Hind 0,25 μM*) foi ligada pela T4 DNA Ligase (*New England Biolabs, EUA*) às extremidades coesivas do DNA digerido.

Subsequentemente foram realizadas cinco PCRs com um único iniciador específico para a sequência do adaptador para gerar produto suficiente para a hibridização (*Affymetrix. Inc., EUA*). Em seguida, os produtos de PCR foram purificados e fragmentados com o *Fragmentation Reagent (DNaseI) (Affymetrix. Inc., EUA)*. O DNA fragmentado foi então marcado e homogeneizado junto à mistura de hibridização (*MES 0,056 M, DMSO 5,0%, Denhardt Solution 2,50 X, EDTA 5.77 mM, HSDNA 0.115 mg/mL, IX Oligonucleotide Control Reagent, Human Cot-1 DNA 11.5 ng/mL, Tween-20 0,0115%, TMACL 2,69 M*). O DNA foi desnaturado a 95°C e injetado no *GeneChip Array*. A hibridização foi realizada em um forno a 48°C durante 18 horas a 60 rpm. A lavagem e coloração das sondas dos *GeneChip® Mapping*

arrays foram realizadas automaticamente (Affymetrix 450/250 *Fluidics Station*). O *GeneChip® Scanner 3000* foi usado para digitalizar os arranjos.

Os dados gerados a partir da leitura dos *GeneChip® Mapping arrays* foram analisados através do programa *Chromosome Analysis Suite 3.0* (ChAS 3.0) (Affymetrix, Inc., EUA) com base no guia fornecido pelo desenvolvedor do programa. A análise foi baseada na construção genômica hg19.

#### **4.6 PCR multiplex (MP-PCR)**

O local das quebras do DNA que geraram fusões com regiões distintas do cromossomo 7 levando a deleções em *IKZF1* foi confirmado por MP-PCR, técnica que utiliza uma combinação de mais de um par de oligonucleotídeos para a amplificação da região do genoma de interesse. Oligonucleotídeos específicos para cada paciente foram desenhados para a confirmação do ponto de quebra indicado pelo ensaio de microarranjo. Para cada amostra, foram utilizados 10 oligonucleotídeos senso e 10 antisenso para cobrir uma região de ~20.000 pb em cada lado da quebra do DNA. Nesse caso, espera-se encontrar um produto de PCR exclusivo para a amplificação da região com rearranjo do DNA. Em alguns casos a presença de diversos oligonucleotídeos em uma única reação pode gerar mais de um amplicon; nesses casos, o produto analisado corresponde ao de menor tamanho, visto que deve possuir menor quantidade de nucleotídeos entre o oligonucleotídeo e o ponto de quebra. As sequências de cada oligonucleotídeo utilizado nas reações estão descritas no Quadro 4.1.

Quadro 4.1. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de MP-PCR.

Amostra	Oligonucleotídeo <sup>a</sup>	Sequência
S35	7p14.3.F1	5' -AATCCTATCAATTCCTCCCCATGTGTCAAG-3'
	7p14.3.F2	5' -CTATCAATGGCCCTTCCAAGCTATCAGGTA-3'
	7p14.3.F3	5' -GATTGCAGATTTCTGGGAGAATAAGGACGA-3'
	7p14.3.F4	5' -CAGGCAAATTGGAAGATGAGTAGGAAGGAG-3'
	7p14.3.F5	5' -CAACAAGAAGAAAGGACCAAGGCAACAAAT-3'
	7p14.3.F6	5' -CCAAACTGGTCTCTCTGAGTGATATGGTG-3'
	7p14.3.F7	5' -GGAATCACAAAGACACAATAGCCAAAGCAA-3'
	7p14.3.F8	5' -ACAGGAAACCAAACACCACATGTTCTCACT-3'
	7p14.3.F9	5' -TTCGAAGGACATCATCAAGAAAATGAATGG-3'
	7p14.3.F10	5' -TGCAGCAATAGTCCAGAACAGATGTTCAA-3'
	COBL.I5.R1	5' -CAAAGGAGTAATCTTGGGTGATGGTGGTT-3'
	COBL.I5.R2	5' -CCAGTTCACAGTAAAATCCACCATTCTCA-3'
	COBL.I5.R3	5' -GCCCACCATAGTGTACTTTACCCAATTGCT-3'
	COBL.I5.R4	5' -CCTTTAAGCCATGCAAAATTGTTGTTCTT-3'
	COBL.I5.R5	5' -AGTTATGAAAGCAATGCCTGGAGAACCAAC-3'
	COBL.I5.R6	5' -TAGCGTATTCCCTAGGGTCTCAGCTTCTCA-3'
	COBL.I5.R7	5' -TCTGCAGAGGTCTCAGTGAACAGATGCTAA-3'
	COBL.I5.R8	5' -AAGGATTTCTGAAAACCTACCTGTGCCCTCA-3'
	COBL.I5.R9	5' -GAATGGAGTATCCATCCCCTCAAGCATTTA-3'
	COBL.I5.R10	5' -TGCTTTGGTTGCCTATACTTGTGGGGTACT-3'
S36	7p12.2.F1	5' -ATAGCCTCCAATTCTTCCACTTCGACTCCT-3'
	7p12.2.F2	5' -GCCCAGCCTCATATTCTTTCACTTAATCCA-3'
	7p12.2.F3	5' -GACCCATGTCTGAAGGAGCAATGAAGTAT-3'
	7p12.2.F4	5' -AATGCATGAAGAGACTAACATGCGGAGACT-3'
	7p12.2.F5	5' -AGACATTGGAATGGCCTGAGATACTCCACT-3'
	7p12.2.F6	5' -CACAAAATTACTCCTTTGGGGTCTTGCAGT-3'
	7p12.2.F7	5' -GGTAGGAGGTAGACACGAAGGAAGCTAGGG-3'
	7p12.2.F8	5' -TGTTTTCTTCGTTTCCTAGCCCCTTCTACC-3'
	7p12.2.F9	5' -AGCACACAGATAAGGCCCTCAAGTGAATTT-3'
	7p12.2.F10	5' -CATGCCTGGCCAGCTCTATTTCTTTAAGACT-3'
	COBL.I5.R11	5' -GTGTCCTCAGAATCAAGTTAGCAGCCTTCA-3'
	COBL.I5.R12	5' -TATAATCATGCAGATCTTCCAACCCACCT-3'
	COBL.I5.R13	5' -TCGAGCTTTATAACGACCTCGTGCACATAC-3'
	COBL.I5.R14	5' -TTCTTAGACAATCGCAGAACCTCTGTGGAC-3'
	COBL.I5.R15	5' -GGAATGGCCCTATCGTACCGGTAACCTTTA-3'
	COBL.I5.R16	5' -CTTTCTGGGCAGATAACCAGTGGTCGTTATT-3'
	COBL.I5.R17	5' -AGAAGGCAGAAAAGCAAGAGAGCATGGTAG-3'
	COBL.I5.R18	5' -AGTGGAAGACACAGCAAACCTCAGCTCTCAT-3'
	COBL.I5.R19	5' -AGAAGAGAAAGCAGAGGTGCACAAAGGAGT-3'
	COBL.I5.R20	5' -TGTAGAGGACAGACCATGGGAACTTCAAAA-3'

<sup>a</sup> Oligonucleotídeos utilizados nas MP-PCRs. A nomenclatura dos oligonucleotídeos apresentou as seguintes características: banda cromossômica onde o primer está localizado (7p14.3 ou 7p12.2) ou COBL.I5, íntron 5 do *COBL*, seguido de F# ou R# (oligonucleotídeo senso ou antisenso, respectivamente) com seu número diferencial.

Tabela 4.1. Oligonucleotídeos para detecção de alterações da amostra S24 por MP-PCR.

Alteração	Oligonucleotídeo <sup>a</sup>	Sequência
PAX5-AUTS2	PAX5.I6.F1	5' -CATGAGTCAAATATGTGTGGTTTAACTTTA-3'
	PAX5.I6.F2	5' -CCTGACTGTCCCTTCTATTATAGTTCTGAT-3'
	PAX5.I6.F3	5' -CATATACATTAATGACTCTGTGCTCTTGTC-3'
	PAX5.I7.F1	5' -CAATACATGTAGCTGTTAGGATTCTTCTG-3'
	PAX5.I7.F2	5' -AGGTAGAAAATAATCCTGTAAAAGTTGAGG-3'
	PAX5.I7.F3	5' -GTATGTTTTAAACTGCAAGACATAATGAAGG-3'
	AUTS2.I4.R1	5' -CAAGTCATACTGAAATACCCATGTTATGAT-3'
	AUTS2.I4.R2	5' -GAGAATACTTGTTCAGAAATCAGTATCTG-3'
	AUTS2.I4.R3	5' -GTAAGCTTCCATAATAATTAGACCACAGTT-3'
	AUTS2.I4.R4	5' -CTAATTCATAGCAGTTCAGGAAATAAGCA-3'
	AUTS2.I4.R5	5' -CCATTTACTCTAGATTAACGAATGTGAGA-3'
	AUTS2.I4.R6	5' -TTCTCTGAGAACATGAATAAAGTCCTAAAC-3'
1q41~7p15	7p15.F1	5' -TTAGAACCCAAGCAGTCTAATTTAAGTATG-3'
	7p15.F2	5' -CATGTGTAATTAAAAGTGTGGTAGCATTT-3'
	7p15.F3	5' -GGTAATAAGTTAGTGCACAAAGATCTACAT-3'
	7p15.F4	5' -ACAAAATAGAGATGATTCATGCTGTCTTC-3'
	7p15.F5	5' -GATTAATGAACATCGTCTTAGACTGAAAGA-3'
	7p15.F6	5' -GGACTCCACTCACATATACTAAGGTAATAA-3'
	1q41.R1	5' -ACTCTTGATTAGGCAGAGATACTTTAAATC-3'
	1q41.R2	5' -ATCATTTTAGGGATCTGTTAAGGTTGAAAT-3'

<sup>a</sup> Oligonucleotídeos utilizados nas MP-PCRs. A nomenclatura dos oligonucleotídeos apresentou as seguintes características: banda cromossômica onde o primer está localizado (*PAX5*, *AUTS2*, 7p15 ou 1q41), seguido de F# ou R# (oligonucleotídeo senso ou antisenso, respectivamente) com seu número diferencial.

#### 4.7 Amplificação Multiplex Dependente de Ligação de Sondas (MLPA)

O ensaio de MLPA foi utilizado para a investigação de CNAs no cromossomo 7 e incluiu a análise de deleções envolvendo o *IKZF1* e o *COBL*. O desenho das sondas foi baseado no manual "*Designing synthetic MLPA probes*", versão 14 (MRC Holland, Holanda). Devido à limitação de número de sondas que podem ser construídas no formato *in-house*, foram desenhados dois ensaios de MLPA com sondas controle comuns. Isso permitiu a interpretação dos resultados de ambos os ensaios em concomitância. Portanto, no total, os dois ensaios de MLPA incluíram dezoito pares de sondas, que cobriram os éxons 2 e 8 de *IKZF1*, os éxons 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 13 e íntron 5 de *COBL*, além de oito bandas citogenéticas do cromossomo 7. As três sondas de referência (controle interno) utilizadas neste ensaio *in-house* hibridizam nas regiões 8q11.21, 19q12 e 20p11.21. A localização de cada par de

sonda está esquematizada na Figura 4.2 e suas especificações estão descritas no Quadro 4.2. A partir dos resultados da análise de MLPA, também foi necessária a construção de um terceiro ensaio customizado com adição de três pares de sondas no íntron 7 de *COBL* (Figura 4.3).

Para as reações de MLPA foram utilizados 100 ng de DNA de cada paciente, os quais foram desnaturados a 98°C por 40 min. A mistura das sondas foi adicionada ao DNA e a solução resultante foi aquecida a 98°C por 1 minuto para a desnaturação das mesmas, antes da incubação a 60°C por 16 horas para sua hibridização com o DNA de cada amostra. Em seguida, adicionou-se a enzima Ligase-65 e a solução foi incubada a 54°C por 10 minutos para a ligação de sondas complementares (Sonda de oligonucleotídeo da esquerda e direita, LPO e RPO, respectivamente) que hibridizaram com o DNA de cada amostra. Os produtos da reação de ligação foram amplificados por PCR utilizando oligonucleotídeos ligados com o fluorocromo FAM (Carboxifluoresceína) do ensaio SALSA MLPA EK1 (MRC Holland, Holanda). Os fragmentos de PCR foram separados por eletroforese capilar no sequenciador 3.500 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems, EUA) utilizando o marcador padrão LIZ500 e formamida HiDi (Applied Biosystems, EUA), de acordo com o protocolo padrão.

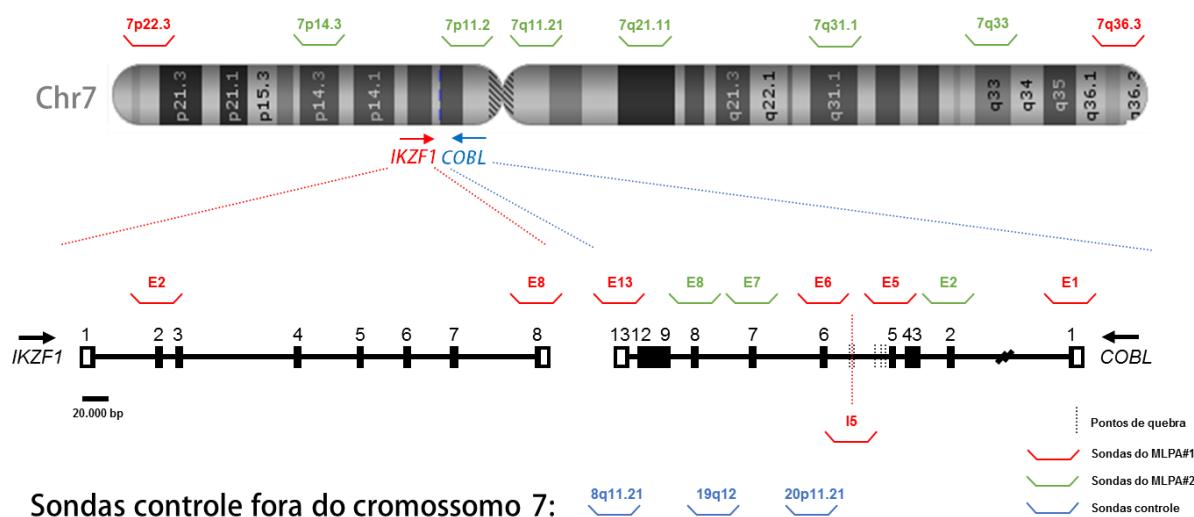
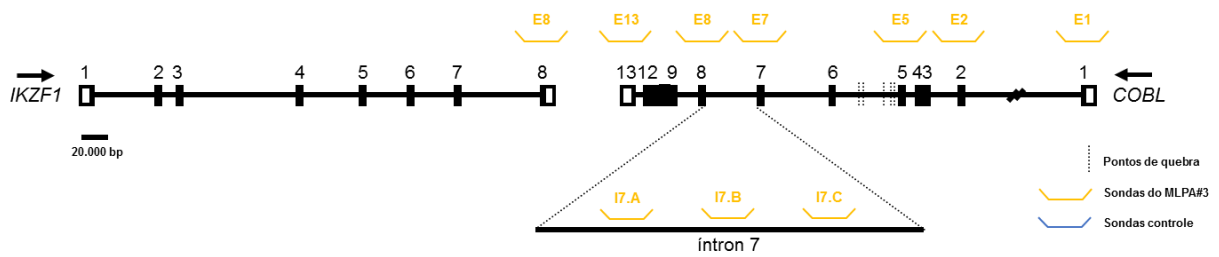


Figura 4.2. Estratégia de MLPA customizado para análise de CNAs no cromossomo 7.

A figura ilustra o cromossomo 7 (Chr7) e a estrutura dos genes *IKZF1* e *COBL* para destacar a localização das sondas de dois ensaios customizados de MLPA, MLPA#1 em vermelho e MLPA#2 em verde. Sondas controle alocadas nos cromossomos 8 (8q11.21), 19 (19q12) e 20 (20p11.21) foram desenhadas para a normalização interna dos resultados. Os pontos de quebra já encontrados no íntron 5 de *COBL* foram ilustrados por barras pontilhadas verticais.



Sondas controle fora do cromossomo 7: 8q11.21 19q12 20p11.21

Figura 4.3. Estratégia de MLPA customizado para análise de CNAs em amostra com deleção a partir do íntron 7 de *COBL*.

O ensaio de MLPA ilustrado foi utilizado para restringir o local de início da deleção na amostra, permitindo assim o desenho de estratégias de LDI-PCR para o sequenciamento do local de quebra do DNA. A figura ilustra a estrutura dos genes *IKZF1* e *COBL* para destacar a localização das sondas do terceiro ensaio customizado de MLPA, MLPA#3, em laranja. Sondas controle alocadas nos cromossomos 8 (8q11.21), 19 (19q12) e 20 (20p11.21) foram desenhadas para a normalização interna dos resultados. Os pontos de quebra já encontrados no íntron 5 de *COBL* foram ilustrados por barras pontilhadas verticais.

Quadro 4.2. Descrição dos ensaios de MLPA customizados.

Identificação	Tamanho (pb)	Gene	Região	Banda
MLPA#1	88	<i>NINL</i> <sup>¶</sup>	Íntron 21	20p11.21
	92	<i>IKZF1</i>	Éxon 2	7p12.2
	96	<i>VIPR2</i>	Éxon 12	7q36.3
	101	<i>COBL</i>	Éxon 13	7p12.1
	105	<i>COBL</i>	Éxon 1	7p12.1
	109	<i>COBL</i>	Éxon 5	7p12.1
	116	<i>COBL</i>	Íntron 5	7p12.1
	120	<i>PDGFA</i>	Íntron 5	7p22.3
	124	<i>COBL</i>	Éxon 6	7p12.1
	128	<i>IKZF1</i>	Éxon 8	7p12.2
	132	<i>MCM4</i> <sup>¶</sup>	Éxon 16	8q11.21
	136	<i>POP4</i> <sup>¶</sup>	Éxon 1	19q12

Continua.

Quadro 4.2. Continuação.

<b>Identificação</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Gene</b>	<b>Região</b>	<b>Banda</b>
MLPA#2	88	<i>NINL</i> <sup>¶</sup>	Íntron 21	20p11.21
	92	<i>GUSB</i>	Éxon 6	7q11.21
	96	<i>COBL</i>	Éxon 2	7p12.1
	101	<i>PCLO</i>	Éxon 6	7q21.11
	105	<i>PDE1C</i>	Íntron 18	7p14.3
	109	<i>COBL</i>	Éxon 7	7p12.1
	116	<i>LRRN3</i>	Éxon 4	7q31.1
	120	<i>CHCHD2</i>	Íntron 2	7p11.2
	124	<i>COBL</i>	Éxon 8	7p12.1
	128	<i>TMEM</i>	Éxon 2	7q33
	132	<i>MCM4</i> <sup>¶</sup>	Éxon 16	8q11.21
	136	<i>POP4</i> <sup>¶</sup>	Éxon 1	19q12
MLPA#3	88	<i>NINL</i> <sup>¶¶</sup>	Íntron 21	20p11.21
	92	<i>COBL</i>	Íntron 7.1	7p12.1
	96	<i>COBL</i>	Íntron 7.2	7p12.1
	101	<i>COBL</i>	Éxon 13	7p12.1
	105	<i>COBL</i>	Éxon 1	7p12.1
	109	<i>COBL</i>	Éxon 7	7p12.1
	116	<i>COBL</i>	Íntron 5	7p12.1
	120	<i>COBL</i>	Íntron 7.3	7p12.1
	124	<i>COBL</i>	Éxon 8	7p12.1
	128	<i>IKZF1</i>	Éxon 8	7p12.2
	132	<i>MCM4</i>	Éxon 16	8q11.21
	136	<i>POP4</i> <sup>¶</sup>	Éxon 1	19q12

<sup>¶</sup> Sondas controle

pb, pares de base



#### 4.8 Análise dos dados de MLPA

Os fragmentos foram analisadas através do programa *GeneMarker V1.85 analysis* (SoftGenetics, EUA), onde o número relativo de números de cópia do DNA foi verificado por comparação com amostras controles e normalizado de acordo com os picos observados nas sondas controle presentes em cada amostra.

#### 4.9 PCR invertida de longa distância (LDI-PCR)

Amostras com deleção  $\Delta 1-8$  *IKZF1* foram analisadas por LDI-PCR para o rastreamento de possíveis pontos de quebra nos íntrons 5 e 7 de *COBL* (Figura 4.4). A técnica consistiu basicamente em sete etapas: (1) digestão *overnight* do DNA com 10 U de cada enzima de restrição, *Bam*HI e *Bgl*II nas LDI-PCR #1, #2 e #5, e *Spe*I e *Nhe*I nas LDI-PCR #3 e #4, a 37 °C (2) ligação das pontas coesivas com 400 U da DNA Ligase T4 (Invitrogen, EUA) a 16 °C *overnight*, para formação de DNAs circulares, (3) amplificação do DNA circular de interesse com a combinação de oligonucleotídeos senso e antisenso listada no Quadro 4.3 e reagentes do ensaio *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Life Technologies, EUA), (4) eletroforese em gel de agarose 2% para investigação de bandas com tamanho diferente das previstas na amplificação de fragmentos selvagens com tamanhos previstos no Quadro 4.3, (5) purificação de bandas suspeitas com ensaio *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), (6) sequenciamento das bandas suspeitas no 3.500 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems, EUA) e (7) análise da sequências através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.9* (Ibis BioSciences, EUA) e da plataforma eletrônica BLAST para verificação das sequências da região de quebra e identificação das regiões do genoma envolvidas na fusão.

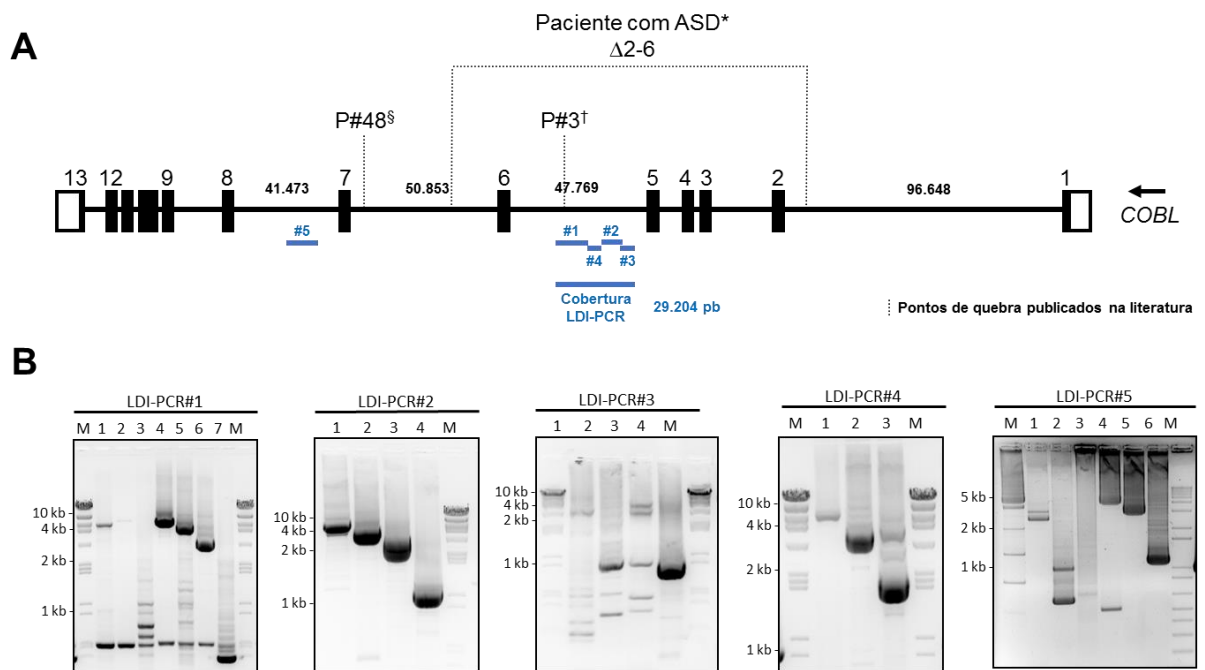


Figura 4.4. Desenho das LDI-PCR para a amplificação e sequenciamento dos pontos de quebra em *COBL*.

(A) Ilustração da estrutura do gene *COBL* com destaque para as regiões analisadas por LDI-PCR, em azul. Foram desenhados cinco ensaios de LDI-PCR cobrindo os íntrons 5 e 7 de *COBL*. A figura também destaca alterações em *COBL* previamente reportadas na literatura: \*deleção intersticial no *COBL* encontrada no paciente autista da família 39391 (GRISWOLD *et al.*, 2012); § paciente 48 com LLA-CPB pediátrica, que apresentou deleção *IKZF1*  $\Delta 1-8$  e quebra do DNA no *COBL* (BAUGHN *et al.*, 2015); † paciente 3 diagnosticado com LLA-CPB pediátrica (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013); ‡ paciente com câncer coloretal esporádico metastático (GONZALEZ-GONZALEZ *et al.*, 2014). (B) Eletroforese em gel de agarose 2% com o padrão de amplificação de amostra controle nos ensaios de LDI-PCR (#1-5).

Quadro 4.3. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de LDI-PCR.

LDI-PCR <sup>a</sup>	Oligonucleotídeo <sup>b</sup>	Sequência	Amplicon <sup>c</sup>
#1	COBL.I5.F1	5' -TGCAAGGCAGTTACTAATGAAACTCCCAAAA-3'	-
	COBL.I5.R21	5' -AAATGCAAAGTGCTAGCTTTATGGTGGTGA-3'	10.862 pb
	COBL.I5.R22	5' -GGCTTAGTGGGGACATGGTCAGTATTGATT-3'	9.160 pb
	COBL.I5.R23	5' -TATGAGGATTAATGAGTGCCAAGCACAGG-3'	7.532 pb
	COBL.I5.R24	5' -AACACAACAACCTGGCTCTCTTCTTCCCTTCC-3'	4.987 pb
	COBL.I5.R25	5' -AAACTCTGATTTGAGGTATTGGGGCAGATG-3'	3.995 pb
	COBL.I5.R26	5' -CATGGAGATTGGCAGAAGTCAATGTTGATA-3'	2.849 pb
	COBL.I5.R27	5' -TGGCTATCAGCAGTCATATTGCCCATCTAC-3'	558 pb
#2	COBL.I5.F2	5' -AGGGCTGAAGTTGACTTTATAGCCAGTGGA-3'	-
	COBL.I5.R3	5' -GCCCACCATAGTGTACTTTACCCAATTGCT-3'	5.153 pb
	COBL.I5.R4	5' -CCTTTAAGCCATGCAAAATTGTTGTTCCCTT-3'	3.389 pb
	COBL.I5.R5	5' -AGTTATGAAAGCAATGCCTGGAGAACCAAC-3'	2.428 pb
	COBL.I5.R6	5' -TAGCGTATTCCCTAGGGTCTCAGCTTCTCA-3'	1.201 pb
#3	COBL.I5.F3	5' -CTGAGACCCTAGGGAATACGCTAGACAGGA-3'	-
	COBL.I5.R28	5' -TTGTCTTTCTAAATTGCCTCTCTGCCATCA-3'	7.124 pb
	COBL.I5.R29	5' -TCTGCAGAGGTCTCAGTGAACAGATGCTAA-3'	5.380 pb
	COBL.I5.R30	5' -TGCTAAACTCTGAGCCTACGCTCTGTTTAC-3'	3.441 pb
	COBL.I5.R31	5' -GTTCCCCACTACCTGTGCCATCCTTCTAC-3'	1.033 pb
#4	COBL.I5.F4	5' -CCCCACAAGTATAGGCAACCAAAGCAAATA-3'	-
	COBL.I5.R32	5' -GCACCTTTGTTGAAAATGACTTCGCTGTAA-3'	4.579 pb
	COBL.I5.R33	5' -TGATCCTTTGAATTTCTGCGGTGTTAGTTG-3'	3.081 pb
	COBL.I5.R34	5' -CTCCCTTCCCTGTCTTCCCTTTAGTGAAGGTG-3'	1.846 pb
#5	COBL.I7.F1	5` -TCTTTATATTCCCTCCCTACCACTTCTTATT-3`	-
	COBL.I7.R1	5` -TAAGAATCCAGTATTTTCAGGCTCATGTTT-3`	5.400 pb
	COBL.I7.R2	5` -AAGAGAATATGGCCAGTTAGTTGTTTAAAT-3`	2,942 pb
	COBL.I7.R3	5` -TTCACACAGTTCTAATGTAATGAATTCTGT-3`	1,013 pb
	COBL.I7.F2	5` -AAGTTTGTGTTTGTATGGGAAATGTTAGTC-3`	-
	COBL.I7.R4	5` -CAATTACAGATTATCCAGACCCAGAAATT-3`	653 pb
	COBL.I7.F3	5` -CCTGAAATTTTAAACGATCTGCTTTTATGAG-3`	-
	COBL.I7.R5	5` -GCATAGGAATTAGCAAATGTTACAAATCAG-3`	4,793 pb
	COBL.I7.R6	5` -CAACCAGTATTCTCTAAGTTTATATGTGGG-3`	3,380 pb
COBL.I7.R7	5` -GAAAGTGATACTGCTCATAGAATTATTGGT-3`	1,150 pb	

<sup>a</sup> Quatro reações de LDI-PCR (#1-5) foram usadas no estudo

<sup>b</sup> Oligonucleotídeos utilizados nas LDI-PCR. O mesmo oligonucleotídeo senso foi combinado com cada antisenso na própria LDI-PCR (#1-5). A nomenclatura dos oligonucleotídeos apresentou as seguintes características: COBL.I5, íntron 5 do *COBL*; COBL.I7, íntron 7 do *COBL*; F, oligonucleotídeo senso; R, oligonucleotídeo antisenso

<sup>c</sup> Tamanho dos amplicons em pares de base (pb) gerados pela amplificação com o oligonucleotídeo senso de cada LDI-PCR e o respectivo oligonucleotídeo antisenso

#### 4.10 Reação da transcriptase reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase

A reação da transcriptase reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi utilizada para verificar a presença do transcrito de fusão *PAX5-AUTS2*. Para isso, o RNA foi purificado a partir de amostra de MO através do método de Trizol-clorofórmio (Invitrogen), seguindo o protocolo padrão. Após síntese da fita de

DNA complementar (cDNA) ao RNA com o ensaio SuperScript VILO MasterMix, os transcritos do *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e o transcrito quimérico foram amplificados. Os produtos das RT-PCRs foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e intercalados com brometo de etídeo para visualização das bandas com transiluminador ultravioleta.

#### **4.11 Hibridização *in situ* Fluorescente**

A técnica de FISH foi realizada para a verificação da presença do cromossomo 7, a partir da sonda comercial Vysis D7S486/ Vysis CEP 7 FISH Probe Kit. O ensaio é composto de sonda centromérica com sinal verde (7p11.1-q11.1) e outra sonda na banda 7q31 com sinal laranja. A hibridização foi realizada em amostra de MO, segundo protocolo do fabricante.

#### **4.12 Identificação de motivos associados às regiões de quebra do DNA**

Para entender se as deleções de *IKZF1* envolvem mecanismos de recombinação RAG1/2 dependente, foram investigadas sequências de sinal de recombinação (RSSs) de RAG1/2 nas sequências de DNA das regiões de ponto de quebra do DNA através da plataforma eletrônica “*RSS database*” (MERELLI *et al.*, 2010). O programa busca sequências semelhantes à sequência consenso do heptâmero (5'-CACAGTG-3') e nonâmero (5'-ACAAAAACC-3') das RSSs com espaçadores de 12 e 23 pares de base (12RSS e 23RSS, respectivamente) e classifica a probabilidade destas sequências corresponderem a sítios de reconhecimento de RAG através de um peso denominado “*RIC score*”. As 12RSSs e 23RSSs com pontuações maiores que -38,81 e -58,45, respectivamente, foram destacadas como provavelmente funcionais (COWELL, L. G. *et al.*, 2002; SCHATZ; JI, 2011). Para a melhor compreensão dos mecanismos associados à quebra do DNA nas amostras estudadas, também foram verificadas sequências mínimas de recombinação por RAG (5'-CAC-3') e dinucleotídeo CpG (5'-GC-3') nas regiões de quebra, além da análise das estruturas secundárias do DNA nas regiões de quebra através da plataforma Mfold (ZUKER, 2003). A análise das estruturas foi realizada

com base nos seguintes parâmetros: temperatura de 37 °C e concentração de Na<sup>+</sup> e Mg<sup>2+</sup> igual a 1 M e 0 M, respectivamente (DILLON *et al.*, 2013).

#### 4.13 Análise de dados de DNase-seq e ChIP-seq

Dados de DNase-seq e ChIP-seq, que incluíram H3K4<sub>me1-3</sub>, H3K9<sub>ac</sub>, foram obtidos do banco de dados da base ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) para a interpretação de possíveis regiões do genoma associadas com maior nível de abertura e acessibilidade da cromatina em células B CD20 positivas (RO01794), em linhagem de linfócito B, GM12878 (ENCSR977QPF) e leucemia mieloide crônica, K562 (ENCSR532GIR). Os arquivos foram analisados através do programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV), versão 2.3.82, com base na construção do genoma humano hg19.

#### 4.14 Análise estatística

Características demográficas e laboratoriais dos pacientes do estudo foram comparadas através do teste Qui-quadrado de Pearson no programa estatístico SPSS *Statistics* 18 (IBM, EUA). A análise comparou a distribuição de sexo, idade, leucometria, percentual de blastos, risco terapêutico de acordo com os critérios NCI, diagnóstico de LLA-CPB e subgrupo citogenético-molecular entre amostras com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 e demais deleções. Além disso, os perfis de CNAs foram comparados entre os dois grupos através do teste Qui-quadrado. Em seguida, a presença de diferentes motivos relacionados com a geração de quebra da dupla fita do DNA e promoção de deleções intersticiais foram comparados entre os grupos de *status* de *IKZF1*. Após verificação da ausência de distribuição normal dos dados, o teste estatístico Mann-Whitney foi empregado na análise realizada no programa GraphPad Prism 5. Nesse estudo, valores de  $p < 0,05$  foram interpretados como estatisticamente significantes.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características demográficas dos pacientes

Primeiramente, esse estudo analisou o perfil clínico-demográfico de pacientes com LLA-CPB pediátrica em relação ao *status* de *IKZF1*. Para tanto, tais características foram comparadas entre o grupo com (1) *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 e os grupos (2) sem deleção de *IKZF1* (*IKZF1* wt), ou (3) com deleções intragênicas em *IKZF1* ( $\Delta$ intragênicas) (Tabela 5.1). Nos três grupos comparados, a maioria dos casos corresponderam a meninos (51-61%) e foram diagnosticados com leucemia entre 1 e 9 anos de idade (61-78%). Enquanto a maior parte dos pacientes com deleção de *IKZF1* (57-59%) apresentou leucometria superior a  $50.000 \times 10^6/L$ , a maioria dos pacientes sem deleção do gene (73,5%) tiveram leucometria inferior a  $50.000 \times 10^6/L$  ( $p = 0,079$ ). Além disso, o imunofenótipo de LLA comum ao diagnóstico (70-75%) foi o mais frequente em todos os grupos estudados. A comparação das características clínico-demográficas dos pacientes revelou que nenhuma variável analisada apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os casos *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 e os demais grupos.

Tabela 5.1. Comparação de características clínicas-demográficas de pacientes com *IKZF1* Δ1-8.

Características	<i>IKZF1</i> wt	<i>IKZF1</i> deletado	
	n = 392 n (%)	Δintragênicas <sup>a</sup> n = 72 n (%)	Δ1-8 <sup>b</sup> n = 28 n (%)
Sexo			
Masculino	224 (57,1)	37 (51,4)	17 (60,7)
Feminino	168 (42,9)	35 (48,6)	11 (39,3)
	<i>p</i> = 0,844	<i>p</i> = 0,504	Ref.
Faixa etária (anos)			
0-1	22 (5,6)	4 (5,6)	2 (7,1)
1-9	307 (78,3)	44 (61,1)	19 (67,9)
10-18	63 (16,1)	24 (33,3)	7 (25,0)
	<i>p</i> = 0,422	<i>p</i> = 0,711	Ref.
Leucometria (x10 <sup>6</sup> /L) <sup>c</sup>			
≤ 50.000	288 (73,5)	43 (59,7)	16 (57,1)
> 50.000	104 (26,5)	29 (40,3)	12 (42,9)
	<i>p</i> = 0,079	<i>p</i> = 0,825	Ref.
Blastos (%) <sup>d</sup>			
30-50	89 (22,7)	11 (15,3)	6 (21,4)
51-100	303 (77,3)	61 (84,7)	22 (78,6)
	<i>p</i> = 1,000	<i>p</i> = 0,555	Ref.
Risco NCI <sup>e</sup>			
Padrão	239 (61,0)	28 (38,9)	12 (42,9)
Alto	153 (39,0)	44 (61,1)	16 (57,1)
	<i>p</i> = 0,072	<i>p</i> = 0,821	Ref.
Diagnóstico			
LLA pró-B	31 (8,4)	10 (15,4)	3 (10,7)
LLA comum	277 (75,3)	46 (70,8)	21 (75,0)
LLA pré-B	60 (16,3)	9 (13,8)	4 (14,3)
	<i>p</i> = 0,894	<i>p</i> = 0,837	Ref.
Subgrupo			
Hiperdiploide <sup>f</sup>	45 (18,6)	8 (19,5)	7 (36,8)
Hipodiploide <sup>f</sup>	1 (0,4)	2 (4,9)	0 (0,0)
<i>ETV6-RUNX1</i>	42 (17,4)	5 (12,2)	2 (10,5)
<i>BCR-ABL1</i>	7 (2,9)	2 (4,9)	1 (5,3)
<i>TCF3-PBX1</i>	15 (6,2)	0 (0,0)	1 (5,3)
<i>KMT2A-r</i>	27 (11,2)	3 (7,3)	0 (0,0)
<i>P2RY8-CRLF2</i>	9 (3,7)	2 (4,9)	0 (0,0)
	<i>p</i> = 0,460	<i>p</i> = 0,424	Ref.

<sup>a</sup> Deleções intersticiais de *IKZF1* que envolvem o gene de forma parcial

<sup>b</sup> Deleções de *IKZF1* que comprometem toda a estrutura do gene

<sup>c</sup> Leucometria mensurada no sangue periférico de amostra ao diagnóstico

<sup>d</sup> Percentual de blastos encontrado na medula óssea ao diagnóstico. Amostras com percentual de blastos inferior a 30% foram excluídas deste estudo visto que a sensibilidade do MLPA estaria comprometida nestas amostras

<sup>e</sup> Risco terapêutico de acordo com critérios do NCI, Instituto Nacional de Câncer dos EUA

<sup>f</sup> Ploidia definida a partir da análise do índice de DNA (ID)

\* *p*-valor resultante do teste  $\chi^2$  de Pearson ou teste exato de Fisher, quando a variável apresentou até duas categorias

## 5.2 Comparação entre LLA-CPB com *IKZF1* $\Delta$ 1-8 e outras deleções

Nesta etapa do trabalho, foram avaliadas as diferenças no perfil de CNAs entre *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 e amostras sem deleções de *IKZF1* e com deleções intragênicas. As alterações estudadas estão incluídas nos ensaios de MLPA (P335 e P202) usados na rotina de diagnóstico do *status* do *IKZF1*. Primeiramente, a análise foi realizada com os dados obtidos do ensaio MLPA SALSA P335 (Tabela 5.2) e incluiu casos com *IKZF1* selvagem ( $n = 392$ ), com deleção intragênica ( $n = 72$ ) e deleção completa ( $n = 28$ ) de *IKZF1*. Essa análise revelou que deleções em *EBF1* (cromossomo 5) e *BTG1* (cromossomo 12) foram raramente encontradas em conjunto com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 quando comparadas aos demais grupos. Deleções no gene *EBF1* (*Early B-Cell Factor 1*), localizado na região 5q33.3, foram encontradas no grupo com deleção intragênica de *IKZF1* (26,4%), porém, com rara frequência nos grupos *IKZF1* selvagem (6,1%) e *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 (3,6%). A diferença na frequência de alterações no gene entre os dois grupos com deleções de *IKZF1* foi estatisticamente significativa ( $p = 0,017$ ). Da mesma forma, deleções em *BTG1* estavam presentes em 26,4% das deleções intragênicas, mas em apenas 9,9% e 7,1% das amostras com *IKZF1* selvagem e *IKZF1*  $\Delta$ 1-8, respectivamente. A comparação entre os grupos com deleções intragênicas e completas em *IKZF1* revelou uma diferença na distribuição, porém, sem resultado significativo ( $p = 0,053$ ). Outro resultado significativo na análise foi a diferença na distribuição de frequência de alterações em *CDKN2B*. Apesar da frequência de deleções no gene ser semelhante entre os grupos com deleções de *IKZF1*, as amostras com deleção completa do gene apresentaram maior frequência de ganhos no *CDKN2B* quando comparadas aos casos com deleções intragênicas de *IKZF1* ( $p = 0,012$ ).

Em seguida, o estudo comparou a frequência de CNAs em regiões cobertas pelo ensaio de MLPA SALSA P202 (Tabela 5.3), a avaliação de casos com *IKZF1* selvagem ( $n = 21$ ), com deleção intragênica ( $n = 37$ ) e deleção completa ( $n = 25$ ) de *IKZF1*. Os resultados mostraram que deleções nos genes *ZPBP*, *FIGNL1* e *DDC* foram diferencialmente presentes em *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 quando comparadas aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). Enquanto deleções nesses genes estavam presentes em menos de 8% das amostras sem deleção de *IKZF1* ou com deleções intragênicas, mais de 84% das amostras com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 tinham deleção concomitante de *ZPBP*, *FIGNL1* e *DDC*.



Tabela 5.2. Avaliação de CNAs pelo ensaio de MLPA SALSA P335 de acordo com o *status* de *IKZF1*.

Gene	Localização	IKZF1 Status		
		Selvagem n = 392 n (%)	$\Delta$ intragênica <sup>a</sup> n = 72 n (%)	$\Delta$ 1-8 <sup>b</sup> n = 28 n (%)
<i>EBF1</i>	5q33.3			
Selvagem		324 (82,7)	44 (61,1)	25 (89,3)
Deleção		24 (6,1)	19 (26,4)	1 (3,6)
Amplificação		44 (11,2)	9 (12,5)	2 (7,1)
		$p = 0,663$	<b><math>p = 0,017</math></b>	Ref.
<i>JAK2<sup>c</sup></i>	9p24.1			
Selvagem		146 (92,4)	26 (86,7)	5 (83,3)
Deleção		10 (6,3)	2 (6,7)	1 (16,7)
Amplificação		2 (1,3)	2 (6,7)	0 (0,0)
		$p = 0,592$	$p = 0,605$	Ref.
<i>CDKN2A</i>	9p21.3			
Selvagem		262 (66,8)	39 (54,2)	13 (46,4)
Deleção		112 (28,6)	30 (41,7)	12 (42,9)
Amplificação		18 (4,6)	3 (4,2)	3 (10,7)
		$p = 0,066$	$p = 0,432$	Ref.
<i>CDKN2B</i>	9p21.3			
Selvagem		276 (70,4)	48 (66,7)	14 (50,0)
Deleção		98 (25,0)	24 (33,3)	11 (39,3)
Amplificação		18 (4,6)	0 (0,0)	3 (10,7)
		$p = 0,061$	<b><math>p = 0,012</math></b>	Ref.
<i>PAX5</i>	9p13.2			
Selvagem		257 (65,6)	26 (36,1)	12 (42,9)
Deleção		83 (21,2)	39 (54,2)	13 (46,4)
Amplificação		52 (13,3)	7 (9,7)	3 (10,7)
		<b><math>p = 0,009</math></b>	$p = 0,781$	Ref.
<i>ETV6</i>	12p13.2			
Selvagem		284 (72,4)	42 (58,3)	19 (67,9)
Deleção		87 (22,2)	24 (33,3)	8 (28,6)
Amplificação		21 (5,4)	6 (8,3)	1 (3,6)
		$p = 0,703$	$p = 0,578$	Ref.
<i>BTG1</i>	12q21.33			
Selvagem		327 (83,4)	44 (61,1)	24 (85,7)
Deleção		39 (9,9)	19 (26,4)	2 (7,1)
Amplificação		26 (6,6)	9 (12,5)	2 (7,1)
		$p = 0,888$	$p = 0,053$	Ref.
<i>RB1</i>	13q14.2			
Selvagem		330 (84,2)	55 (76,4)	21 (75,0)
Deleção		49 (12,5)	12 (16,7)	4 (14,3)
Amplificação		13 (3,3)	5 (6,9)	3 (10,7)
		$p = 0,130$	$p = 0,805$	Ref.

Continua.

Tabela 5.2. Continuação.

Gene	Localização	IKZF1 Status		
		Selvagem n = 392 n (%)	$\Delta$ intragênica <sup>a</sup> n = 72 n (%)	$\Delta$ 1-8 <sup>b</sup> n = 28 n (%)
SHOXAREA	Xp22	Selvagem	298 (76,0)	22 (78,6)
		Deleção	3 (0,8)	0 (0,0)
		Amplificação	91 (23,2)	6 (21,4)
			$p = 0,873$	Ref.
CRLF2	Xp22	Selvagem	314 (80,1)	22 (78,6)
		Deleção	10 (2,6)	1 (3,6)
		Amplificação	68 (17,3)	5 (17,9)
			$p = 0,944$	Ref.
CSF2RA	Xp22	Selvagem	309 (78,8)	24 (85,7)
		Deleção	13 (3,3)	0 (0,0)
		Amplificação	70 (17,9)	4 (14,3)
			$p = 0,529$	Ref.
IL3RA	Xp22	Selvagem	297 (75,8)	26 (92,9)
		Deleção	19 (4,8)	0 (0,0)
		Amplificação	76 (19,4)	2 (7,1)
			$p = 0,108$	Ref.
P2RY8 <sup>d</sup>	Xp22	Selvagem	128 (73,6)	6 (85,7)
		Deleção	13 (7,5)	0 (0,0)
		Amplificação	33 (19,0)	1 (14,3)
			$p = 0,692$	Ref.

<sup>a</sup> Deleções intersticiais de *IKZF1* que envolvem o gene de forma parcial

<sup>b</sup> Deleções de *IKZF1* que comprometem toda a estrutura do gene

<sup>c</sup> A análise de CNAs em *JAK2* incluiu menor número de casos (wt = 158; deleção intragênica de *IKZF1* = 30; deleção completa de *IKZF1* = 6), visto que suas sondas foram adicionadas após atualização do painel de MLPA SALSA P335 pela empresa MRC Holland

<sup>d</sup> A análise de CNAs em *P2RY8* incluiu menor número de casos (wt = 174; deleção intragênica de *IKZF1* = 33; deleção completa de *IKZF1* = 7), visto que suas sondas foram adicionadas após atualização do painel de MLPA SALSA P335 pela empresa MRC Holland

$p$ -valor referente à comparação entre os grupos de *status* de *IKZF1* pelo teste  $\chi^2$  de Pearson

Ref, grupo usado como referência na comparação;  $\Delta$ , deleção

Tabela 5.3. Avaliação de CNAs pelo ensaio de MLPA SALSA P202 de acordo com o status de *IKZF1*.

Gene	Localização	<i>IKZF1</i> Status		
		Selvagem n = 21 n (%)	$\Delta$ intragênica <sup>a</sup> n = 37 n (%)	$\Delta$ 1-8 <sup>b</sup> n = 25 n (%)
<i>IKZF2</i>	2q34			
Selvagem		16 (76,2)	18 (48,6)	15 (60,0)
Deleção		3 (14,3)	17 (45,9)	9 (36,0)
Amplificação		2 (9,5)	2 (5,4)	1 (4,0)
		$p = 0,219$	$p = 0,679$	Ref.
<i>ZPBP</i>	7p12.2			
Selvagem		19 (90,5)	36 (97,3)	4 (16,0)
Deleção		1 (4,8)	1 (2,7)	21 (84,0)
Amplificação		1 (4,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
		$p < 0,001$	$p < 0,001$	Ref.
<i>FIGNL1</i>	7p12.1			
Selvagem		20 (95,2)	35 (94,6)	2 (8,0)
Deleção		0 (0,0)	1 (2,7)	23 (92,0)
Amplificação		1 (4,8)	1 (2,7)	0 (0,0)
		$p < 0,001$	$p < 0,001$	Ref.
<i>DDC</i>	7p12.1			
Selvagem		20 (95,2)	33 (89,2)	2 (8,0)
Deleção		0 (0,0)	3 (8,1)	23 (92,0)
Amplificação		1 (4,8)	1 (2,7)	0 (0,0)
		$p < 0,001$	$p < 0,001$	Ref.
<i>MIR31</i>	9p21.3			
Selvagem		15 (71,4)	27 (73,0)	14 (56,0)
Deleção		4 (19,0)	10 (27,0)	11 (44,0)
Amplificação		2 (9,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
		$p = 0,082$	$p = 0,166$	Ref.

Continua.

Tabela 5.3. Continuação.

Gene	Localização	IKZF1 Status		
		Selvagem n = 21 n (%)	$\Delta$ intragênica <sup>a</sup> n = 37 n (%)	$\Delta$ 1-8 <sup>b</sup> n = 25 n (%)
<i>CEP170B</i>	14q32.33			
Selvagem		10 (47,6)	28 (75,7)	19 (76,0)
Deleção		3 (14,3)	4 (10,8)	2 (8,0)
Amplificação		8 (38,1)	5 (13,5)	4 (16,0)
		$p = 0,135$	$p = 0,911$	Ref.
<i>MTA1</i>	14q32.33			
Selvagem		11 (52,4)	28 (75,7)	17 (68,0)
Deleção		2 (9,5)	5 (13,5)	3 (12,0)
Amplificação		8 (38,1)	4 (10,8)	5 (20,0)
		$p = 0,398$	$p = 0,602$	Ref.
<i>IGHD</i>	14q32.33			
Selvagem		10 (47,6)	29 (78,4)	19 (76,0)
Deleção		3 (14,3)	5 (13,5)	4 (1,0)
Amplificação		8 (38,1)	3 (8,1)	2 (8,0)
		<b><math>p = 0,044</math></b>	$p = 0,963$	Ref.
<i>IKZF3</i>	17q12			
Selvagem		13 (61,9)	30 (81,1)	19 (76,0)
Deleção		2 (9,5)	6 (16,2)	6 (24,0)
Amplificação		6 (28,6)	1 (2,7)	0 (0,0)
		<b><math>p = 0,012</math></b>	$p = 0,551$	Ref.

<sup>a</sup> Deleções intersticiais de *IKZF1* que envolvem o gene de forma parcial

<sup>b</sup> Deleções de *IKZF1* que comprometem toda a estrutura do gene

$p$ -valor referente à comparação entre os grupos de *status* de *IKZF1* pelo teste  $\chi^2$  de Pearson

Ref, grupo usado como referência na comparação;  $\Delta$ , deleção

### 5.3 Perfil genômico de amostras de LLA-CPB com *IKZF1* Δ1-8

A avaliação do perfil citogenético-molecular de amostras de LLA-CPB com deleções completas do gene *IKZF1* (*IKZF1* Δ1-8) foi realizada através da técnica de microarranjo. Para essa análise, o estudo explorou uma coorte de descoberta com seis amostras de pacientes diagnosticados com LLA-CPB e *IKZF1* Δ1-8 confirmado por MLPA. A escolha das amostras foi baseada nos seguintes critérios: DNA com melhor qualidade/quantidade, diversificação de subtipos de LLA-CPB (*BCR-ABL1* e *ETV6-RUNX1*) e distribuição equilibrada por gênero. As características clínico-demográficas da coorte de descoberta está descrita na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Características demográficas e laboratoriais da coorte de descoberta.

ID <sup>a</sup>	Sexo	Leucometria <sup>b</sup>	Blastos <sup>c</sup>	Idade <sup>d</sup>	Diagnóstico	Subgrupo <sup>e</sup>
S22	Feminino	110.000	60	13	LLA comum	<i>BCR-ABL1</i>
S24	Masculino	336.000	95	1	LLA pró-B	Outros*
S27	Feminino	58.100	55	1	LLA pró-B	<i>KMT2A-r</i>
S34	Masculino	125.700	59	14	LLA pró-B	Outros
S35	Feminino	459.600	80	1	LLA comum	<i>ETV6-RUNX1</i>
S36	Feminino	7.470	50	5	LLA comum	<i>ETV6-RUNX1</i>

<sup>a</sup> Identificação da amostra

<sup>b</sup> Leucometria medida em 10<sup>3</sup> leucócitos por litro

<sup>c</sup> Percentual (%) de blastos

<sup>d</sup> Idade em anos no momento do diagnóstico

<sup>e</sup> Subgrupo citogenético da LLA-CPB. O subgrupo citogenético classificado como “outros” indica que a amostra não apresentou hiperdiploidia/hipodiploidia e foi negativa para as fusões *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-r* e *BCR-ABL1*

\* Apesar da amostra S24 ter sido classificada no subgrupo de “outras” LLA-CPBs, o presente estudo identificou a presença do rearranjo *PAX5-AUTS2* nesse paciente (vide item 5.9).

O resultado da análise de microarranjo está ilustrado na Figura 5.1. Em geral, as amostras de LLA-CPB com *IKZF1* Δ1-8 apresentaram alterações no cromossomo 7, onde o gene *Ikaros* está localizado, e deleções do braço curto do cromossomo 9, que se iniciavam entre as bandas 9p13.2 e 9p13.1. Somente os cromossomos 6, 8, 20, 21 e Y não exibiram alterações de CNAs em nenhuma das amostras analisadas. Cabe destacar que a probabilidade de ausência de alterações

no cromossomo Y foi menor do que nos demais cromossomos, tendo em vista que metade das amostras era do sexo feminino.

A amostra S22 apresentou ganhos de números de cópias do DNA nas regiões 9q34.1 e 22q11.23. Essa região corresponde ao local da translocação não balanceada t(9;22)(q34;q11.2), que levou à fusão *BCR-ABL1* identificada por RT-PCR na amostra.

Por outro lado, a amostra S24 apresentou uma perda da região telomérica do cromossomo 1 (1q41~1q44), além de deleções de parte do cromossomo 7 e 9. Os resultados referentes a esta amostra serão relatados com mais detalhe no capítulo 5.4 (Identificação de rearranjo *PAX5-AUTS2* em amostra com deleção completa de *IKZF1*).

Apesar das amostras S35 e S36 apresentarem a fusão *ETV6-RUNX1* por RT-PCR, que indica a presença da translocação t(12;21)(p13;q22), o resultado de microarranjo não mostrou alterações nas regiões envolvidas na translocação, com exceção de uma deleção com ponto de quebra na banda 12p13.2 na amostra S36. Portanto, os dados de CNAs indicam que houve translocações balanceadas nas amostras, as quais não são detectadas por microarranjo.

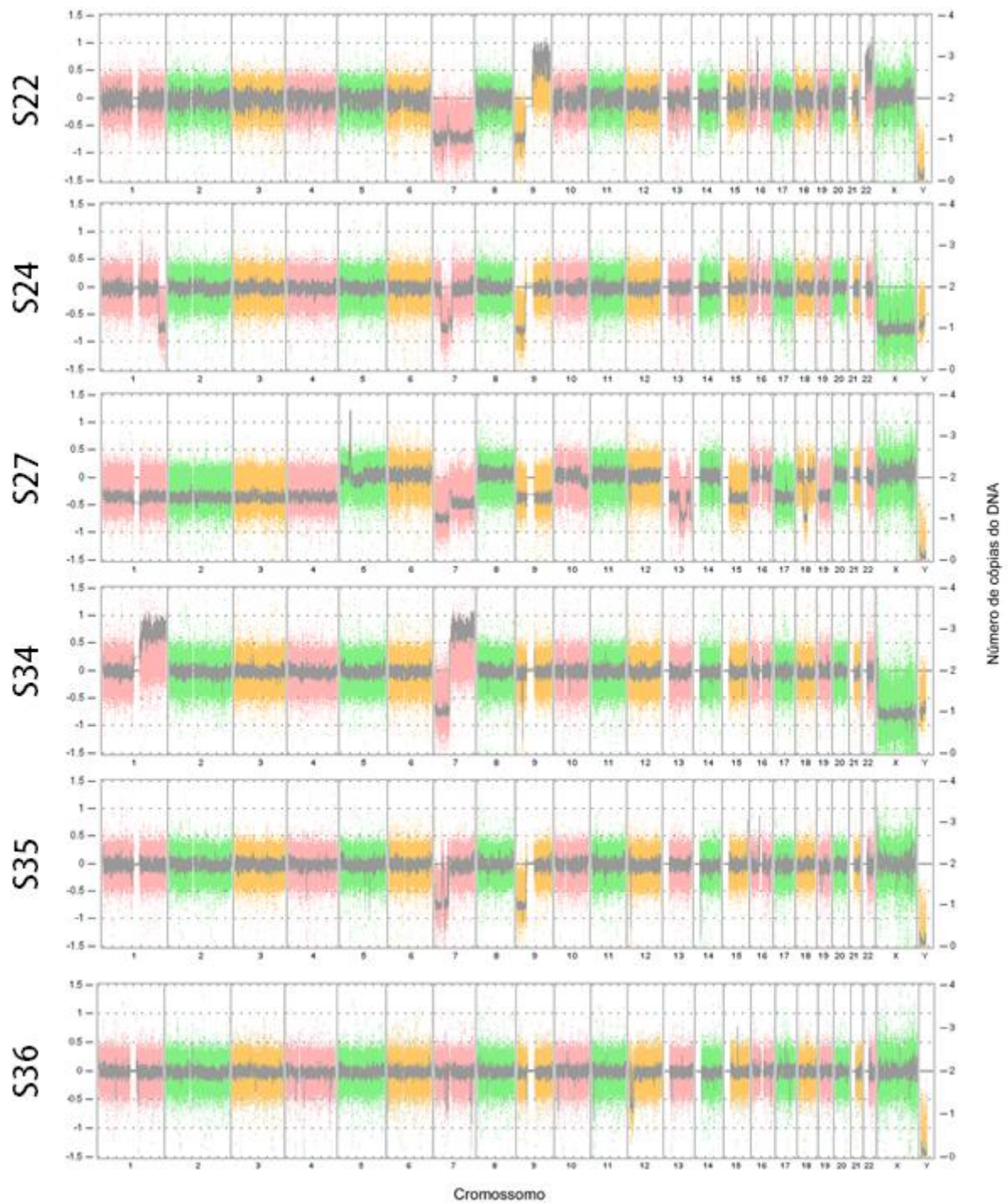


Figura 5.1. Alterações de CNAs no genoma de pacientes analisados por microarranjo.

Os gráficos indicam as CNAs encontradas no genoma de cada amostra analisada por microarranjo (S22, S24, S27, S34, S35 e S36). O eixo da direita ilustra o número de cópias do DNA e o eixo da base do gráfico representa cada cromossomo. A linha cinza mostra o resultado de CNAs no genoma de cada amostra.

Deleções no braço curto do cromossomo 9 foram frequentemente encontradas nas amostras de LLA-CPB com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8, sendo presentes em quatro pacientes (66%) estudados por microarranjo e caracterizadas principalmente por grandes deleções desde a região telomérica até as bandas 9p13.1 e 9p13.2 (Figura 5.2). Duas regiões possuíam deleções em comum nas quatro amostras. A primeira região comum de deleção (RCD1), com ~767 Mb, foi representada pela perda das regiões 9p22.1-9p21.3 (19.897.263-20.664.574) e envolveu dois genes: *MLLT3* e *FOCAD*. A segunda região comum de deleção (RCD2) correspondeu a uma perda de ~405 Mb entre as bandas citogenéticas 9p21.1-9p13.3 (33.045.146-33.449.750), incluindo os seguintes genes: *SMU1*, *B4GALT1*, *SPINK4*, *BAG1*, *CHMP5*, *NFX1*, *AQP7* e *AQP3*. Uma terceira região comum de deleção (RCD3) ocorreu em três amostras (50%), estendendo-se desde a extremidade telomérica de 9p até a região 9p13. O ponto de quebra destas grandes deleções do 9p divergiu ~1,9 Mb cerca de entre si, de acordo com o resultado do microarranjo.

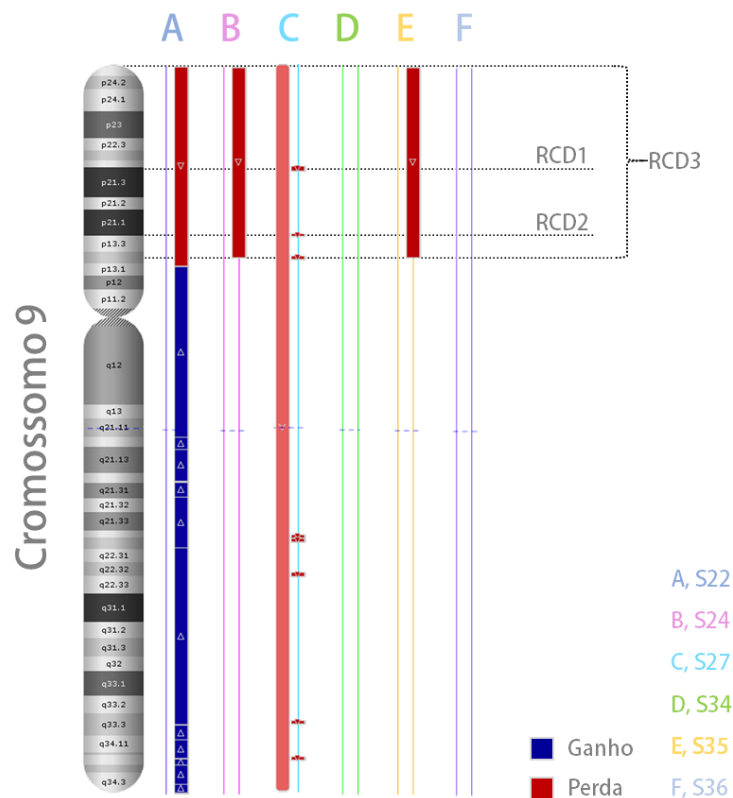


Figura 5.2. Perfil de alterações no cromossomo 9 em pacientes com deleções completas do *IKZF1*. A figura ilustra as CNAs encontradas no cromossomo 9 de seis amostras (A-F) analisadas por microarranjo. As barras azul e vermelha correspondem à amplificação e deleção, respectivamente. Duas regiões comuns de deleção (RCD1 e RCD2) presentes em quatro amostras com deleção no 9p foram destacadas, além de uma região comum de deleção (RCD3) em três amostras estudadas.



As alterações encontradas no cromossomo 7 foram diversas e caracterizadas principalmente por deleções. Na Figura 5.3, as deleções estão representadas em vermelho e os ganhos estão destacados em azul. Cada cor e letra (A-F) representa um paciente analisado: S22, S24, S27, S34, S35 e S36, respectivamente. As seis amostras estudadas apresentaram o seguinte perfil de CNAs no cromossomo 7: deleção do braço curto e duplicação do braço longo, sugerindo a presença de um isocromossomo 7q ( $n = 1$ ), monossomia ( $n = 2$ ) e deleção extensa da região centromérica ( $n = 1$ ) e deleção parcial do braço curto com ponto de quebra no íntron 5 do gene *COBL* ( $n = 2$ ).

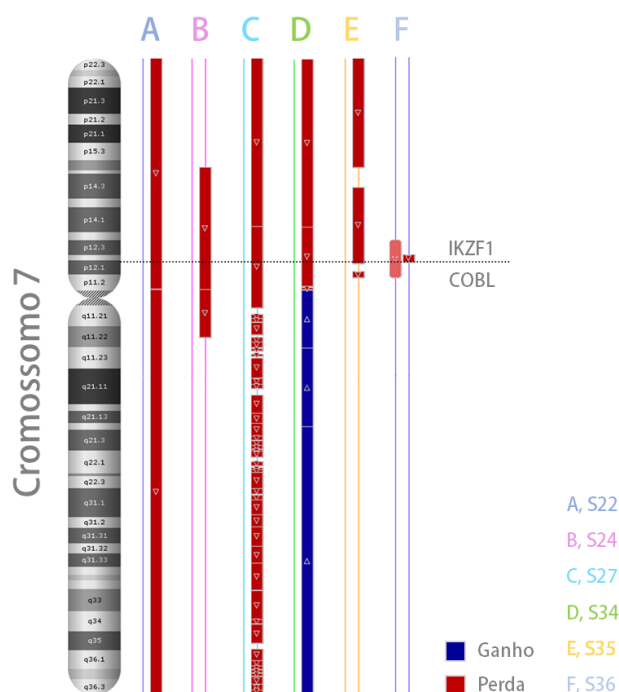


Figura 5.3. Perfil de alterações no cromossomo 7 em pacientes com deleções completas do *IKZF1*.

A figura ilustra as CNAs encontradas no cromossomo 7 de seis amostras (A-F) analisadas por microarranjo. As barras azul e vermelha correspondem à amplificação e deleção, respectivamente. A localização dos genes *IKZF1* e *COBL* está destacada na figura.

As deleções completas de *IKZF1* corresponderam a três perfis gerais de alteração no cromossomo 7: (1) grandes deleções de segmentos do cromossomo ou (três de seis amostras), monossomia 7 (duas de seis amostras) e isocromossomo (7q) (uma de seis amostras). Além disso, a análise de microarranjo destacou a presença de quebra do DNA no íntron 5 do *COBL* em duas das seis amostras avaliadas.

#### 5.4 Identificação de rearranjo *PAX5-AUTS2* em amostra com deleção completa de *IKZF1*

A investigação de CNAs por microarranjo identificou grandes deleções nos cromossomos 1, 7 e 9 na amostra S24 (Figura 5.4A). A partir de investigação de relatos dessas alterações na literatura, foram encontrados trabalhos demonstrando a existência da translocação t(7;9)(q11.2;p13.2), que poderia ter ocorrido neste paciente, tendo em vista seu perfil de CNAs. Com base nos achados descritos na literatura, esse trabalho buscou identificar a mesma translocação na amostra. O resultado das análises de MP-PCR com DNA genômico da amostra de diagnóstico confirmou a fusão gênica entre o íntron 6 de *Paired Box Domain Gene 5 (PAX5)* e o íntron 4 de *Autism Susceptibility Candidate 2 (AUTS2)* (Figura 5.4B). Em seguida, o ensaio de RT-PCR revelou que havia produção do transcrito quimérico *PAX5-AUTS2*, com fusão do éxon 6 de *PAX5* ao éxon 5 de *AUTS2* (Figura 5.5A-B). A análise dos domínios da proteína de fusão mostrou que há conservação da maioria dos domínios de *AUTS2*, no entanto, a proteína quimérica apresenta perda dos três domínios de ligação ao DNA (Figura 5.5C). As nomenclaturas dos exons foram baseadas nas referências de sequências do NCBI NM\_016734 (*PAX5*) e NM\_015570 (*AUTS2*).



Figura 5.4. Perfil genômico de CNAs em amostra com rearranjo *PAX5-AUTS2*.

(A) Análise por microarranjo revelou grandes deleções nos cromossomos 1 (1q41~qter), chr7 (7p15.2~q11.22), e chr9 (9pter~p13.2). (B) As alterações nos cromossomos 7 e 9 indicaram a presença de um rearranjo entre o íntron 6 de *PAX5* e o íntron 4 de *AUTS2*, os quais foram confirmados por MP-PCR seguido de sequenciamento de Sanger. A localização do ponto de quebra nos genes *PAX5* e *AUTS2* foi indicada entre parênteses com base na anotação hg19 do genoma humano.

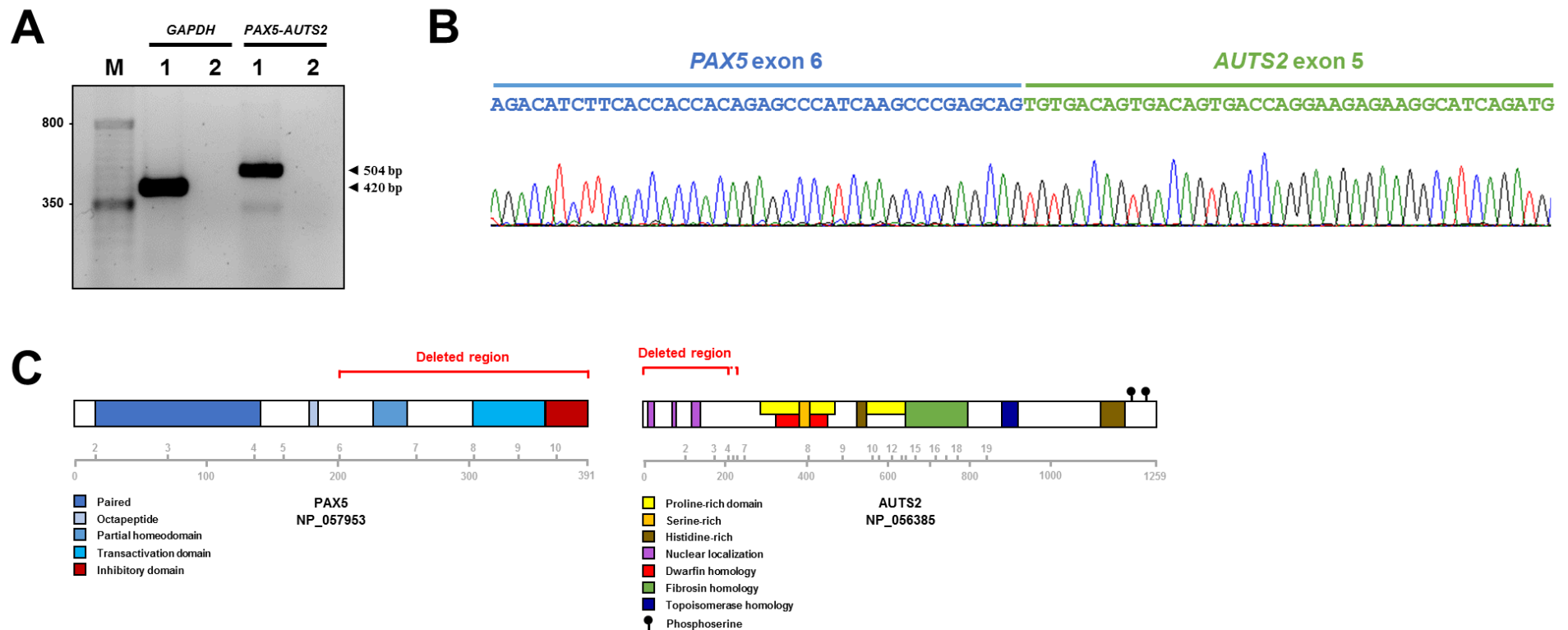


Figura 5.5. Transcrito *PAX5-AUTS2* e consequências na estrutura das proteínas na amostra S24.

(A) Análise de RT-PCR confirmou a expressão do transcrito quimérico direto (*PAX5-AUTS2*, 504 pb) na 1, amostra do paciente; 2, controle negativo; M, marcador de 50 pb. A amplificação do transcrito de *GAPDH* (420 pb) foi realizada para confirmar a integridade da amostra. (B) O sequenciamento de Sanger do transcrito direto mostrou a fusão entre o éxon 6 de *PAX5* e o éxon 5 de *AUTS2*. (C) Representação esquemática das proteínas *PAX5* e *AUTS2* selvagens com seus domínios funcionais. A ilustração destaca as regiões proteicas que são perdidas na proteína de fusão. Apesar da fusão de *AUTS2* variar dos éxons 4 a 6, todas as isoformas perdem seus domínios de localização nuclear e conservam o restante dos domínios.

A análise detalhada do resultado de microarranjo também revelou grandes deleções em 7pter~15.2 e 1q41~qter. Como ambas deleções poderiam ser consequentes de uma translocação não balanceada entre os cromossomos 1 e 7, desenhamos um ensaio de MP-PCR para amplificar o segmento previsto para o rearranjo no derivativo 1. No entanto, não foi possível identificar a região da fusão através de MP-PCR e sequenciamento de Sanger e provavelmente as bandas destacadas na figura são artefatos da amplificação por *nested-PCR* (Figura 5.6).

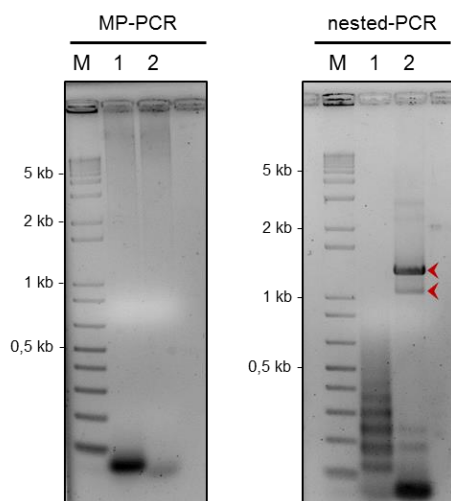


Figura 5.6. Eletroforese em gel de agarose 2% da MP-PCR e *nested-PCR* para identificação da fusão do derivativo 1 na amostra S24.

1-2, indicação das reações de PCR para a amostra, conforme descrito na metodologia do trabalho; M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. Alguns tamanhos de fragmentos (5, 2, 1 e 0,5 Kb) foram indicados na lateral esquerda do gel. As setas vermelhas apontam as bandas que foram sacadas do gel e sequenciadas. No entanto, não foi possível identificar a sequência da fusão através do sequenciamento de Sanger.

A análise de microarranjo na amostra S24 também mostrou que a quebra da dupla fita do DNA ocorreu no grupo de genes da família *HOXA*, presente na banda cromossômica 7p15. A quebra do DNA aconteceu mais especificamente entre os genes *Homeobox A13 (HOXA13)* e *HOXA Distal Transcript Antisense RNA (HOTTIP)*.

Apesar do resultado de microarranjo ter revelado que grandes porções das extremidades teloméricas do cromossomo 7 estavam conservadas na amostra S24, a região centromérica do cromossomo apresentava deleção monoalélica. A análise por FISH, através da utilização de sonda centromérica (7p11.1-q11.1; sinal verde) e

no braço longo (7q31; sinal laranja), apontou a ausência de um sinal verde e presença de dois sinais laranjas na amostra, confirmando a perda do derivativo 7 em 100% das células visualizadas na amostra S24 (Figura 5.7).

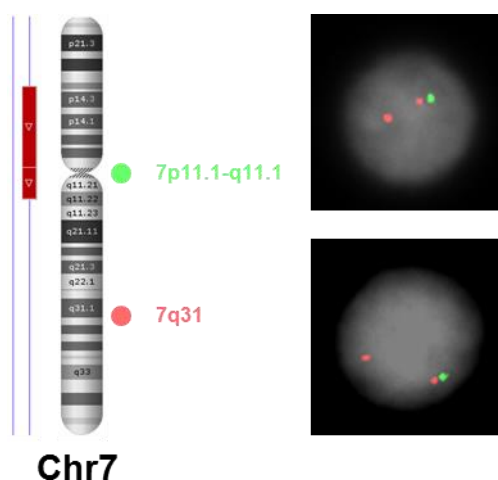


Figura 5.7. Perda do derivativo 7 na amostra S24.

O ensaio de microarranjo identificou uma grande deleção intersticial no cromossomo 7, conforme ilustrado na esquerda da imagem. Sondas de FISH centroméricas (7p11.1-q11.1; sinal verde) e no braço longo (7q31; sinal laranja) confirmaram a ausência de um sinal verde, indicando a perda do derivativo 7, e a presença de um sinal verde e laranja mais próximos, que hibridizaram com o alelo normal. Na direita da imagem foram exemplificadas duas células com a perda de um sinal verde e presença de dois sinais laranjas, caracterizadas por um cromossomo 7 normal (um sinal verde e laranja próximos), pela presença de região do 7q no derivativo 9 (um sinal laranja isolado) e pela perda do derivativo 7 (ausência de sinal verde isolado).

O perfil de CNA da amostra S24 mostrou que grandes deleções do braço curto do cromossomo 9 com quebra em *PAX5* podem ser resultado de translocações não balanceadas que levam à *IKZF1*  $\Delta$ 1-8. Portanto, através do ensaio de MLPA SALSA P335, buscou-se identificar amostras com o mesmo padrão de CNAs, representadas pela deleção de *CDKN2A* e *CDKN2B*, além da deleção parcial da porção terminal de *PAX5*. Dentre as amostras de LLA-CPB com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8, duas amostras (S04 e S35), além da amostra S24, apresentaram deleções com o perfil relatado. No entanto, a possibilidade de existir uma translocação não balanceada t(7;9) nessas amostras foi descartada tendo em vista que ambas não apresentaram deleções contínuas entre *IKZF1* (7p12) e a região 7q11.22, onde *AUTS2* está localizado durante a investigação de CNAs pelo MLPA customizado (conforme demonstrado anteriormente, a Figura 5.10 revela os resultados de CNAs entre 7p12~7q11.22).

## 5.5 Desenvolvimento e padronização de ensaio de MLPA para avaliação de número de cópias no cromossomo 7

O resultado da análise de microarranjo na coorte de descoberta (seis amostras com *IKZF1* Δ1-8) revelou diversos perfis de CNAs no cromossomo 7, onde *IKZF1* e *COBL* estão localizados. Como citado anteriormente, foram encontradas monossomias e grandes deleções, incluindo pontos de quebra no íntron 5 do *COBL*. O conhecimento destas alterações serviu como base para o estabelecimento de um ensaio de MLPA com sondas construídas para as principais regiões de interesse no cromossomo 7, conforme descrito na metodologia.

Após o desenho das sondas de MLPA para avaliar o *status* do cromossomo 7, o método foi validado com as amostras previamente estudadas por microarranjo. O resultado da validação está descrito na Figura 5.8, que mostra os gráficos de MLPA e a localização de cada sonda nas amostras do ensaio de validação. O ensaio de validação da MLPA apresentou boa correlação com os resultados de microarranjo (Figura 5.9). Na amostra S22, com monossomia 7 detectada por microarranjo, houve deleção de todos os sítios analisados. O resultado do microarranjo das duas amostras (S35 e S36) com deleção de *IKZF1* e ponto de quebra no *COBL* teve ótima correlação com o MLPA, que detectou uma deleção intersticial no 7p até a região de *COBL*. Apesar da análise pelo MLPA customizado das amostras S24 e S34 não serem totalmente concordantes, a metodologia permitiu a interpretação das CNAs no cromossomo 7 das amostras. A amostra S24, com deleção intersticial no cromossomo 7 pelo microarranjo, também apresentou deleção intersticial pelo MLPA, porém, com falha na detecção de deleção em duas sondas, que estavam próximas ao limiar (razão  $\leq 0,75$ ) assumido para a interpretação de deleções no MLPA. Da mesma maneira, a amostra S34, com i(7q) no microarranjo, falhou em quatro das dezoito sondas analisadas. Mesmo assim, o resultado não comprometeu a interpretação do i(7q) na amostra pelo MLPA customizado. Portanto, os resultados do MLPA *in-house* mostram que o ensaio foi capaz de detectar a maioria das alterações previamente identificadas por microarranjo. Apenas 6,7% (6/90) das regiões analisadas pelas sondas de MLPA customizado nas cinco amostras não apresentaram o perfil de CNA previsto pelo resultado de microarranjo, o que não comprometeu a interpretação do *status* do cromossomo 7 nessas amostras.

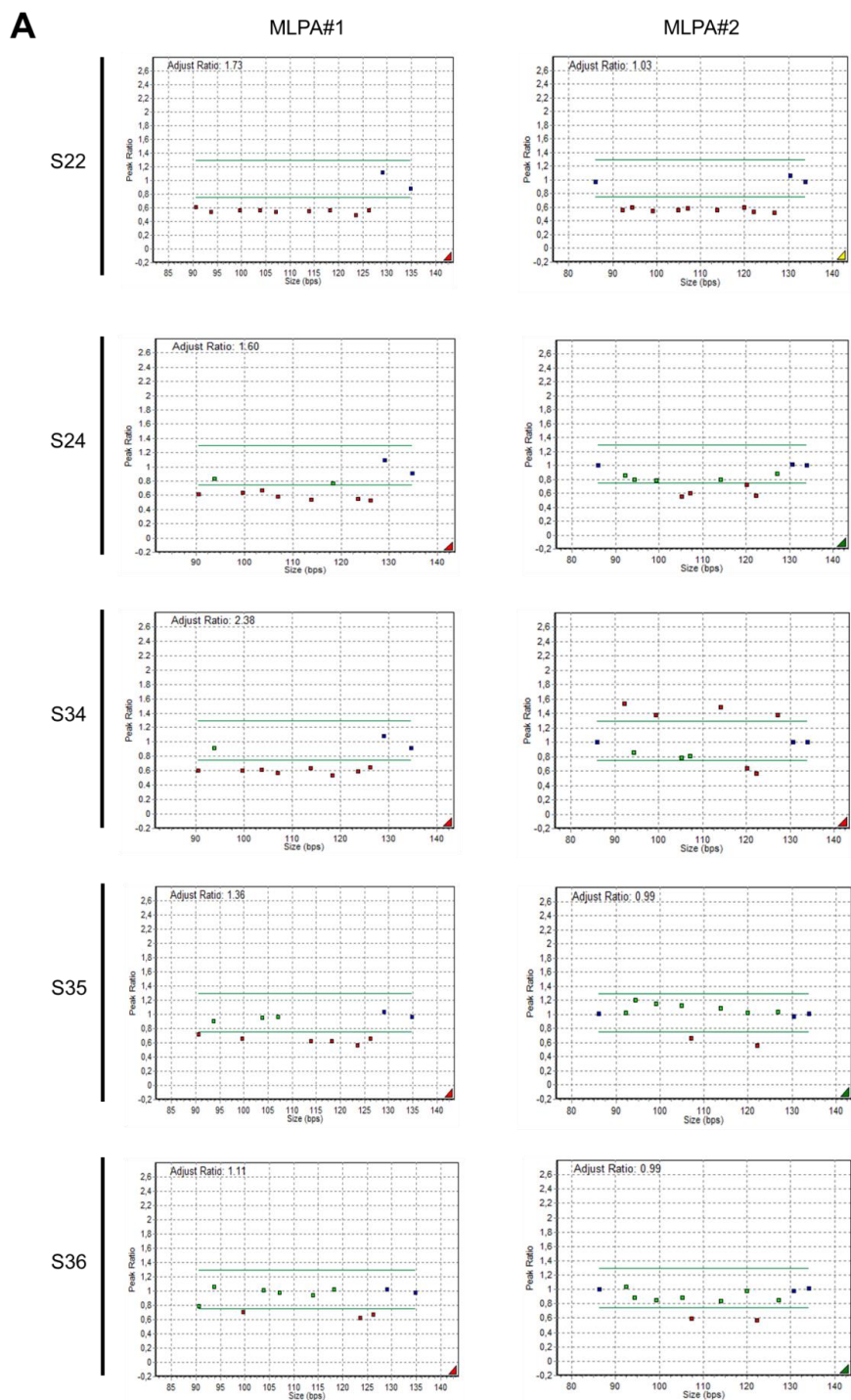


Figura 5.8. Validação do ensaio de MLPA *in-house* para o cromossomo 7.

A avaliação das CNAs no cromossomo 7 por MLA customizado foi realizada através de dois ensaios de MLPA (#1 e #2) utilizando as mesmas sondas controle para a interpretação conjunta dos resultados. A figura mostra gráficos de MLPA de cinco amostras (S22, S24, S34, S35 e S36) com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 previamente analisadas por microarranjo (SNP-array), onde duas linhas horizontais informam o limiar caracterizado pela amplificação ( $peak\ ratio > 1,30$ ) ou deleção ( $peak\ ratio < 0,75$ ) da região de cada sonda, representada por quadrados coloridos. As cores dos quadrados azul, verde e vermelha representam sondas controle, com padrão de CNA normal (2n), ou alterado (amplificado quando acima do limiar, ou deletado quando abaixo do mesmo).



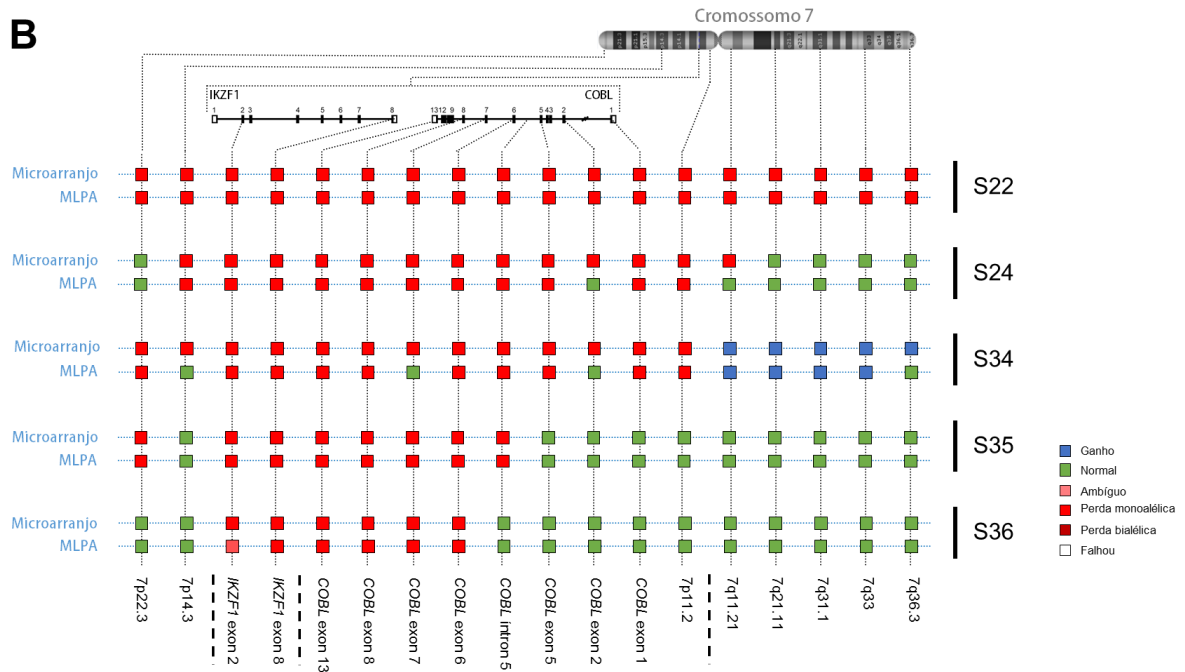


Figura 5.9. Validação do ensaio de MLPA *in-house* para o cromossomo 7.

O desenho compara os resultados de CNAs entre os ensaios de microarray e MLPA customizado em cinco amostras: S22, S24, S34, S35 e S36. As cores azul, verde, rosa, vermelha e vinho e branca e indicam respectivamente os perfis de ganho, selvagem, ambíguo, deleção monoalélica, bialélica e sondas que não puderam ser interpretadas na análise.

## 5.6 Análise de CNAs no cromossomo 7 por MLPA

Em seguida, foi iniciado o estudo do perfil de CNAs no cromossomo 7 na coorte de investigação (Tabela 5.5). Foram incluídas 45 amostras de LLA-CPB pediátrica com deleção *IKZF1* Δ1-8. A maioria dos casos incluídos foi meninos (56%) e diagnosticados com leucemia entre 1 e 9 anos de idade (69%). Da mesma forma, 44% dos casos apresentaram alto risco terapêutico segundo os critérios do NCI. O subtipo de LLA-CPB mais frequente correspondeu à LLA comum (68%) e ao subgrupo citogenético-molecular caracterizado como hiperdiploide pela análise de índice de DNA (28,6%). Nenhum caso com *IKZF1* Δ1-8 apresentou hipodiploidia ou *KMT2A-r*

Tabela 5.5. Características demográficas da coorte de investigação (n = 45).

<b>Características</b>	<b><i>IKZF1</i> Δ1-8 n (%)</b>
Sexo	
Masculino	25 (56)
Feminino	20 (44)
Faixa etária (anos)	
0-1	4 (9)
1-9	31 (69)
10-18	10 (22)
Leucometria (x10 <sup>6</sup> /L) <sup>a</sup>	
≤ 50.000	32 (71)
> 50.000	13 (29)
Risco NCI <sup>b</sup>	
Padrão	25 (56)
Alto	20 (44)
Diagnóstico	
LLA pro-B	3 (7)
LLA comum	30 (68)
LLA pré-B	11 (25)
Subgrupo citogenético-molecular	
Hiperdiploide	6 (28,6)
<i>ETV6-RUNX1</i>	2 (9,5)
<i>BCR-ABL1</i>	1 (4,8)
<i>TCF3-PBX1</i>	1 (4,8)
<i>P2RY8-CRLF2</i>	1 (4,8)
<i>KMT2A-r</i>	0 (0,0)
Hipodiploide	0 (0,0)
Outros <sup>c</sup>	10 (47,6)

<sup>a</sup> Leucometria mensurada no sangue periférico de amostra ao diagnóstico;

<sup>b</sup> Risco terapêutico de acordo com critérios do NCI, Instituto Nacional de Câncer dos EUA;

<sup>c</sup> O grupo "outros" refere-se às amostras que não apresentaram alterações recorrentes em LLA-CPB.

Com base nos resultados de microarranjo, nesse momento do estudo foram investigadas as CNAs no cromossomo 7, com um foco especial para o *COBL*, através de MLPA customizado. O resultado da análise está ilustrado na Figura 5.10. Quarenta e cinco amostras de LLA-CPB pediátrica foram incluídas no rastreamento por MLPA; 36 amostras (80%) apresentaram resultados conclusivos, que podem ser agrupados em seis perfis distintos: deleção intersticial no braço curto do cromossomo 7 (28%;  $n = 10$ ), monossomia 7 (19%;  $n = 7$ ), deleção intersticial com ponto de quebra no gene *COBL* (17%;  $n = 6$ ), deleção completa de *IKZF1* sem comprometimento de outras regiões analisadas (14%;  $n = 5$ ), isocromossomo (7q) (11%;  $n = 4$ ) e perda do braço curto do cromossomo 7 (11%;  $n = 4$ ).

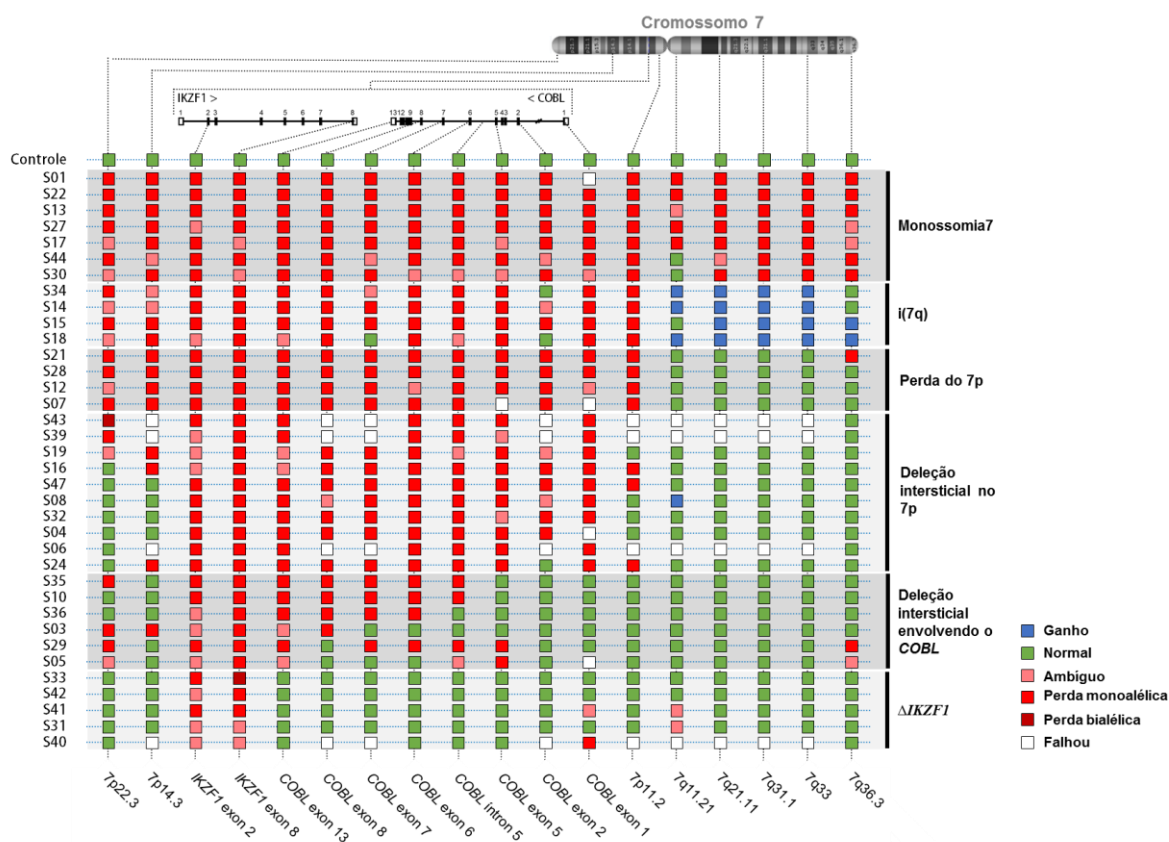


Figura 5.10. CNAs em amostras com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 rastreadas pelo MLPA customizado.

As CNAs foram indicadas para cada sonda localizada no cromossomo 7 e nos genes *IKZF1* e *COBL*. Cada amostra foi disposta em uma linha, onde os quadrados coloridos referem-se às sondas usadas no ensaio. As cores azul, verde, rosa, vermelha e vinho e branca e indicam respectivamente os perfis de ganho, selvagem, ambíguo, deleção monoalélica, bialélica e sondas que não puderam ser interpretadas na análise. A interpretação da alteração do cromossomo 7 correspondente às CNAs identificadas por MLPA em cada amostra está disposta na lateral direita da figura.

Conforme apresentado acima no sumário dos resultados de MLPA, a amostra S03 apresentou deleção a partir de 7pter até o íntron 7 de *COBL*. O resultado indicou a quebra no íntron 7, com 41.473 pb. Com o objetivo de restringir o local do ponto de quebra, foram desenhadas mais três sondas distribuídas no íntron 7 de *COBL*, utilizadas no terceiro ensaio customizado de MLPA. O resultado da análise mostrou que a região de quebra do DNA ocorreu no segundo quarto do íntron 7 (Figura 5.11), restringindo a região de quebra para uma área de 11.333 pb, o que viabilizou a análise da sequência por LDI-PCR.

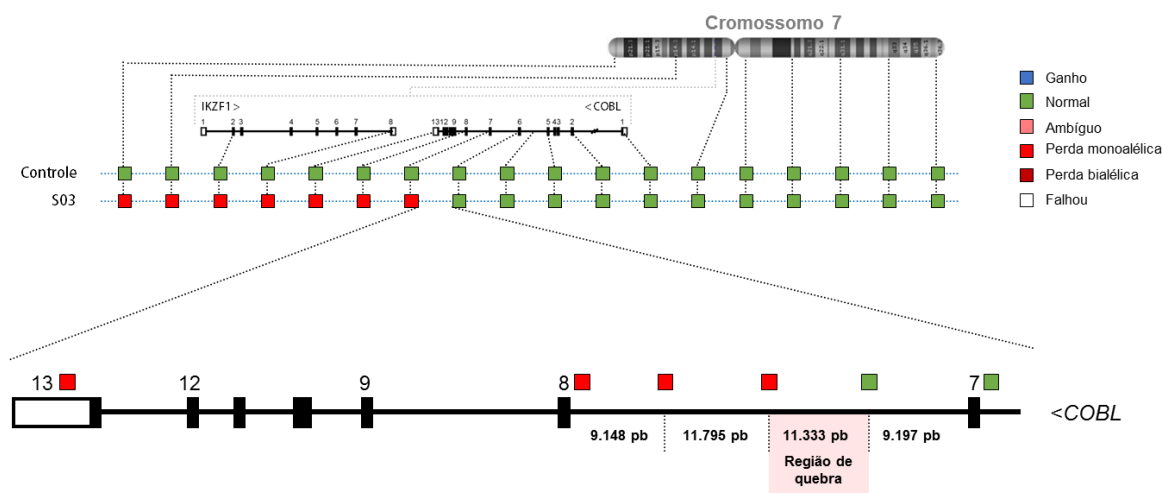


Figura 5.11. Rearranjo no íntron 7 de *COBL* identificado pelo MLPA customizado na amostra S03.

As CNAs foram indicadas para cada sonda localizada no cromossomo 7 e nos genes *IKZF1* e *COBL*. A amostra e controle analisados foram dispostos nas linhas, onde os quadrados coloridos referem-se às sondas usadas no ensaio. As cores azul, verde, rosa, vermelha, vinho e branca indicam respectivamente os perfis de ganho, selvagem, ambíguo, deleção monoalélica, bialélica e sondas que não puderam ser interpretadas na análise. Os ensaios de MLPA#1-2 indicaram deleção a partir de 7pter até o íntron 7 de *COBL*. Após o desenho de novas sondas distribuídas nesse íntron, foi possível restringir a região de quebra para uma região de 11.333 pares de base na amostra S03.

## 5.7 Sequenciamento das regiões de quebra por MP-PCR

Apesar das análises de microarranjo apresentarem a vantagem de proporcionar uma compreensão global das CNAs, elas não são capazes de determinar a sequência do local da quebra do DNA para a formação de deleções ou ampliações. Dessa forma, as deleções *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 iniciadas no *COBL* que foram identificadas por microarranjo foram confirmadas através de MP-PCR de longa distância. Foram desenhados 10 oligonucleotídeos senso e 10 antisenso para anelar ao DNA a cada ~2 Kb e flanquear uma região de ~20 Kb em torno do ponto de quebra indicado pelo microarranjo. A estratégia utilizada para a detecção dos pontos de quebra nas amostras S35 e S36 está descrita na Figura 5.12A e na Figura 5.13A, respectivamente.

Com base nesta estratégia, foram realizadas duas reações para amplificar a fusão resultante da deleção entre a região 7p14.3~*COBL* (amostra S35) e 7p12.2~*COBL* (S36). Como observado nas Figura 5.12B e Figura 5.13B, foi possível amplificar a região da fusão do 7p14.3 ou 7p12.2 com o íntron 5 do *COBL* em ambas as amostras. Através do sequenciamento dos produtos amplificados na MP-PCR, foi possível determinar a sequência exata da quebra do DNA nas amostras (Figura 5.12C e Figura 5.13C).

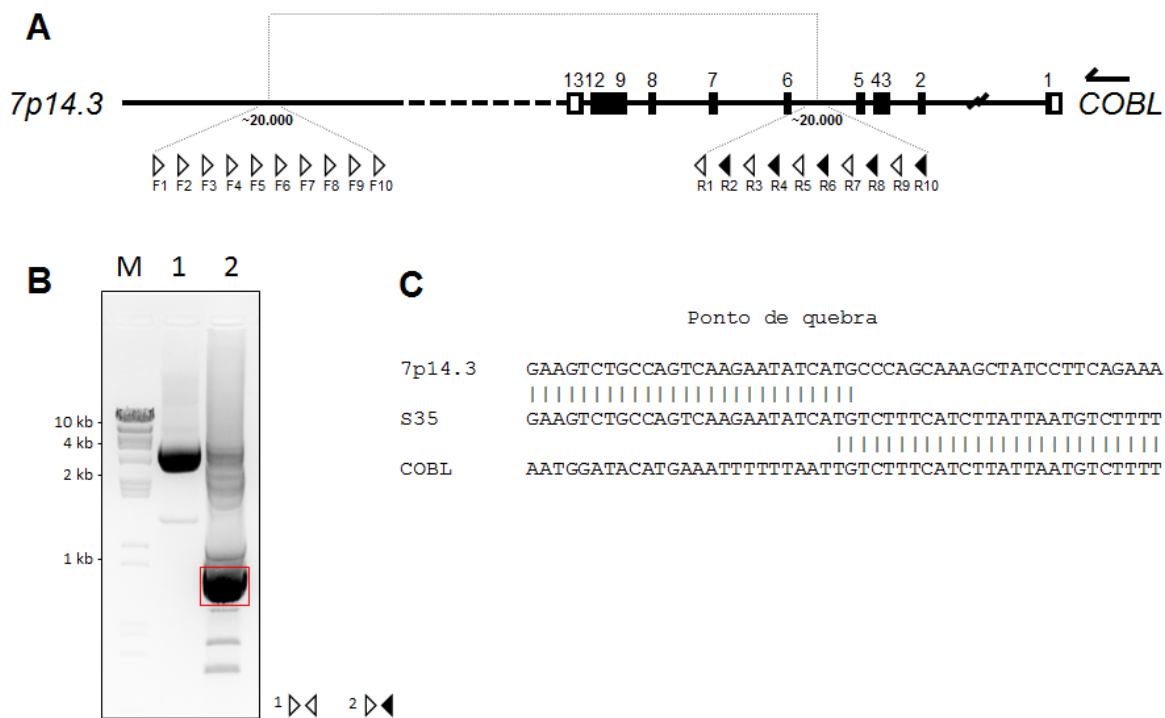


Figura 5.12. Confirmação do ponto de quebra no íntron 5 do *COBL* da amostra S35.

O esquema ilustra a estratégia para amplificação e sequenciamento do ponto de quebra indicado pelo microarranjo na amostra S35. A, a MP-PCR foi realizada em duas reações separadas, com a combinação de dez oligonucleotídeos sense com cinco oligonucleotídeos antisense ilustrados em branco (reação #1) ou preto (reação #2); B, eletroforese com gel de agarose da MP-PCR, onde o quadrado vermelho indica o produto utilizado no sequenciamento; C, sequência da fusão entre 7p14.3 e *COBL* na amostra S35. Foram descritas as sequências selvagens das regiões 7p14.3 e de *COBL* e a sequência equivalente na amostra S35. M, marcador de peso molecular; 1, combinação de oligonucleotídeos #1; 2, combinação de oligonucleotídeos #2.

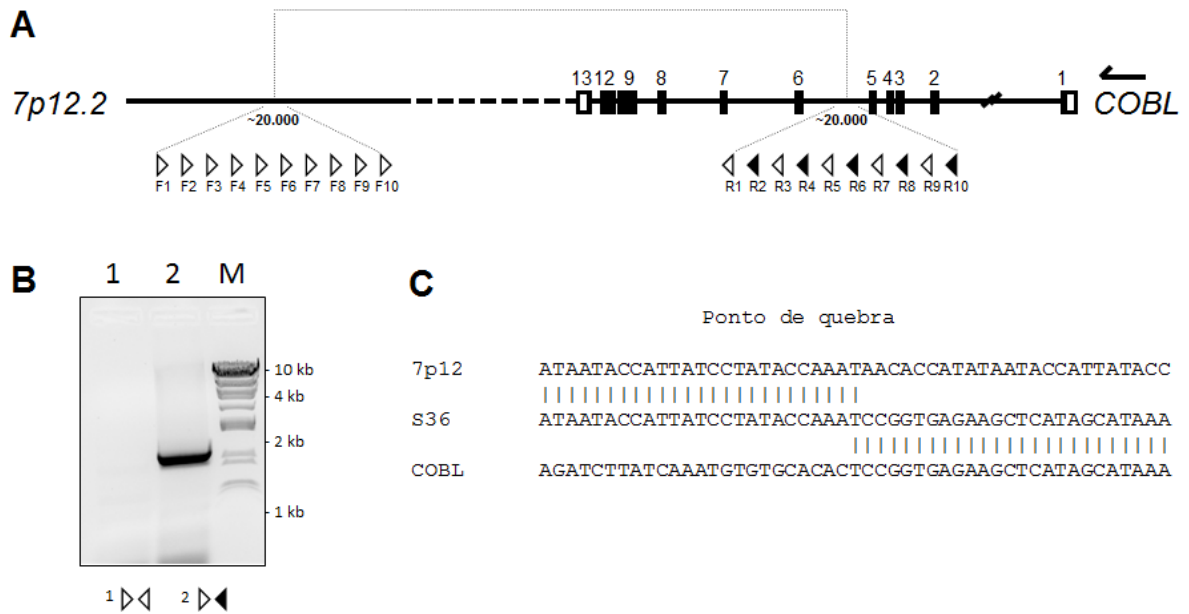


Figura 5.13. Confirmação do ponto de quebra no íntron 5 do *COBL* na amostra S36.

O esquema ilustra a estratégia para amplificação e sequenciamento do ponto de quebra indicado pelo microarranjo na amostra S36. A, a MP-PCR foi realizada em duas reações separadas, com a combinação de dez oligonucleotídeos senso com cinco oligonucleotídeos antisenso ilustrados em branco (reação #1) ou preto (reação #2); B, eletroforese com gel de agarose da MP-PCR, onde a banda amplificada foi utilizada no sequenciamento; C, sequência da fusão entre 7p12 e *COBL* na amostra S36. Foram descritas as sequências selvagens das regiões 7p12 e de *COBL* e a sequência equivalente na amostra S36. M, marcador de peso molecular; 1, combinação de oligonucleotídeos #1; 2, combinação de oligonucleotídeos #2.

Como descrito acima, a análise combinada de microarranjo e sequenciamento permitiu a detecção da sequência da região onde ocorreram as quebras do braço curto do cromossomo 7. A Figura 5.14 ilustra a extensão da deleção de *IKZF1* e parte de *COBL* nas duas amostras com ponto de quebra no último gene, além de destacar os principais genes envolvidos na deleção. A extensão das deleções apresentou ampla variação entre as amostras S35 e S36, correspondendo a ~18,8 Mb e ~1,7 Mb, respectivamente. Apesar da considerável diferença de tamanho, ambas as deleções tiveram ponto de quebra no íntron 5 do *COBL*. A deleção de ~1,7 Mb acometeu apenas sete genes (*VWC2*, *ZPBP*, *IKZF1*, *FIGNL1*, *DDC*, *GRB10* e *COBL*), enquanto a deleção de ~18,8 Mb abrangeu cerca de 72 genes.

Visto que o ensaio de microarranjo não possui cobertura precisa o suficiente para detectar o ponto exato da quebra do DNA, cabe ressaltar que em geral houve uma pequena superestimação do tamanho das deleções nas leituras de microarranjo; a exceção foi a subestimação da deleção da amostra S36 na região 7p12.2. A comparação da localização do ponto de quebra do DNA entre os ensaios de microarranjo e sequenciamento apresentou diferença de 1.729 pb (extremidade 7p14.3) e 5.580 pb (*COBL*) na amostra S35, e 5.580 pb (7p12.2) e 719 pb (*COBL*) na amostra S36 (Figura 5.14). O resultado final que representa a localização exata da quebra do DNA foi obtido com o sequenciamento do DNA.



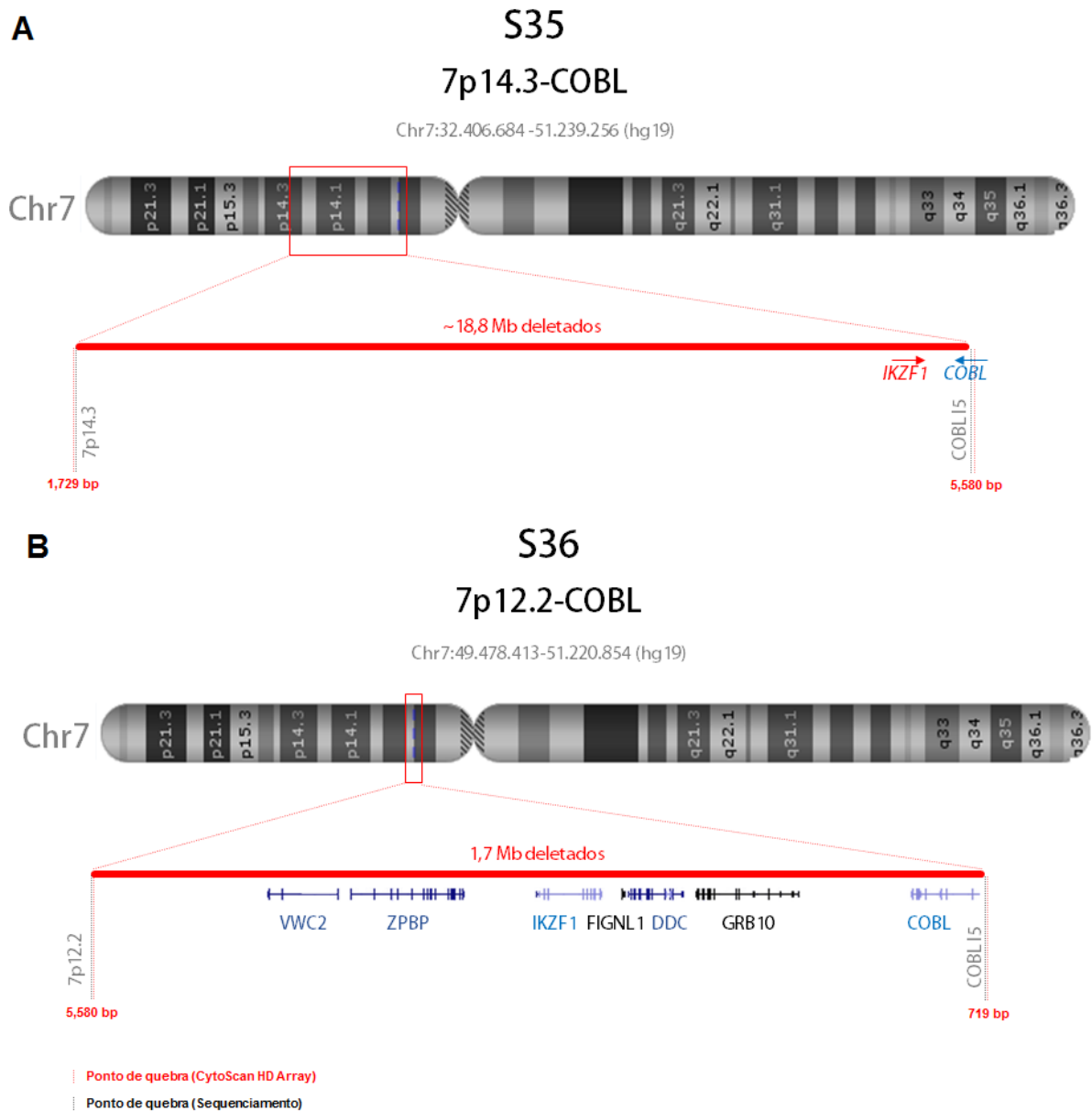


Figura 5.14. Região de deleção do cromossomo 7, com perda completa de um alelo de *IKZF1* e outros genes adjacentes.

Ilustração da extensão da deleção de *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 nas amostras (A) S35 e (B) S36. A localização da região envolvida na deleção foi descrita de acordo com a montagem genômica hg19. Os retângulos vermelhos mostram a região deletada e as barras vermelhas horizontais indicam o tamanho das deleções, além dos principais genes acometidos. As extremidades das barras horizontais vermelhas destacam os pontos de quebra indicados pelos ensaios de microarranjo (vermelho) e os confirmados pelo sequenciamento (preto).

## 5.8 Sequenciamento das regiões de quebra por LDI-PCR

Levando em consideração a identificação de *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 com ponto de quebra no *COBL* através do ensaio de MLPA, foram desenhados ensaios de LDI-PCR para analisar possíveis *hotspots* presentes nos íntrons 5 e 7 de *COBL*. Os ensaios de LDI-PCR cobriram uma região de 29.204 pb e 11.530 pb nos íntrons 5 e 7 de *COBL*, respectivamente. As regiões investigadas por LDI-PCR englobaram os locais de quebra do DNA encontrados em três pacientes com LLA-CPB: dois resultantes da análise de microarranjo e sequenciamento deste estudo (S35 e S36) e um previamente publicado na literatura (P#3) (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013).

Conforme apresentado na seção de metodologia, as reações de LDI-PCR foram padronizadas a partir de amostra controle. As bandas mais intensas correspondem ao padrão de amplificação de regiões sem alterações na sequência dos íntrons 5 e 7 de *COBL*. A presença de banda de tamanho diferente da relacionada ao padrão selvagem é um indicativo de que há alguma alteração na sequência do DNA na região amplificada. Portanto, estas bandas foram purificadas e sequenciadas para a verificação da região do genoma correspondente ao fragmento e para a detecção do ponto de quebra no DNA. Bandas com menor intensidade geralmente correspondem a artefatos de amplificação derivados do reconhecimento inespecífico de sítios de restrição pelas enzimas utilizadas na técnica, pela ligação do DNA a diferentes fragmentos e reconhecimento inespecífico dos oligonucleotídeos; apesar disso, estes fatos não comprometem a interpretação dos resultados, tendo em vista que o padrão de bandas na eletroforese em cada caso é comparado ao padrão da amostra controle e os produtos gerados são sequenciados, permitindo assim a análise de sítios de restrição no local do ponto de quebra para indicar se houve construção de um artefato metodológico.

Após padronização, as LDI-PCRs foram usadas para amplificar a região de quebra nos íntrons 5 e 7 de *COBL* indicada pelo MLPA customizado em amostras de LLA-CPB com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8. Durante esta etapa, a LDI-PCR desenhada no íntron 5 de *COBL* identificou a região de quebra da amostra S10, enquanto a LDI-PCR no íntron 7 de *COBL* foi utilizada para buscar a região de quebra da amostra S03.

O resultado da análise por LDI-PCR mostrou que, diferentemente dos padrões previamente detectados nas amostras S35 e S36, com uma deleção

intersticial no braço curto do cromossomo 7 envolvendo o *IKZF1* e o *COBL*, a amostra S10 apresentou uma inversão de cerca de 1,1 Mb a partir do íntron 5 do *COBL* (Figura 5.15); apesar de não ter sido possível detectar o ponto de quebra telomérico no 7p, pressupomos que também houve uma deleção da mesma região visto que o *IKZF1* está completamente deletado nesta amostra. As análises de microarranjo, MP-PCR e LDI-PCR permitiram a detecção de alterações moleculares no íntron 5 do *COBL* em três amostras (50% das amostras com rearranjos de *COBL*) correspondentes a ~8% das amostras das LLA-CPB com *IKZF1* Δ1-8.

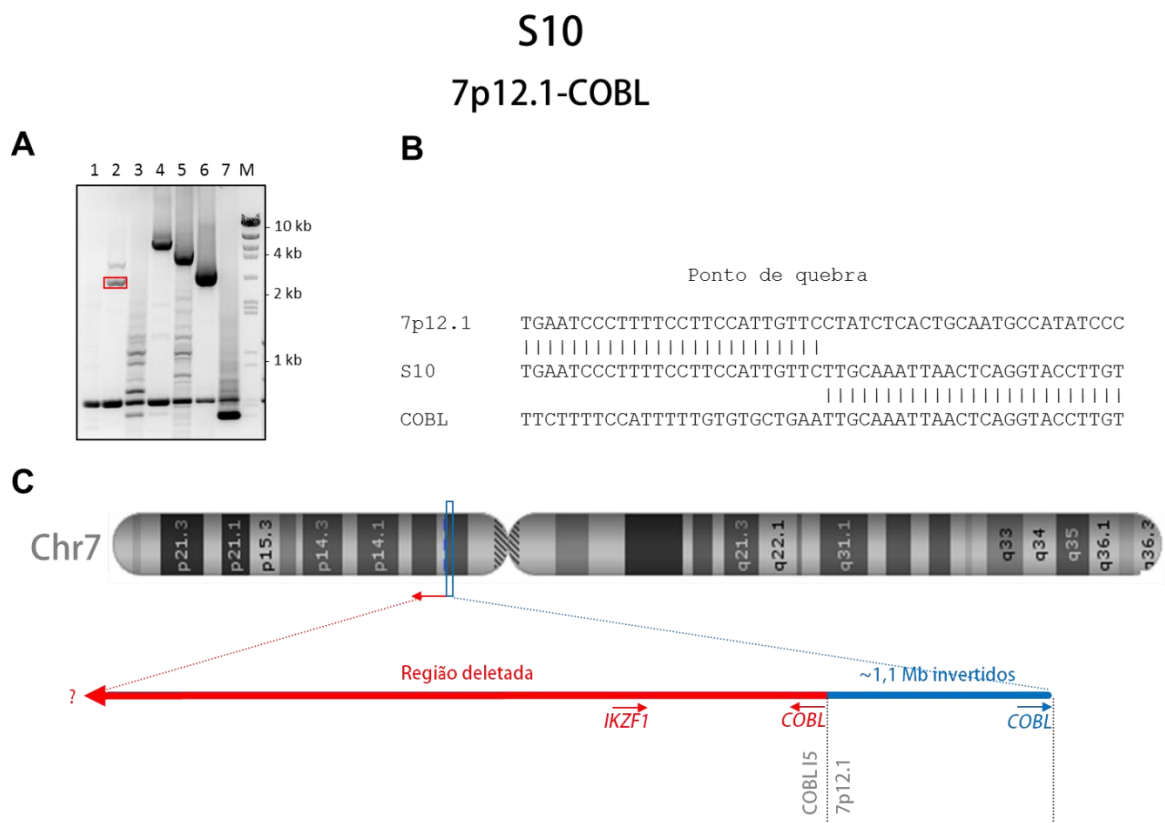


Figura 5.15. Amostra (S10) com inversão envolvendo o *COBL*.

O esquema ilustra a amplificação e sequenciamento do ponto de quebra da amostra S10 por LDI-PCR. (A) eletroforese em gel de agarose da LDI-PCR com amplificação a partir da combinação de sete pares de oligonucleotídeos (1-7) referentes à LDI-PCR#1, conforme descrito na metodologia (Quadro 4.3). M, marcador de peso molecular, onde o tamanho das principais bandas foi indicado à direita do gel. A banda alterada destacada em vermelho representa o fragmento que foi isolado do gel para purificação e sequenciamento; (B) sequência da região de ponto de quebra entre a região 7p12.1 e o íntron 5 de *COBL*; (C) representação da CNA na região entre *IKZF1* e *COBL*, onde a barra horizontal vermelha indica a região deletada e a barra azul representa a região de ~1,1 Mb que apresentou inversão.

Em seguida, buscou-se identificar a sequência da região de quebra no íntron 7 de *COBL* na amostra S03. Nesse caso, a LDI-PCR foi desenhada na região em que o MLPA indicou haver a quebra do DNA. No entanto, após amplificação e análise por sequenciamento de Sanger de bandas diferentes do padrão normal, não foi possível identificar a sequência do ponto de quebra nessa amostra, sugerindo que não houve uma deleção intersticial na região analisada (Figura 5.16).

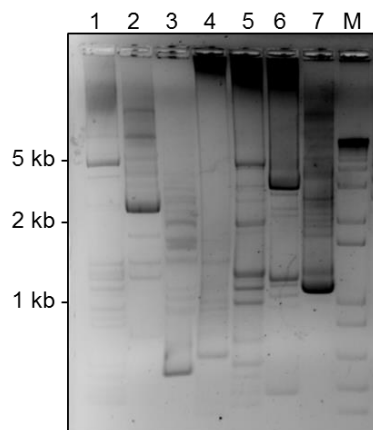


Figura 5.16. Eletroforese em gel de agarose 2% da LDI-PCR no íntron 7 de *COBL* na amostra S03. 1-7, indicação das reações de LDI-PCR para a amostra, conforme descrito na metodologia do trabalho; M, marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, com tamanhos de fragmentos de 5, 2 e 1 Kb indicados na lateral esquerda do gel.

### 5.9 Identificação de rearranjos no *COBL* em amostras com deleção intragênica de *IKZF1*

A partir da descoberta de rearranjos de *COBL* em pacientes com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8, investigou-se a presença dessas alterações em amostras com deleção intragênica de *IKZF1*, cuja deleção tenha comprometido a porção terminal do gene, aqui denominadas *IKZF1*  $\Delta$ n-8. O rastreamento dessas amostras foi baseado na possível ocorrência de uma fusão entre as regiões terminais dos genes *IKZF1* e *COBL*.

Para esta etapa do estudo foram incluídas 24 amostras de LLA-CPB pediátrica com deleções de *IKZF1* do tipo  $\Delta$ 2-8 ( $n = 7$ ),  $\Delta$ 3-8 ( $n = 1$ ),  $\Delta$ 4-8 ( $n = 11$ ) e  $\Delta$ 8 ( $n = 5$ ). A análise por MLPA das amostras identificou a fusão *IKZF1-COBL* em um paciente (Figura 5.17A-B), compreendendo ~4% dos pacientes desse grupo. Após confirmação da alteração pelo MLPA customizado, a região da fusão foi amplificada

por LDI-PCR. O sequenciamento de Sanger permitiu confirmar que o paciente apresentou uma fusão entre o íntron 3 de *IKZF1* com o íntron 5 de *COBL* (Figura 5.17C). Além disso, o sequenciamento revelou que a junção do rearranjo apresentou nucleotídeos adicionais (5'-GGCCC-3').

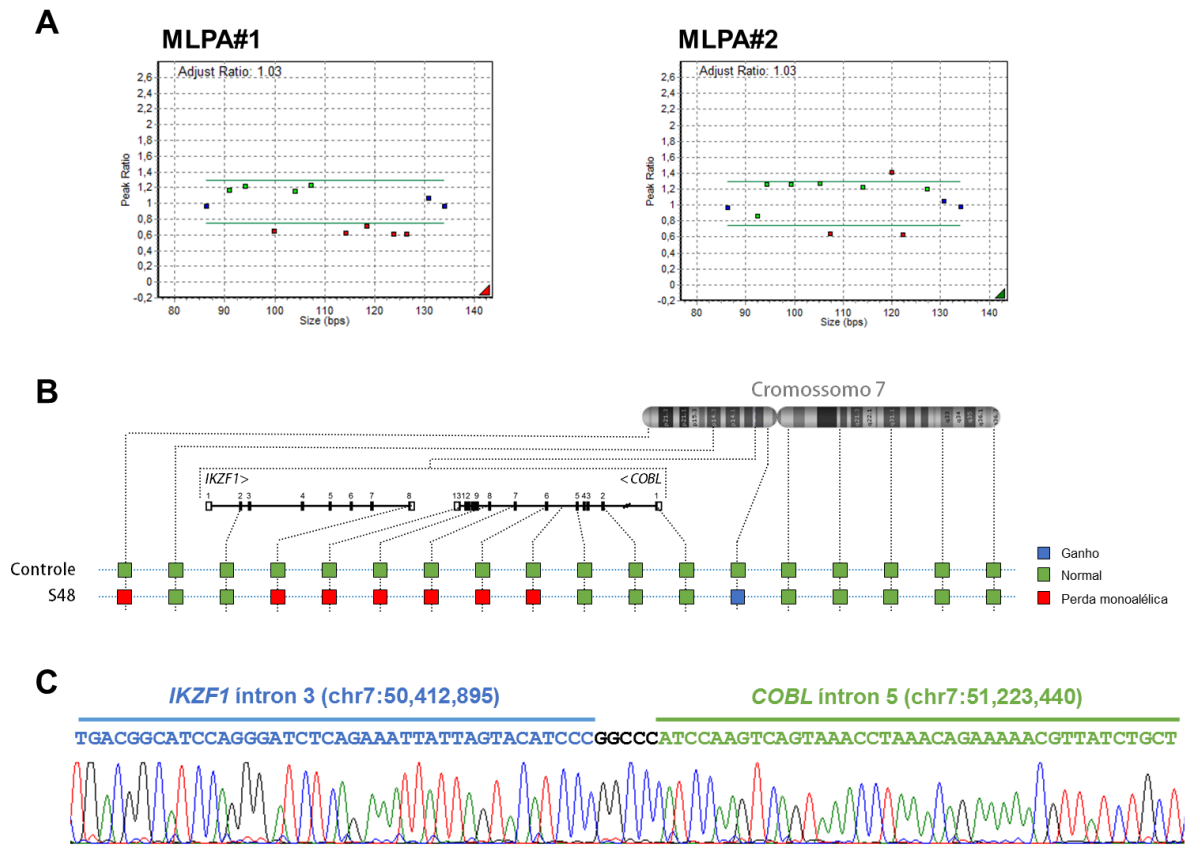


Figura 5.17. Identificação da fusão *IKZF1-COBL* no paciente S48.

(A) gráfico com o resultado de dois ensaios de MLPA customizados para a identificação de alterações no cromossomo 7 em paciente com recaída de LLA-CPB (amostra S48). (B) a interpretação dos dados do MLPA revelou que o paciente possuía uma deleção intersticial entre *IKZF1* e *COBL*. A amostra analisada foi disposta em uma linha, juntamente com o controle, onde os quadrados coloridos referem-se às sondas usadas no ensaio. As cores azul, verde e vermelha indicam respectivamente os perfis de ganho, selvagem e deleção monoalélica. (C) eletroferograma do sequenciamento do produto da LDI-PCR no íntron 5 de *COBL*, mostrando a fusão entre o íntron 3 de *IKZF1* com o íntron 5 de *COBL*. Os pontos de quebra em ambos os genes também foram indicados na figura.

## 5.10 Estudo de mecanismos de recombinação nas regiões de quebra

O próximo passo da análise foi a identificação de sequências associadas com mecanismos de recombinação do DNA. Esta análise comparou as sequências de quebra encontradas nesse trabalho com sequências de quebra de deleções intragênicas de *IKZF1* previamente publicadas na literatura (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA, T. C.; *et al.*, 2013).

Primeiramente buscou-se sequências sinais de recombinação (RSSs) para RAG, que são caracterizadas por duas sequências consenso, um heptâmero (5'-CACAGTG-3') e um nonâmero (5'-ACAAAACC-3'), inter espaçados com 12 ou 23 pb (12RSS e 23RSS, respectivamente). As análises foram realizadas com auxílio de uma plataforma eletrônica publicada por Merelli e colaboradores (MERELLI *et al.*, 2010). O programa classifica as sequências de acordo com a probabilidade de serem sítios de reconhecimento de RAG. Desta forma, é gerado um valor classificatório para cada sequência semelhante à RSS, denominado "RIC score". Quanto mais alto o valor de "RIC score", maior a semelhança da sequência do gene estudado com a sequência consenso RSS e, portanto, maior a probabilidade do mesmo ser um sítio de reconhecimento de RAG.

### 5.10.1 Sequências sinais de recombinação no cromossomo 7

O mapeamento de sequências análogas às RSSs reconhecidas por RAG na fita positiva e negativa de todo o cromossomo 7 está representado na Figura 5.18. Sequências 12RSS (Figura 5.18A) e 23RSS (Figura 5.18B) estão espalhadas ao longo de todo o cromossomo 7. As sequências mais semelhantes à RSS estão alocadas nas bandas 7p14.1 e 7q34, onde estão presentes os *loci* do receptor de célula T, cadeias gama (*TRG*) e beta (*TRB*), respectivamente. Apesar disso, essas regiões não apresentaram alterações em nenhuma das seis amostras analisadas por microarranjo.

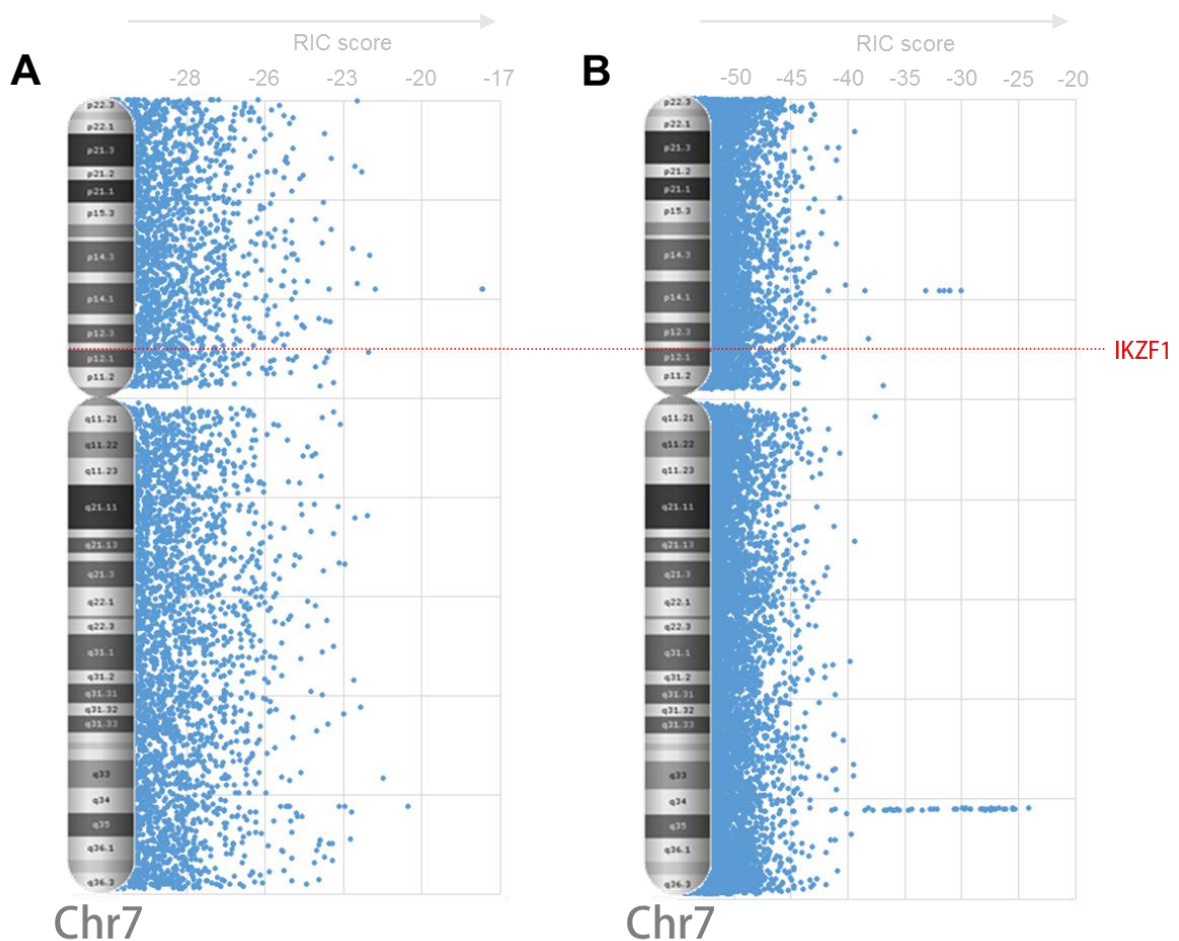


Figura 5.18. Sequências RSS ao longo do cromossomo 7.

A figura ilustra a localização de (A) 12RSS e (B) 23RSS dispersos ao longo do cromossomo 7 na fita positiva e negativa. Os pontos azuis do gráfico representam cada sequência análoga à RSS. A similaridade das sequências do gene com as RSSs de RAG é proporcional ao valor “RIC score”. A localização de *IKZF1* foi destacada em vermelho no gráfico. Chr7, cromossomo 7.

Em seguida, foram analisadas as sequências 12RSS e 23RSS significantes que estão distribuídas nos genes mais frequentemente alterados nas *IKZF1*  $\Delta$ 1-8. A Figura 5.19 mostra RSSs no gene *IKZF1*. As sequências mais semelhantes à 12RSS, reveladas pelos “RIC score” mais altos, foram encontradas nos íntrons 1 e 2 de *IKZF1*, enquanto sequências com maior analogia à 23RSS estavam presentes no íntron 3, íntron 7 e éxon 8 deste gene (Figura 5.19A e B, respectivamente).

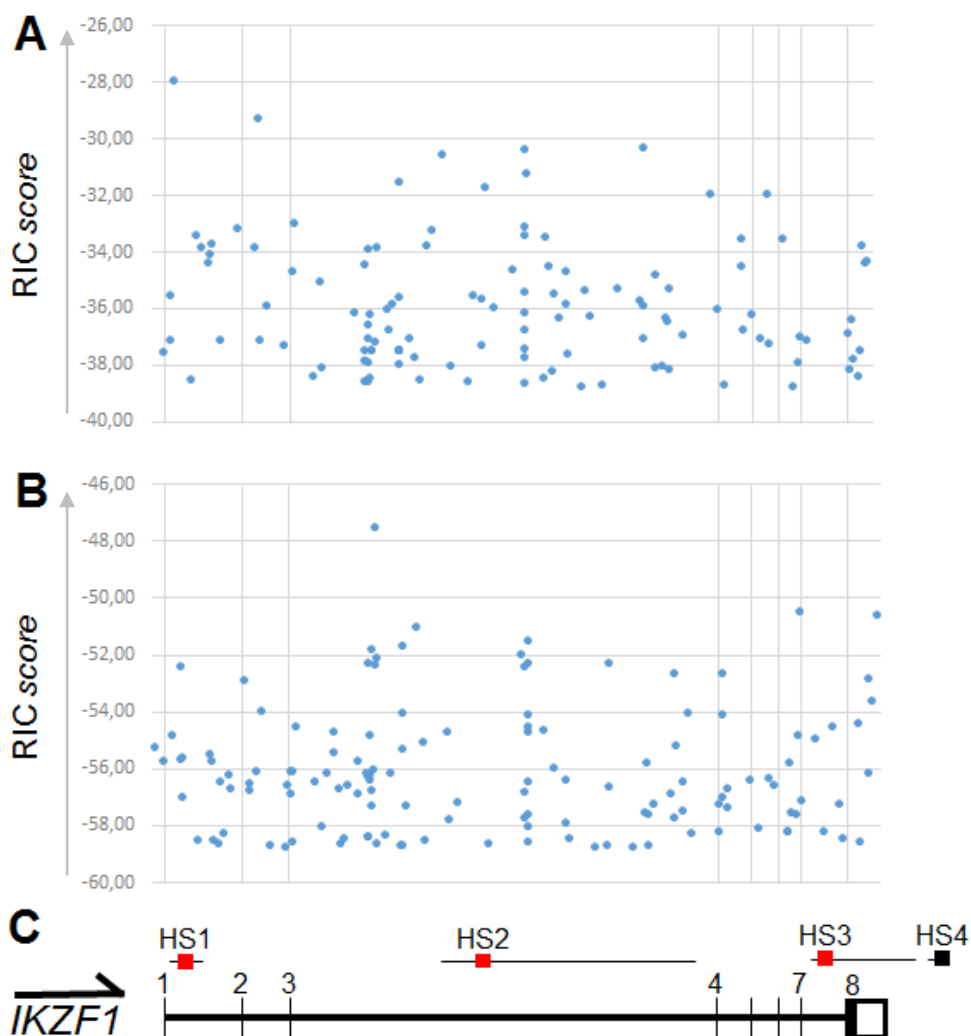


Figura 5.19. Sequências RSS ao longo de *IKZF1*.

A figura ilustra a localização de (A) 12RSS e (B) 23RSS dispersos ao longo de *IKZF1*. Os pontos azuis do gráfico representam cada sequência análoga à RSS na fita positiva e negativa. A similaridade das sequências do gene com as RSSs de RAG é proporcional ao valor “RIC score”. (C) Estrutura do gene *IKZF1* e as principais regiões de ponto de quebra (*Hotspots*, HS) descritas na literatura (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013). Os quadrados numerados representam cada éxon do gene.



De forma semelhante ao *IKZF1*, o *COBL* também apresentou sequências possivelmente relacionadas ao reconhecimento pela RAG dispersas ao longo do gene (Figura 5.20). As sequências mais parecidas com a sequência consenso 12RSS foram encontradas nos íntrons 5 e 7 do *COBL*, enquanto sequências semelhantes à 23RSS estavam presentes nos íntrons 4 e 7 (Figura 5.20A e B, respectivamente).

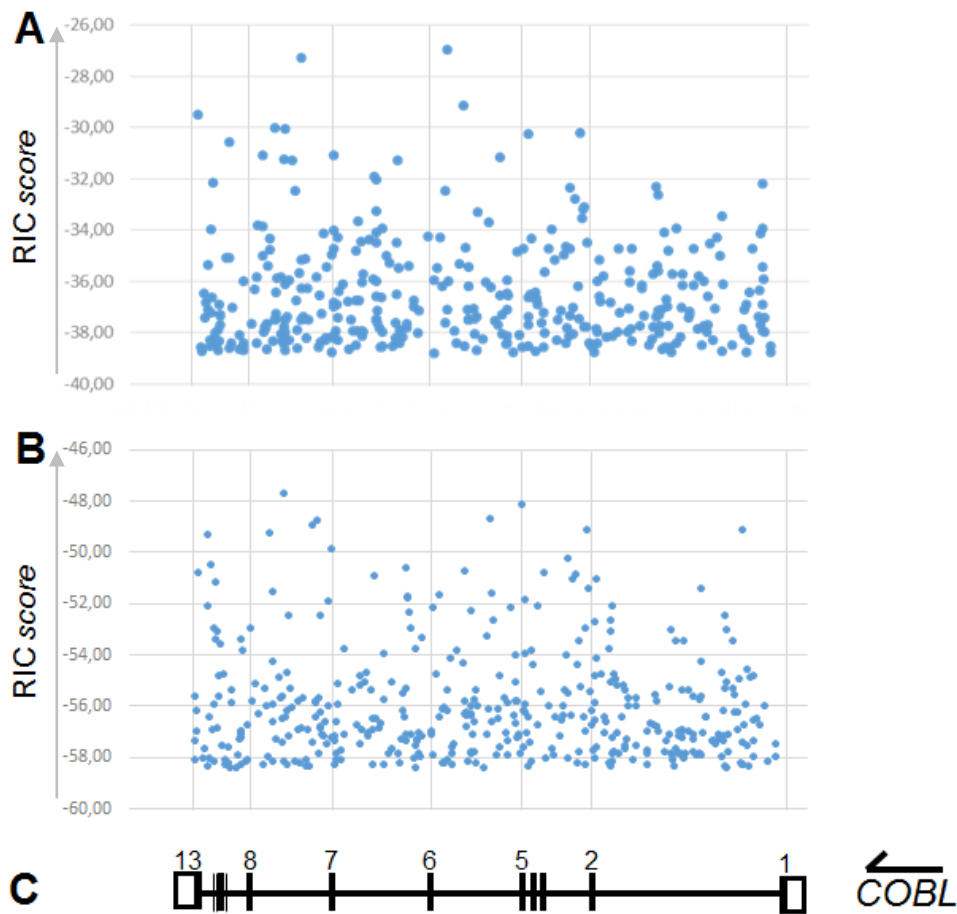


Figura 5.20. Sequências RSS ao longo de *COBL*.

A figura ilustra a localização de (A) 12RSS e (B) 23RSS dispersos ao longo de *COBL*. Os pontos azuis do gráfico representam cada sequência análoga à RSS na fita positiva e negativa. A similaridade das sequências do gene com as RSSs de RAG é proporcional ao valor “RIC score”. (C) Estrutura do *COBL*, onde os quadrados numerados representam cada éxon do gene.

### 5.10.2 Sequências sinais de recombinação nas proximidades dos pontos de quebra

O reconhecimento de uma sequência RSS por RAG1/RAG2 pode levar à quebra e religação da fita de DNA. Este processo depende do reconhecimento de sequências RSSs em ambas as regiões acometidas pelo rearranjo. Por exemplo, na amostra S35, com uma deleção intersticial entre 7p14.3 e *COBL*, é necessário o reconhecimento de regiões RSS tanto na região 7p14.3 quanto no íntron 5 de *COBL*. Geralmente a quebra ocorre na região interna do sítio de reconhecimento de RAG e envolve dois tipos de sequências RSSs diferentes em cada região do rearranjo ou deleção, como 12RSS e 23RSS; raramente este processo abrange sequências RSS do mesmo tipo, como 12RSS e 12RSS ou 23RSS e 23RSS. Portanto, foram investigadas sequências RSS nas proximidades dos pontos de quebra das amostras com o objetivo de verificar se as deleções *IKZF1* Δ1-8 também estão relacionadas a um mecanismo dependente de RAG. Conforme abordado na metodologia, os seguintes valores de RIC score foram considerados significantes: 12RSS ≥ -38,81 e 23RSS ≥ -58,45.

As sequências da região de quebra de cada amostra com os sítios semelhantes às RSSs estão descritas na Figura 5.21, Figura 5.22 e Figura 5.23. Conforme descrito nas figuras, as sequências de quebra nas *IKZF1* Δ1-8 não foram significantes. Por outro lado, as amostras com a fusão entre *IKZF1* e *COBL* apresentam valores de RIC score significantes na região de quebra. O resultado indica que, apesar das deleções intragênicas de *IKZF1*, incluindo casos com *IKZF1-COBL*, provavelmente serem geradas por mecanismo RAG dependente, este mecanismo não explica a formação de deleções completas de *IKZF1*.

**Paciente S10: 7p12.1 – COBL íntron 5**

```
12RSS                                     CACAGTG   - 12 -   ACAAAAACC (RIC: -50.24)
                                     || |
7p12.1 ATTTGCTGATCTCCCTCTCCTAGCTTACCCTGAATCCCTTTTCCTTCCATTGTTCCATCTCACTGCAATGCCATATCCCCATTGCTCAGTTTCTGCCCTTGGCAGTGATC
|||||
S10    ATTTGCTGATCTCCCTCTCCTAGCTTACCCTGAATCCCTTTTCCTTCCATTGTTCTTGCAAATTAAGTACAGGTACCTTGTCTCATCCGTTAGCACAGTTTATCACTGCTGT
COBL   CATTGCACTTTATCAGACTGATATAATAATTTCTTTTCCATTTTTGTGTGCTGAATGCAAATTAAGTACAGGTACCTTGTCTCATCCGTTAGCACAGTTTATCACTGCTGT
23RSS                                     ||| |||
                                     GGTTTTTGT   - 23 -   CACTGTG (RIC: -61.82)
```

**Paciente S35: 7p14.3 – COBL íntron 5**

```
23RSS      (RIC: -71.42) GGTTTTTGT   - 23 -   CACTGTG
                        |
7p14.3 GACTCCATCAAAAAAAAAAGAAAAGAAAAGAGAAGTCTGCCAGTCAAGAAATATCATGCCAGCAAAGCTATCCTTCAGAAATGAAGGAGAAATAAAATCTTTCACAGACAAG
|||||
S35    GACTCCATCAAAAAAAAAAGAAAAGAAAAGAGAAGTCTGCCAGTCAAGAAATATCATGCTTTTCATCTTATTAATGTCTTTTCAAGAAAAATTTACTTTCCATGTTTAAACAAT
COBL   CTTTTCTTATCAGTAAATCACGTTCAAACACAATGGATACATGAAATTTTTTAATGCTTTTCATCTTATTAATGTCTTTTCAAGAAAAATTTACTTTCCATGTTTAAACAAT
12RSS      | |
            GGTTTTTGT   - 12 -   CACTGTG (RIC: -42.60)
```

**Paciente S36: 7p12 – COBL íntron 5**

```
12RSS                                     (RIC: -45.97) CACAGTG   - 12 -   ACAAAAACC
                                     ||| |
7p12   TATACTATACTATACTATACTATACTATACTATAATACCATTATCCTATACCAAATAACACCATATAATACCATTATACCACACTATACCAAATAACACCATACTATACCA
|||||
S36    TATACTATACTATACTATACTATACTATACTATAATACCATTATCCTATACCAAATCCGGTGAGAAGCTCATAGCATAAAAAAAAGATACTTTTTTATTAGCACATCACTG
COBL   TGTGGGTCCCAGCTGCCATGGGGATTGTAAGATCTTATCAAATGTTGTCACACTCCGGTGAGAAGCTCATAGCATAAAAAAAAGATACTTTTTTATTAGCACATCACTG
12RSS      || |||
            GGTTTTTGT   - 12 -   CACTGTG (RIC: -38.93)
```

Figura 5.21. Sequências RSS na região do ponto de quebra nas amostras com deleção completa de *IKZF1* e rearranjo de *COBL*. Sequência da região de ponto de quebra de cada amostra com destaque (em azul) para sequências sinais de recombinação (RSSs) de RAG.

**Paciente S48: *IKZF1* intron 3 – *COBL* intron 5**

```

12RSS          CACAGTG   - 12 -   ACAAAAACC (RIC: -30.62*)
                ||| |||
IKZF1 AATAATCTGAATTGACGGCATCCAGGGATCTCAGAAATTATTAGTACATCCACAGTGAATTACCACCTTACTAAAATATTCATGGGTATATACTATGGATTTGTTTTAT
S48    AATAATCTGAATTGACGGCATCCAGGGATCTCAGAAATTATTAGTACATCCCGGCCCTATCCAAGTCAGTAAACCTAAACAGAAAAACGTTATCTGCTCAGGACTATTTA
COBL   AATGAAGGAACACTCAGAAGCTCTACACCTATGGGGTAGTGTGTGTTAAACAGAGTGTATCCAAGTCAGTAAACCTAAACAGAAAAACGTTATCTGCTCAGGACTATTTA
23RSS          CACAGTG   -   23   -   ACAAAAACC (RIC: -54.99*)
                ||| |||

```

**Paciente 3: *IKZF1* intron 1 – *COBL* intron 5**

```

12RSS          CACAGTG   - 12 -   ACAAAAACC (RIC: -28.01*)
                ||| |||
IKZF1 TGTACATTTTGTATCTAGGTCTTAGAAACGTAGAGTTTCAGAGGATCAGCATTATACACACTGTCCACACACACACTTAAAATTCAGATGAGGAACAAGATAGGAAT
P#3    TGTACATTTTGTATCTAGGTCTTAGAAACGTAGAGTTTCAGAGGATCAGCACTCGGACCCTATCCAAGTCAGTAAACCTAAACAGAAAAACGTTATCTGCTCAGGACTAT
COBL   ATAAATGAAGGAACACTCAGAAGCTCTACACCTATGGGGTAGTGTGTGTTAAACAGAGTGTATCCAAGTCAGTAAACCTAAACAGAAAAACGTTATCTGCTCAGGACTAT
23RSS          CACAGTG   -   23   -   ACAAAAACC (RIC: -54.99*)
                ||| |||

```

Figura 5.22. Sequências RSS na região do ponto de quebra nas amostras com deleção intragênica de *IKZF1* consequente da fusão *IKZF1-COBL*.

Sequência da região de ponto de quebra de cada amostra com destaque (em azul) para sequências sinais de recombinação (RSSs) de RAG.

\*Valores de RIC score significantes.

**Paciente S24: PAX5 intron 6 – AUTS2 intron 4**

```
12RSS          CACAGTG   - 12 -   ACAAAAACC (RIC: -42.62)
                ||  ||           ||  |  |
PAX5  CTCGTACACACATACCCACTGACATGGGAAACAAAGATTCACAAAACAGGACTTATCCTTTCTATGTGGGAGACCCTTGGATATTTTTTTTTCAGTTTCATTTATAAAAA
|||||
S24   CTCGTACACACATACCCACTGACATGGGAAACAAAGATTCACAAAACAGGAGTGTTTGGGCAATATTTTTATTTGTAATGATTCCACATTTAGCTTAAGAAAGTATTTA
|||||
AUTS2 CCTCATGGGCCTTTTAATAAAGCAAAGTAAATATGTAATCCACTTACAGTCAGTCAAGAGCAATATTTTTATTTGTAATGATTCCACATTTAGCTTAAGAAAGTATTTA
                ||  |  |           |  |  ||
23RSS          CACAGTG   - 23 -   ACAAAAACC (RIC: -70.92)
```

Figura 5.23. Sequências RSS na região do ponto de quebra de amostras com deleção completa de *IKZF1* e fusão *PAX5-AUTS2*.

Sequência da região de ponto de quebra de cada amostra com destaque (em azul) para sequências sinais de recombinação (RSSs) de RAG.

\*Valores de RIC score significantes.

Com o objetivo de confirmar a ausência de sequências RSSs nas proximidades de *IKZF1*  $\Delta$ 1-8, os valores de RIC score de sequências de deleções intragênicas de *IKZF1* publicadas na literatura (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA, T. C.; *et al.*, 2013) foram comparados com os encontrados nas sequências das fusões *IKZF1-COBL* e *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 (Figura 5.24). Foram avaliados os 100 pares de base que flanqueavam os pontos de quebra de cada lado das deleções, ou seja, mais ou menos 50 pb a partir do ponto de quebra. Conforme demonstrado na Figura 5.24A-B, grande proporção das deleções intragênicas e fusões *IKZF1-COBL* apresentam RSSs (12RSS e 23RSS) significantes na região de um dos lados da quebra. A comparação dos valores de RIC score entre deleções intragênicas e completas revelou que as últimas não apresentam RSSs significantes em nenhuma região da fusão.

A análise dos tipos de RSSs presentes em cada lado das deleções revelou que a maioria das deleções intragênicas, incluindo a fusão *IKZF1-COBL*, apresenta sequências 23RSS-12RSS e 12RSS-23RSS, enquanto que deleções completas não têm RSSs significantes (Figura 5.24C).

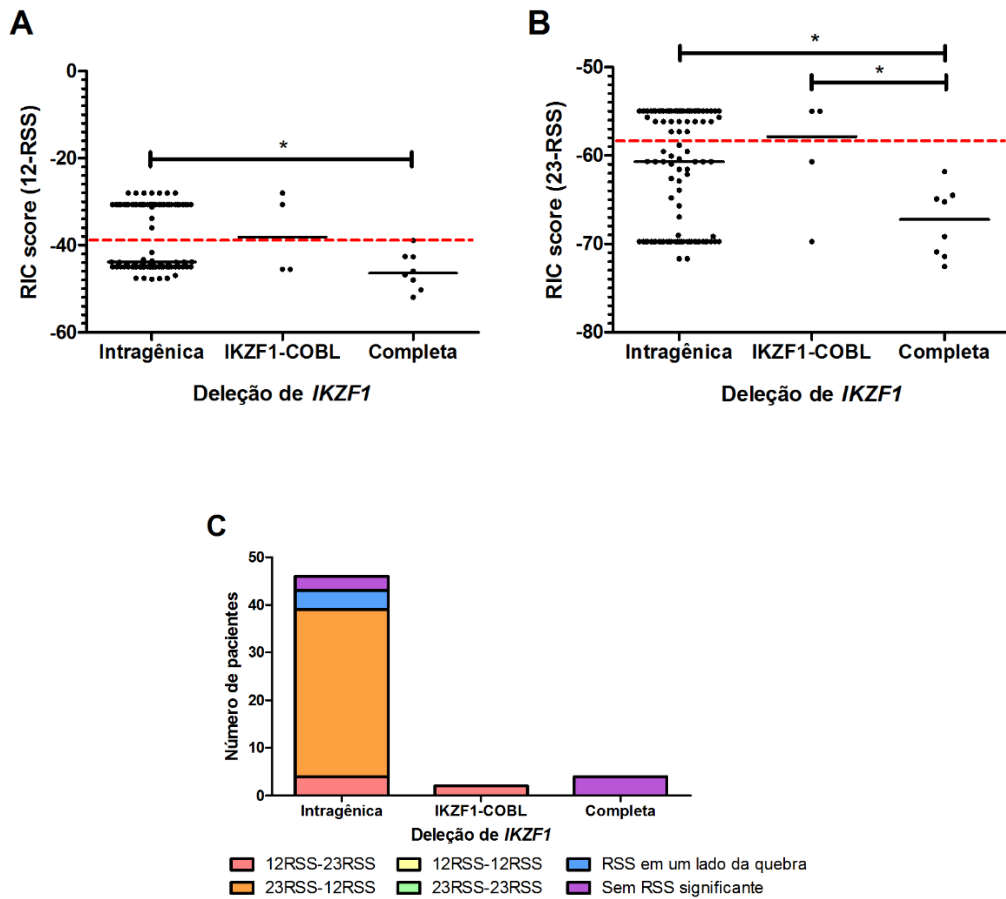


Figura 5.24. Comparação entre sequências de ponto de quebra de deleções intragênicas e completas de *IKZF1* nas LLA-CPB pediátricas.

Na figura foram plotadas as (A) 12RSSs e (B) 23RSSs de cada lado do ponto de quebra de deleções intragênicas, *IKZF1-COBL* e deleções completas de *IKZF1*. As sequências de deleções intragênicas foram obtidas de Meyer *et al.* 2013. Quanto maior o valor de RIC score, maior a probabilidade da sequência RSS ser funcional. A linha vermelha tracejada indica o limiar para que o RIC score seja significativo. (C) Combinação dos tipos de sequências RSSs em cada lado do ponto de quebra de deleções intragênicas e completas de *IKZF1*. \**p*-valores < 0,05.

Após análise dos possíveis mecanismos envolvidos nas deleções de *IKZF1*, buscou-se por outros motivos que poderiam estar presentes nas regiões de quebra. Para isso, foram mapeadas as distâncias entre os pontos de quebra de deleções intragênicas, *IKZF1-COBL* e *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 e dinucleotídeos CpG (Figura 5.25A) e CAC (Figura 5.25B), que representam a sequência mínima para o reconhecimento de RAG.

Dinucleotídeos CG não apresentaram distâncias medianas significativamente diferentes entre os pontos de quebra de deleções intragênicas (32 pb), *IKZF1-COBL* (28,5 pb) e *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 (68,5 pb). Apesar dos pontos de quebra de *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 apresentarem maior distância mediana, não houve diferença estatisticamente significativa comparada aos grupos com deleções intragênicas ( $p = 0,21$ ) e *IKZF1-COBL* ( $p = 0,07$ ). Por outro lado, os resultados mostraram que motivos CAC ou GTG estão mais próximos dos pontos de quebra de deleções intragênicas (3 pb) quando comparados às *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 (19,5 pb) ( $p = 0,007$ ). Os mesmos motivos foram encontrados a 3,5 pb das fusões *IKZF1-COBL*.

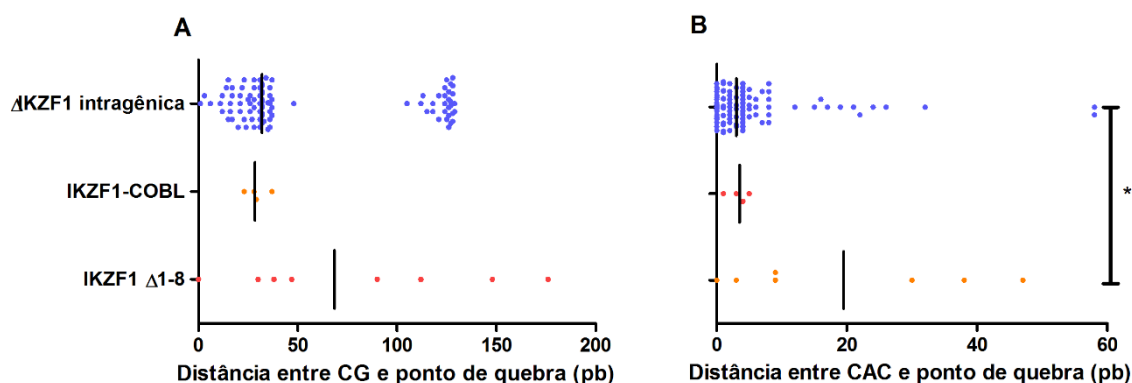


Figura 5.25. Mapeamento da distância entre motivos CG e CAC e os pontos de quebra de deleções intragênicas e completas de *IKZF1* nas LLA-CPB pediátricas.

A figura indica a distância entre motivos (A) CG e (B) CAC com os pontos de quebra de cada lado do das deleções intragênicas, *IKZF1-COBL* e deleções completas de *IKZF1*. As sequências de deleções intragênicas foram obtidas de Meyer *et al.* 2013. \* $p$ -valores < 0,05.



### 5.10.3 Estrutura da cromatina nas regiões de quebra

Tendo em vista que as *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 não devem ser causadas por atividade de RAG, buscou-se identificar outras características da região de quebra que poderiam explicar a ocorrência da quebra do DNA nesses locais. Para isso, o estado de compactação da cromatina nas regiões de quebra encontradas no estudo foi investigado.

A avaliação do estado da cromatina foi baseada em dados disponíveis na base de dados do EMBASE. Foram obtidos dados de DNase-seq e ChIP-seq de metilação da lisina 4 da Histona H3 (H3K4<sub>me</sub>) para amostras de células B CD20<sup>+</sup>, células-tronco hematopoiéticas, além das linhagens GM12878 e K562. Conforme ilustrado na Figura 5.26, os pontos de quebra de deleções envolvendo *COBL* coincidem com regiões de cromatina mais abertas no gene para os dados de DNase e ChIP-seq das células avaliados. Por outro lado, as regiões de quebra da terminação 5' não foram correlacionadas com regiões da cromatina mais acessíveis em amostras com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 envolvendo *COBL* ou *PAX5-AUTS2* (Figura 5.27).

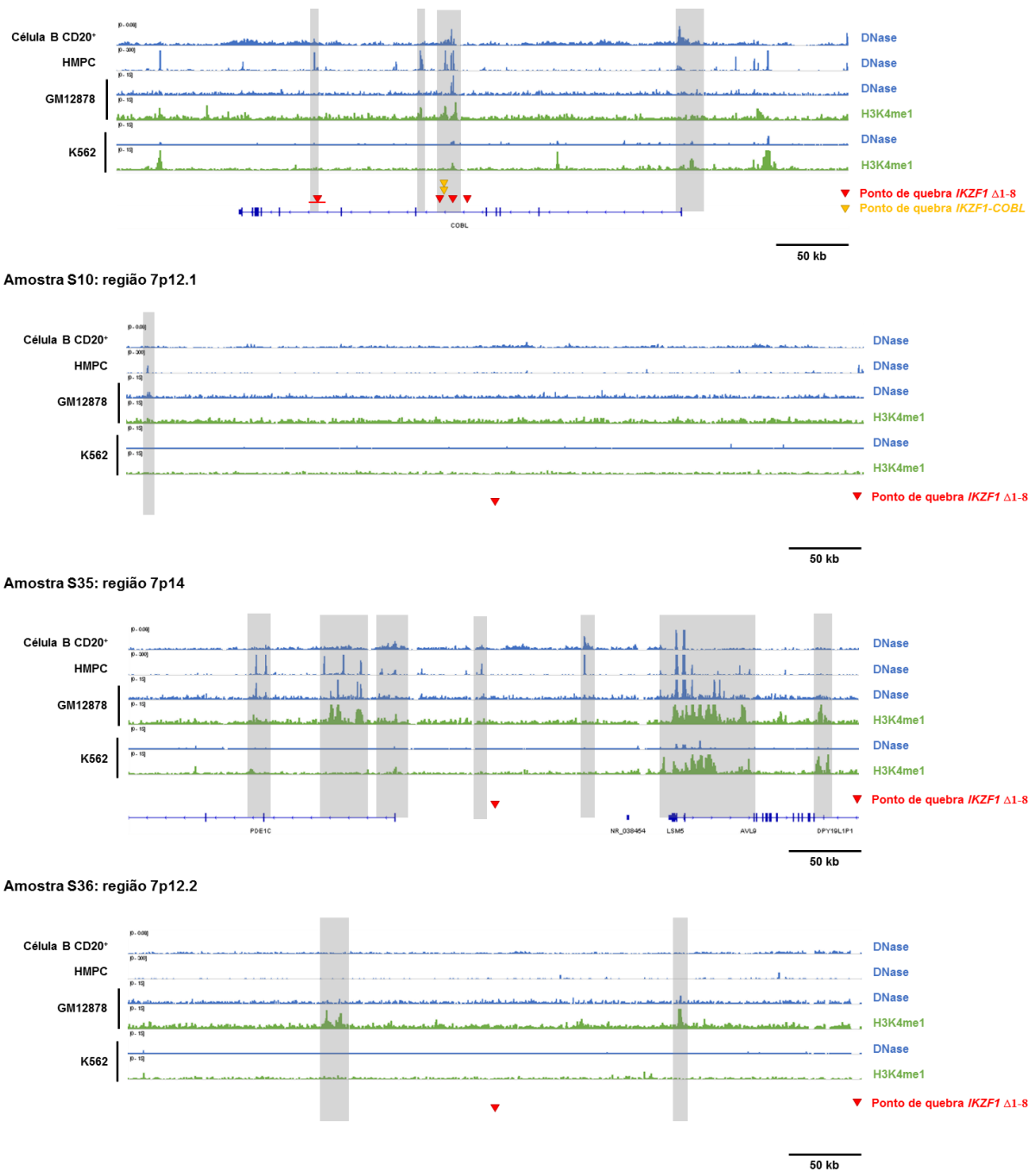
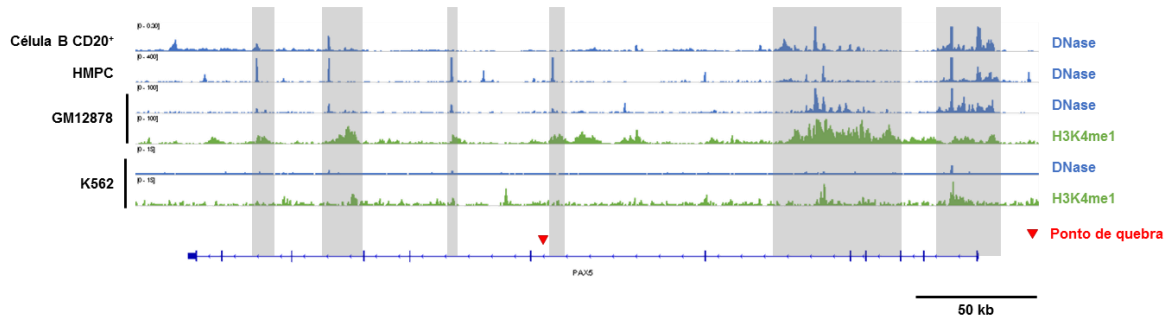


Figura 5.26. Avaliação do estado da cromatina nas regiões de quebra envolvendo *COBL*.

Dados de DNase-seq (azul) e CHIP-seq (H3K4<sub>me</sub>, verde) em células B CD20+, células-tronco hematopoiéticas (HMPC), além das linhagens GM12878 e K562 obtidos da base ENCODE e visualizados no programa IGV. Os pontos de quebra de amostras com deleção de *IKZF1* foram indicados pelos triângulos vermelhos (*IKZF1* Δ1-8) ou laranjas (deleções intragênicas que terminam em *COBL*). As barras cinzas verticais destacam as regiões mais associadas com cromatina aberta.

Amostra S24: *PAX5*



Amostra S24: *AUTS2*

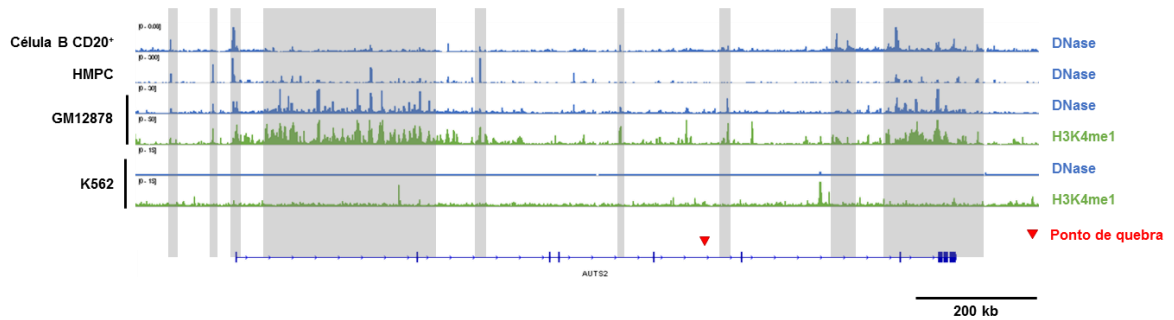


Figura 5.27. Avaliação do estado da cromatina nas regiões de quebra de *PAX5-AUTS2*.

Dados de DNase-seq (azul) e ChIP-seq (H3K4<sub>me</sub>, verde) em células B CD20+, células-tronco hematopoiéticas (HMPC), além das linhagens GM12878 e K562 obtidos da base ENCODE e visualizados no programa IGV. Os pontos de quebra de amostras com deleção de *IKZF1* foram indicados pelos triângulos vermelhos (*IKZF1*  $\Delta$ 1-8) ou laranjas (deleções intragênicas que terminam em *COBL*). As barras cinzas verticais destacam as regiões mais associadas com cromatina aberta.

#### 5.10.4 Estruturas secundárias das regiões de quebra

As estruturas secundárias adquiridas pela fita do DNA podem facilitar a ação de enzimas que clivam a dupla fita. Portanto, a ferramenta “*The mfold Web Server*” foi utilizada para prever a estrutura secundária mais estável na região de quebra das amostras com deleção de *IKZF1*, as quais foram classificadas da seguinte forma: (1) fragmento de fita simples, (2) tronco, (3) alça interna, (4) alça de junção, (5) protuberância e (6) alça do grampo (Figura 5.28).

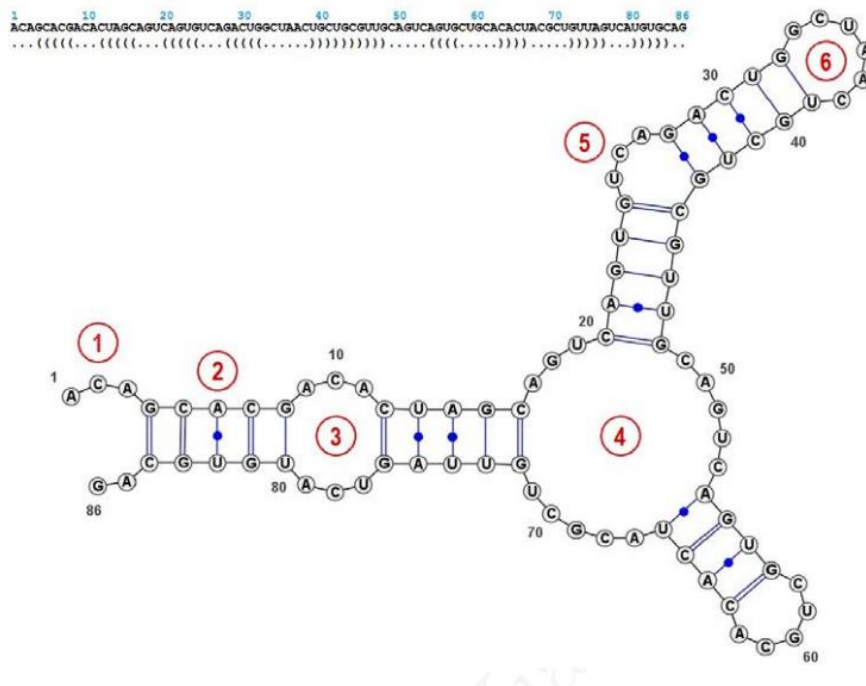
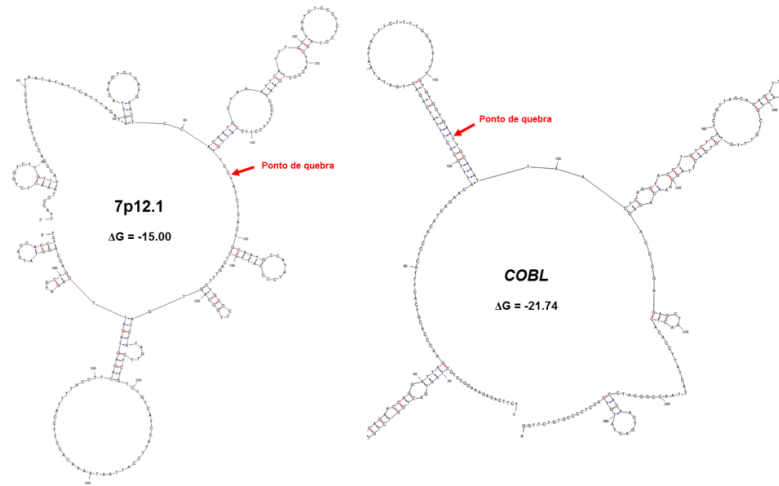


Figura 5.28. Estruturas secundárias encontradas em ácidos nucleicos.

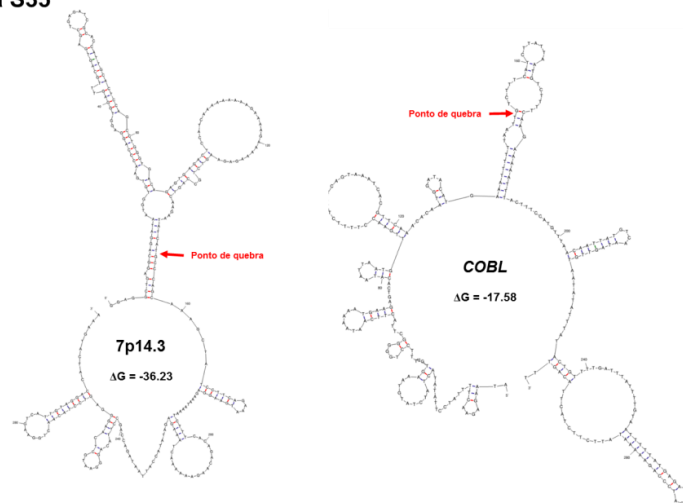
A figura mostra estruturas de (1) fragmento de fita simples, (2) tronco, (3) alça interna, (4) alça de junção, (5) protuberância e (6) alça do grampo (ilustração obtida do manual “*DSSR: an Integrated Software Tool for Dissecting the Spatial Structure of RNA*”).

O resultado das análises foi ilustrado na Figura 5.29 e Figura 5.30. A caracterização dos locais de quebra foi resumida na Tabela 5.6, em que os pontos de quebra estavam localizados em regiões de tronco ( $n = 5$ ), alça da junção ( $n = 5$ ) e alça do grampo ( $n = 2$ ).

### Amostra S10



### Amostra S35



### Amostra S36

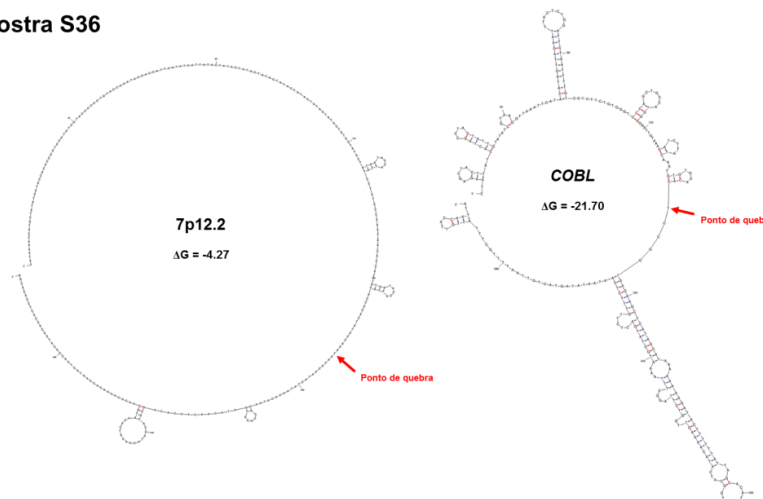
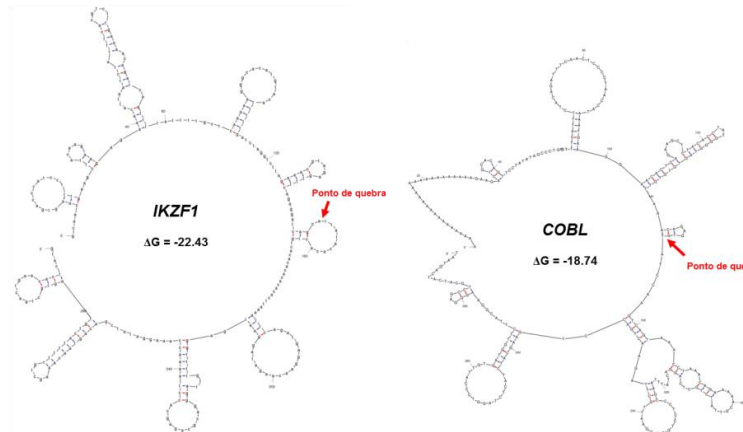
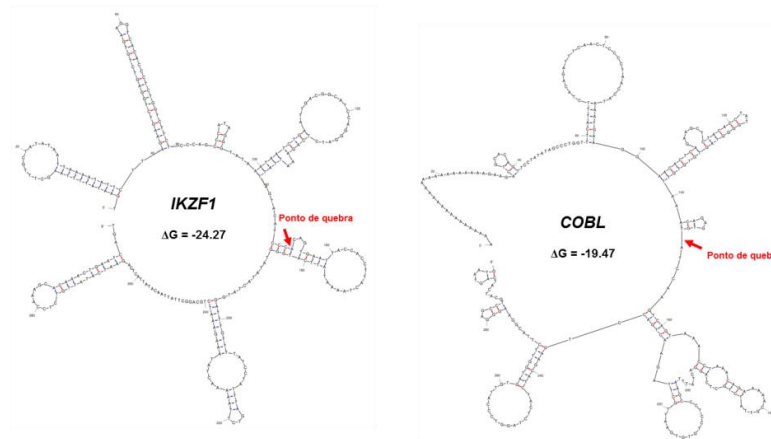


Figura 5.29. Estrutura secundária do DNA na região de quebra de amostras com rearranjo de *COBL*. A figura ilustra as estruturas das regiões 5' e 3' da quebra, com base no “*The mfold Web Server*”. Foram dispostas as estruturas termodinamicamente mais estáveis e os respectivos valores de variação de energia livre ( $\Delta G$ ). O local do ponto de quebra foi indicado com uma seta vermelha.

### Amostra #03



### Amostra S48



### Amostra S24

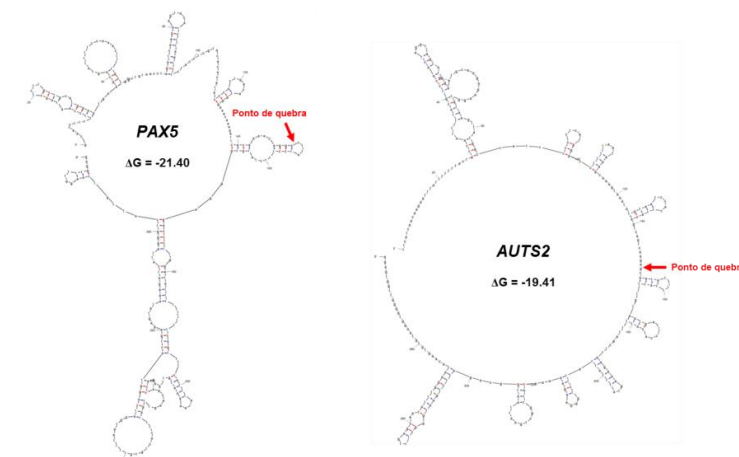


Figura 5.30. Estrutura secundária do DNA na região de quebra de amostras com rearranjo de *COBL* e *PAX5-AUTS2*.

A figura ilustra as estruturas das regiões 5' e 3' da quebra, com base no “*The mfold Web Server*”. Foram dispostas as estruturas termodinamicamente mais estáveis e os respectivos valores de variação de energia livre ( $\Delta G$ ). O local do ponto de quebra foi indicado com uma seta vermelha.

Tabela 5.6. Sumário das estruturas secundárias presentes nas amostras com deleção de *IKZF1*.

<b>Amostra</b>	<b>Região de quebra</b>	<b>Estrutura secundária<sup>a</sup></b>	<b><math>\Delta G^b</math></b>
S10	7p12.1	Alça da junção	-15,00
	<i>COBL</i>	Tronco	-21,74
S35	7p14.3	Tronco	-36,23
	<i>COBL</i>	Tronco	-17,58
S36	7p12.2	Alça da junção	-4,27
	<i>COBL</i>	Alça da junção	-21,70
S03	<i>IKZF1</i>	Alça do grampo	-22,43
	<i>COBL</i>	Tronco	-18,74
S48	<i>IKZF1</i>	Tronco	-24,27
	<i>COBL</i>	Alça da junção	-19,47
S24	<i>PAX5</i>	Alça do grampo	-21,40
	<i>AUTS2</i>	Alça da junção	-19,41

<sup>a</sup> Estruturas secundárias classificadas de acordo com a Figura 5.28;

<sup>b</sup>  $\Delta G$ , valor de variação de energia livre.

Cabe destacar que a amostra S36 apresentou dez repetições consecutivas do motivo 5'-CTATA-3' à 21 pb de distância do ponto de quebra em 7p12.2, o que deve ter contribuído para a formação de estruturas de grampo próximas aos locais de quebra.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Alterações adicionais associadas à deleção completa de *IKZF1*

Cerca de 30% de todas as  $\Delta IKZF1$  compreendem deleções completas do gene, aqui denominadas *IKZF1*  $\Delta 1-8$ . Nesse trabalho desenvolvemos métodos para caracterizar esses pacientes com maiores detalhes. Nossos resultados de MLPA demonstraram que *IKZF1*  $\Delta 1-8$  estão associadas a deleções de *ZPBP* e *C7orf72*, localizados ~210 Kb antes de *IKZF1*, além de *FIGNL1* e *DDC*, situados a 39 e 53 Kb após *IKZF1*, respectivamente. Esses resultados revelaram que as *IKZF1*  $\Delta 1-8$  são caracterizadas por grandes deleções intersticiais no cromossomo 7, que ultrapassam os limites de genes que flanqueiam *IKZF1*, ou seja, outros genes também podem estar associados à doença.

Além disso, o resultado sugere que as *IKZF1*  $\Delta 1-8$  podem favorecer o processo neoplásico não somente pela desregulação de genes-alvos de Ikaros, mas também pela haploinsuficiência de genes concomitantemente deletados. O gene *IKZF1* regula a expressão de diversos genes durante a diferenciação linfóide, atraindo complexos reguladores da cromatina. Dessa forma, *IKZF1* ativa ou reprime genes associados com a transdução de sinais, receptores celulares e reguladores transcricionais (SCHWICKERT *et al.*, 2014). Portanto, o comprometimento da diferenciação linfóide através da desregulação de genes-alvo de *IKZF1* é um processo diretamente relacionado com as deleções de *IKZF1*.

Da mesma forma, os resultados dos ensaios comerciais de MLPA mostraram que outros genes adjacentes são perdidos nas *IKZF1*  $\Delta 1-8$ . Dentre eles, destaca-se *FIGNL1*. O gene possui cinco éxons e codifica uma proteína da família das ATPases. *FIGNL1* age em conjunto com SPIDR (*Scaffolding Protein Involved in DNA Repair*), em um complexo que se liga à recombinase RAD51 e atua no reparo da quebra da dupla-fita de DNA através de recombinação homóloga (YUAN; CHEN, 2013). Estudo em pacientes com leucemias após síndrome mielodisplásica revelou a presença de grandes deleções no cromossomo 7 dos pacientes; porém, ao combinar os dados, encontraram uma região comum de deleção com 0,36 Mb, incluindo os genes *IKZF1* e *FIGNL1* (JÄGER *et al.*, 2010). Portanto, a perda de um alelo do gene poderia comprometer o processo de reparo do DNA e propiciar o



estabelecimento de alterações moleculares em células precursoras linfoides. Além disso, foi demonstrado que Ikaros ativa a expressão de *FIGNL1* nas células B. Como *FIGNL1* pode regular a proliferação e diferenciação celular (SCHRAENEN *et al.*, 2010; L'HOTE *et al.*, 2011), a hemizigose e possível haploinsuficiência do gene poderia contribuir para a desregulação desses processos na célula leucêmica. Dessa forma, a vasta extensão das *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 altera outros genes que podem contribuir para o processo de leucemogênese.

Nesse trabalho, as *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 foram associadas à ausência ou raridade de deleções em *EBF1* e *BTG1*, que não estão presentes no cromossomo 7 e, no entanto, foram mais frequentes em deleções intragênicas de *IKZF1*. Ambos os genes encontram-se em cromossomos distintos e estão localizados nas bandas 5q33.3 e 12q21.33, respectivamente. O gene *EBF1* possui 22 éxons e codifica um fator de transcrição crítico para a diferenciação de células B (HAGMAN; RAMIREZ; LUKIN, 2012). As deleções monoalélicas de *EBF1* geralmente afetam a região promotora do gene, levando à perda de função de um alelo, e são encontradas em apenas ~4% das LLA-CPB (MULLIGHAN *et al.*, 2007). Apesar disso, a frequência de deleções em *EBF1* é consideravelmente maior nas LLA-CPB com *BCR-ABL1* positivo, ocorrendo em cerca de 14% desses casos. Como cerca de 80% dos pacientes com esse subtipo molecular apresentam deleções de *IKZF1*, nossos resultados sugerem que as deleções de *EBF1* cooperam especificamente com deleções intragênicas de *IKZF1*.

A análise de CNAs por MLPA também revelou que *BTG1* raramente estava deletado em amostras com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8, ao passo que 25,8% das deleções intragênicas de *IKZF1* apresentaram deleção em *BTG1*. O *BTG1* possui apenas dois éxons e pertence à família *BTG/TOB* de genes com efeito anti-proliferativo, que incluem (*BTG1-4* e *TOB1-2*), através do controle do crescimento e diferenciação celular (PREVOT *et al.*, 2000). A literatura mostra que deleções em *BTG1* ocorrem em cerca de 10% das LLA-CPB; notavelmente, deleções de *BTG1* e *EBF1* geralmente ocorrem de forma concomitante, (WAANDERS *et al.*, 2012), o que justificaria a raridade de alterações em ambos nas *IKZF1*  $\Delta$ 1-8. Além disso, a baixa frequência de deleções em *BTG1* e *EBF1* no grupo com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 sugere que o processo de leucemogênese nesses pacientes é independente de alterações nos dois genes.

Estudo recente avaliou o papel oncogênico de alterações envolvendo *IKZF1* e *BTG1* em modelo murino (SCHEIJEN *et al.*, 2015). Os resultados mostraram que a penetrância da leucemia nesses camundongos foi proporcional à quantidade de alelos de *BTG1* deletados, informando-nos que ambas alterações cooperam para a leucemogênese. Com base nesse dado, Scheijen e colaboradores também investigaram o papel de alterações nesses genes em crianças com LLA-CPB, revelando que deleções mútuas em *BTG1* e *IKZF1* estão associadas à maior taxa de recaída nesses pacientes (SCHEIJEN *et al.*, 2015). Apesar do estudo não ter estratificado os casos de acordo com os tipos de deleção de *IKZF1* na análise de sobrevida, os resultados de MLPA do presente trabalho sugerem que o papel sinérgico de *BTG1* com deleções de *IKZF1* seja específico para deleções intragênicas de *IKZF1* e, portanto, esse achado não deve ser verdadeiro para as *IKZF1*  $\Delta$ 1-8.

Os resultados desse trabalho também mostraram que deleções de *PAX5* são frequentes no grupo com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8. No entanto, a alta frequência dessas deleções também foi encontrada em pacientes com deleções intragênicas de *IKZF1*, revelando que alterações em *PAX5* não são diferencialmente observadas em deleções completas de *IKZF1*, mas sim comumente associadas a deleções de *IKZF1*, independentemente do tipo de alteração nesse gene.

Estudos mostram que deleções em *PAX5* ocorrem em 19-32% das LLA-CPB e estão presentes nos clones majoritários, o que destaca sua importância na leucemogênese (MULLIGHAN *et al.*, 2007; SCHWAB *et al.*, 2013). O perfil de deleção nesse gene é variável e consiste em alterações que levam a deleções intragênicas, como deleções focais restritas a *PAX5* e deleções do braço curto do cromossomo 9 com ponto de quebra no interior de *PAX5*, ou deleções completas, geradas por perdas intersticiais envolvendo genes que o flaqueiam, monossomia 9 ou perda completa do braço curto. Estudos anteriores mostraram que deleções em *PAX5* e *IKZF1* são frequentemente concomitantes nas LLA-CPB (BARBOSA *et al.*, 2015) e, conforme demonstrado nesse trabalho, tal associação também é verdadeira para deleções completas de *IKZF1*, porém não exclusiva desse grupo. Em concordância, outro estudo mostrou que as LLA-CPB com deleção de *IKZF1* são caracterizadas por CNAs e instabilidade do braço curto do cromossomo 9 (USVASALO *et al.*, 2010). Como a região possui diversos genes com papel fundamental para o controle da proliferação (*CDKN2A* e *CDKN2B*) e diferenciação

linfoide (*PAX5*, *MLLT3* e *JAK2*), a perda dessa área contribui para a formação do fenótipo leucêmico independentemente do tipo de deleção de *IKZF1*.

## **6.2 Translocações não balanceadas envolvendo o cromossomo 7 promovem deleções completas de *IKZF1***

Nesse trabalho, a fusão *PAX5-AUTS2* foi identificada em um paciente com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8. A fusão resulta de uma translocação não balanceada t(7;9)(q11.2;p13.2), com envolvimento do cromossomo 7, sugerindo que a translocação teve um papel fundamental na perda completa de *IKZF1*.

Apesar de translocações que levam a fusões gênicas serem recorrentes em LLA-CPB, algumas alterações são menos frequentes. Até o momento a fusão *PAX5-AUTS2* foi reportada em apenas cinco casos na literatura e, portanto, compreendem o grupo dessas alterações raras (KAWAMATA *et al.*, 2008; COYAUD; STRUSKI; DASTUGUE; *et al.*, 2010; DENK *et al.*, 2012; FAZIO *et al.*, 2015). Devido à raridade da fusão *PAX5-AUTS2*, as características clínico-laboratoriais da alteração são pouco conhecidas e, portanto, foram descritas abaixo e comparadas com os perfis encontrados na literatura.

O caso apresenta uma história clínica iniciada com dor de garganta, tosse e febre, que persistiram mesmo após tratamento com antibiótico por três dias. Com isso, o menino foi encaminhado para o Centro de Tratamento Onco Hematológico Infantil, CETHOI, em julho de 2006. A mãe relatou que a criança apresentava alargamento abdominal e o exame físico revelou que o menino apresentava hepatoesplenomegalia, palidez severa e adenomegalia cervical e axilar. Os testes laboratoriais mostraram intensa anemia (Hb 6,2 g/dL), plaquetopenia ( $35 \times 10^9/L$ ) e alta leucometria (WBC  $336.0 \times 10^9/L$ ), com presença de 95% de blastos. Análise imunofenotípica caracterizou a leucemia como LLA pro-B. Com isso, o tratamento foi iniciado com o protocolo Interfant-99. Apesar da medula óssea hipoplásica no 14º dia de tratamento, o paciente apresentou remissão clínica no dia 28. Um ano após o diagnóstico foi observada recaída no sistema nervoso central. Dessa forma, o tratamento foi reiniciado com o protocolo St Jude's XIII. No momento, o regime de tratamento foi finalizado e o paciente continua vivo 9,3 anos após o diagnóstico inicial de LLA-CPB.

As características clínicas e laboratoriais do paciente S24 e de todos os outros casos relatados na literatura foram descritas na Tabela 6.1. Em sumário, a maioria dos casos foi meninos (razão M/F: 4/2) diagnosticados com LLA pré-B (4 de 6 casos). Todos os pacientes foram diagnosticados com leucemia na primeira infância, variando entre 0,6 e 3,1 anos de idade, e muitos apresentaram alta leucometria (4/6 casos). Esse achado foi acompanhado de alto percentual de blastos, com cerca de 80-95% das células não eritroides. Em relação ao tratamento, apesar de metade dos pacientes ter apresentado baixa resposta à prednisona de acordo com os protocolos ALL-BFM 90/2000 ou Interfant-96, todos eles obtiveram remissão clínica no 33º dia de tratamento. No entanto, três de quatro crianças recaíram até dois anos após o início do tratamento, indicando que o rearranjo *PAX5-AUTS2* deve estar associado à maior incidência de recaída em pacientes pediátricos com LLA-CPB.

Tabela 6.1. Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com *PAX5-AUTS2*.

Dados/Id. paciente	P1	P2	P3	P4	P5	P6 (S24)
Idade (anos)	3,1	2,8	0,6	1	3	1,2
Sexo	M	F	M	F	M	M
WBC ( $\times 10^9/L$ )	171,5	5,6	158,0	370,0	1,2	336,0
Blastos na MO (%)	93%	80%	89%	ND	ND	95%
Morfologia	L1/B-III	L1/B-III	L1/B-II/III	ND	ND	L1/B-I
Imunofenótipo	Pre-B	Pre-B	Pre-B	c-ALL	Pre-B	Pro-B
Cariótipo	45,XY,- 7,der(9)t(7;9)(q11;p13)[ 15]/46,XY[1]	45,XX,- 7,der(9)t(7;9)(q11;p13), dup(16)(p11p13)[14]/4 6,XX[2]	46,XY,t(7;9)(q11;p13)[ 8]	46,XX,der(7)t(7;11)(q1 1.2;q12),der(9)t(7;9)(q1 1.2;p13),-11,+ mar[10]/46,XX[2]	45,XY,- 7,der(9)t(7;9)(q22;p22)[ 3]/46,XY[8]	ND
Protocolo de tratamento	ALL-BFM 2000	ALL-BFM 2000	ALL-BFM 90	ND	ND	Interfant-96/ St Jude XIII
Acometimento do CNS	Sim	Não	Não	ND	ND	No
DRM no dia 33	$10^{-4}$	Negativo	ND	ND	ND	Negativo
DRM no dia 78	Negativo	Negativo	ND	ND	ND	Negativo
Resposta à prednisona	Boa	Boa	Ruim	ND	ND	Ruim
RC no dia 33	Sim	Sim	Sim	ND	ND	Sim
Grupo de risco	Intermediário	Padrão	Alto	ND	ND	Alto
Recaída	1ª MO/2ª MO	/	CNS	ND	ND	CNS
Tempo até a recaída (anos) <sup>a</sup>	1,4/1,6	/	2,1	ND	ND	1,0
Desfecho	Óbito	1ª RC	Óbito	ND	ND	Vivo
Seguimento (anos) <sup>b</sup>	1,7	2,2+	3,4	ND	ND	9,3+
Transcrito <i>PAX5-AUTS2</i>	PAX5.E6-AUTS2.E4	PAX5.E6-AUTS2.E6	PAX5.E6-AUTS2.E5	ND	ND	PAX5.E6-AUTS2.E5
Transcrito <i>AUTS2- PAX5</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Referência	Kawamata et al, 2008	Coyaud et al, 2010	Denk et al, 2012	Fazio et al, 2015	Fazio et al, 2015	Esse trabalho

<sup>a</sup> Recaída a partir do diagnóstico inicial. <sup>b</sup> Acompanhamento da data de diagnóstico até a data de óbito ou última consulta. <sup>c</sup> No protocolo ALL-BFM90, a DRM não era um critério para estratificação de risco.

c-ALL, leucemia linfoblástica aguda, subtipo comum; DRM, doença residual mínima; F, sexo feminino; Id., identificação do paciente (P1-6); M, sexo masculino; MO, medula óssea; ND, não determinado; RC, remissão morfológica completa; SNC, sistema nervoso central; WBC, leucometria.

Com relação às características moleculares dos rearranjos de *PAX5*, a proteína quimérica da maioria dos casos já reportados na literatura conserva seu domínio de ligação ao DNA, sugerindo que ela tem um efeito dominante negativo sobre a proteína selvagem (COYAUD; STRUSKI; PRADE; *et al.*, 2010). Por outro lado, a proteína *AUTS2* selvagem apresenta localização nuclear e citoplasmática em neurônios (HORI *et al.*, 2014). Estudos também mostram que *AUTS2* recruta a proteína caseína quinase 2 (CK2) ao complexo repressor *polycomb 1* (PRC1) para ativar a expressão gênica em neurônios (GAO *et al.*, 2014). Nesse sentido, alterações em *AUTS2* têm sido atribuídas a doenças neurológicas, como autismo e atraso no desenvolvimento (OKSENBERG; AHITUV, 2013). No entanto, cabe destacar que *AUTS2* também é expressa em células B, onde devem regular estágios iniciais da diferenciação linfóide (NAGEL *et al.*, 2016). A presença de *PAX5-AUTS2* em LLA-CPB, juntamente com o conhecimento das funções regulatórias de ambas as proteínas, sugere que a desregulação tanto de *PAX5* quanto *AUTS2* devem contribuir para o processo de leucemogênese.

Além disso, o paciente também apresentou uma grande deleção em 7pter~15.2 e 1q41~qter. Apesar das análises não comprovarem a ocorrência de um rearranjo cromossômico complexo, caracterizado por uma dupla translocação (MADAN, 2013), t(1;7) e t(7;9), o trabalho mostrou que houve comprometimento dos genes *HOXA*. Como essa alteração tem sido associada com a superexpressão de genes da família *HOXA* em leucemias (LAWRENCE; FISCHBACH; LARGMAN, 2005), principalmente LMA e LLA-T, o estudo destaca o papel dessa família de genes no processo leucemogênico das LLA-CPB, provavelmente através da redução da expressão dos mesmos como consequência da haploinsuficiência.

Os resultados também apontaram que pacientes com *PAX5-AUTS2* também apresentam *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 devido à perda do derivativo 7 durante a translocação com o cromossomo 9. Da mesma forma, todos os seis pacientes já reportados com *PAX5-AUTS2* não apresentam o transcrito recíproco. Conforme revisado por Denk e colaboradores (DENK *et al.*, 2012), os rearranjos de *PAX5* compreendem inúmeros parceiros de fusão e, de forma intrigante, as t(7;9)(q11.2;p13) englobam três tipos de rearranjos, os quais podem envolver os genes *ELN*, *POM121* ou *AUTS2*, localizados em uma região pericentromérica de 4,4 Mb no cromossomo 7. Os rearranjos entre *PAX5* e quaisquer genes citados estão recorrentemente associados com a perda do derivativo 7 e, portanto, com a *IKZF1*  $\Delta$ 1-8.

### 6.3 Alterações de número de cópia no cromossomo 7 que promovem deleções completas de *IKZF1*

A partir da avaliação de CNAs por microarranjo na coorte de descoberta foram desenvolvidos dois ensaios de MLPA para a caracterização dos grupos de CNAs no cromossomo 7 na coorte completa. A monossomia 7 e grandes deleções intersticiais no braço curto do cromossomo 7 foram as principais alterações encontradas, enquanto o isocromossomo (7q), a perda do 7p e *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 sem comprometimento de regiões adjacentes ocorreram mais raramente. Estudos anteriores também reportam a presença de monossomia 7 e grandes deleções intersticiais no cromossomo 7 em amostras com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 (HEEREMA *et al.*, 2004; MARTINELLI *et al.*, 2009; CAYE *et al.*, 2013).

Um dos primeiros relatos de monossomia 7 em LLA foi descrito em 1983, através da observação do desenvolvimento da neoplasia em um indivíduo sobrevivente ao ataque atômico em Hiroshima, Japão. O cariótipo do caso apresentou somente essa alteração, o que destacou a relevância da monossomia 7 nas LLAs e levantou o questionamento sobre o risco de desenvolvimento de leucemias em sobreviventes de bombas nucleares (STRICKER; LINKER, 1983). Quatro anos depois, foi descrita pela primeira vez a presença concomitante de monossomia 7 e t(9;22)(q34;q11) em um caso com LLA, que apresentou desfecho clínico desfavorável (ERIDANI *et al.*, 1987). Após esse trabalho, um estudo colaborativo incluiu 3.638 crianças com LLA para avaliar a relação da t(9;22) com a monossomia 7 (RUSSO *et al.*, 1991). Dentre os 57 casos identificados com a translocação, 13 pacientes (23%) apresentaram monossomia 7, além de outras alterações citogenéticas nesse cromossomo: i(7q) e t(7;9). Clinicamente esses pacientes apresentaram um prognóstico desfavorável, com pior resposta à indução do tratamento e sobrevida livre de eventos.

Mais recentemente, um estudo avaliou alterações no cromossomo 7 nas leucemias, independentemente do subgrupo molecular. Apesar da coorte reduzida, seus resultados mostraram que aberrações no cromossomo 7 estavam presentes em 30% das LLAs e eram acompanhadas de um cariótipo complexo. As alterações foram representadas por ganhos no 7q e perdas no 7p (BROZEK *et al.*, 2003). Em 2004, um estudo colaborativo internacional investigou a presença de alterações adicionais em LLA-CPB com *BCR-ABL1* positivo. A análise citogenética em 249

crianças revelou alterações no cromossomo 7, com destaque para a (1) monossomia 7 e (2) deleções intersticiais ou perda do 7p, encontradas em 8% e 3% dos casos com alterações adicionais, respectivamente (HEEREMA *et al.*, 2004).

Após a descoberta do papel de deleções de *IKZF1* nas LLA-CPB, principalmente aquelas com *BCR-ABL1* positivo, novos estudos avaliaram alterações no cromossomo 7 em LLA-CPB. Em 2009, Martinelli e colaboradores estudaram uma série de 84 pacientes adultos diagnosticados com LLA-CPB e *BCR-ABL1* positivo. O trabalho mostrou que 10% dos casos apresentaram deleção completa de um alelo de *IKZF1* decorrente da monossomia 7 (MARTINELLI *et al.*, 2009). Em seguida, Caye investigou deleções de *IKZF1* por ensaio de MLPA em uma coorte de 60 crianças do mesmo subgrupo molecular. Nesse trabalho, a análise citogenética das *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 revelou que tais alterações foram causadas por monossomia 7 e perda do 7p (CAYE *et al.*, 2013). Em suma, diversos trabalhos confirmam que a monossomia 7, além de deleções intersticiais no cromossomo 7 estão associadas às LLA-CPB e, portanto, são eventos causadores de deleções completas de *IKZF1*.

Dentre as alterações presentes no cromossomo 7, os resultados do trabalho revelaram que seis pacientes, ou seja, 15% das *IKZF1*  $\Delta$ 1-8, apresentaram grandes deleções intersticiais com ponto de quebra em regiões intrônicas do gene *COBL*, localizado ~611 Kb depois de *IKZF1*. Na literatura, é possível encontrar relatos de casos nos quais deleções de *IKZF1* iniciam-se a partir de uma quebra no gene *COBL*. Até o momento, quebras no DNA entre *IKZF1* e *COBL* foram descritas em cinco trabalhos, dois deles estudaram população com LLA-CPB pediátrica (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013; BAUGHN *et al.*, 2015), outros dois estudos identificaram o rearranjo de *COBL* durante a evolução do quadro de síndrome mielodisplásica (FLACH *et al.*, 2011; DUPLOYEZ *et al.*, 2016), e outros trabalhos identificaram a alteração em câncer colorretal e autismo (GRISWOLD *et al.*, 2012; GONZALEZ-GONZALEZ *et al.*, 2014).

O primeiro relato de rearranjos de *COBL* em LLA-CPB foi publicado pelo grupo alemão do Centro Diagnóstico de Leucemias Agudas juntamente com o grupo Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico no Instituto Nacional de Câncer, e o segundo foi publicado por estudo multi-institucional para a caracterização de LLA-CPB pediátricas através de citogenética-molecular global (MEYER, C.; ZUR STADT,



U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013; BAUGHN *et al.*, 2015). O primeiro estudo buscou aprimorar o conhecimento sobre os eventos genéticos que afetam o gene *IKZF1* e melhorar a análise de rotina das deleções. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de MLPA em combinação com a LDI-PCR para verificar os pontos de quebra que levam às deleções de *IKZF1*. Neste trabalho, eles encontraram uma amostra com uma fusão entre as porções finais do íntron 1 do *IKZF1* e íntron 5 do *COBL* devido a uma deleção intersticial de 800 Mb (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013).

Posteriormente, Baughn e colaboradores estudaram o perfil citogenético-molecular de 65 amostras de LLA-CPB pediátrica e identificaram 8 amostras com deleções em *IKZF1* e os seguintes perfis de deleção:  $\Delta 1-8$  ( $n = 6$ ),  $\Delta 2-3$  ( $n = 1$ ) e  $\Delta 4-7$  ( $n = 1$ ). Dentre os pacientes com  $\Delta 1-8$ , um apresentou deleção de 917 Kb entre as bandas 7p12.1 e 7p12.2, envolvendo todo o *IKZF1* e a região terminal do *COBL*, com ponto de quebra no íntron 6 do gene (BAUGHN *et al.*, 2015).

Em 2011, Flach e colaboradores descreveram um paciente com evolução de uma síndrome mielodisplásica para LMA após aquisição de uma deleção entre *IKZF1* e *COBL* (7p12.1~12.2) (FLACH *et al.*, 2011). Em 2016, Duployez reportou outro paciente com doença mieloproliferativa cuja progressão para crise blástica derivou da aquisição de deleção bialélica de *IKZF1* (DUPLOYEZ *et al.*, 2016). Um dos alelos apresentou *IKZF1*  $\Delta 1-8$  com comprometimento de genes adjacentes, desde *VWC2* até *COBL*. Ao diagnóstico de LMA, foi possível detectar deleções em *EBF1* e *CDKN2A/B* na amostra do paciente.

Além disso, as quebras no DNA envolvendo o *COBL* também foram reportadas em estudos conduzidos em populações com autismo e câncer colorretal metastático (GRISWOLD *et al.*, 2012; GONZALEZ-GONZALEZ *et al.*, 2014). O trabalho de Griswold e colaboradores avaliou pacientes autistas e relatou um paciente com deleção intersticial no *COBL* que se estende entre os íntrons 1 e 6 (chr7:51.187.785-51.295.543; hg19) (GRISWOLD *et al.*, 2012). O trabalho de Gonzalez e colaboradores investigou uma coorte de 23 pacientes com câncer colorretal esporádico e metastático. Eles estudaram CNAs nas amostras por meio da plataforma de microarranjo e encontraram um caso com amplificação intersticial de 940,7 Kb entre uma região à ~19 Kb do início de *IKZF1* e o íntron 2 de *COBL*

(Chr7:50.325.753-51.266.512). Neste caso, houve coamplificação de genes localizados entre *IKZF1* e *COBL*, como *DDC* e *GRB10*, os quais já foram relacionados com o câncer colorretal; até o momento, este foi o único estudo a reportar uma CNA na região entre *IKZF1* e *COBL* manifestada por uma amplificação ao invés de uma deleção (GONZALEZ-GONZALEZ *et al.*, 2014).

Vale ressaltar que o *GRB10* codifica um proteína adaptadora que interage com receptores tirosina-quinase para controlar a proliferação celular. Ele se associa a diversos tipos de receptores, formando um complexo que recruta outras proteínas ao receptor. No caso do receptor de insulina, Grb10 associa-se aos seus resíduos de fosfotirosina e recruta ubiquitina ligases, proteínas sinalizadoras ou bloqueia o acesso de outras proteínas ao receptor. Nesse contexto, Grb10 controla a sinalização de forma repressora ou transmite sinais de acordo com a proteína adaptadora envolvida. Por outro lado, Grb10 pode associar-se aos receptores FLT3 e KIT para recrutar p85 e AKT, gerando assim a ativação dessa via. Portanto, Grb10 apresenta uma função dual, cujo papel varia de acordo com o contexto biológico, principalmente com o tecido e a isoforma das variantes de *splicing* relacionadas ao gene (KABIR; KAZI, 2014).

Além disso, o gene sofre *imprinting*, sendo expresso somente pelo alelo paterno em neurônios e pelo alelo materno em trofoblastos placentários (HITCHINS *et al.*, 2001). Portanto, a deleção do gene nas LLA-CPB com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8, mais notavelmente as leucemias com fusão *IKZF1-COBL*, pode proporcionar perda significativa da expressão desse gene, contribuindo assim para a formação do fenótipo leucêmico. Nesse sentido, alterações em *GRB10* já foram associadas com diversas neoplasias (BARROW *et al.*, 2015). Em 2015, um estudo funcional deletou e restaurou as funções de *GRB10* para verificar o papel do gene na tumorigênese (MROUE *et al.*, 2015). Enquanto a expressão do gene reduziu a proliferação, formação de colônias e sinalização celular via Ras, seu silenciamento em modelo murino apresentou efeito inverso. No contexto da leucemia, Grb10 pode ligar-se ao BCR-ABL e sua repressão em células primárias da medula óssea com *BCR-ABL1* reduziu a formação de colônias e a progressão do ciclo celular. Dessa forma, *GRB10* deve desempenhar um papel importante no processo de leucemogênese em pacientes com *BCR-ABL1* (ILLERT *et al.*, 2015). Apesar desse trabalho demonstrar um papel oncogênico para Grb10 em modelo murino com BCR-ABL1, outros estudos relatam sua dualidade funcional. Como a hemizigose de *GRB10* foi

observada nas LLA-CPB com *IKZF1*  $\Delta$ 1-8, esse resultado sugere que Grb10 desempenhe função de supressor tumoral nesse contexto biológico.

O gene *DDC*, *Dopa descarboxilase*, codifica uma proteína que catalisa reações de descarboxilação para a formação de dopamina, serotonina e triptofano. Portanto, alterações nesse gene levam a problemas metabólicos derivados da deficiência desses neurotransmissores (BRUN *et al.*, 2010). Com base na função do gene e nas informações da literatura a respeito de suas alterações, o estudo sugere que *DDC* não devem ter influência direta no desenvolvimento das leucemias.

Além dos genes acima destacados, este estudo mostrou que deleções em *COBL* são recorrentes nas LLA-CPB com deleção de *IKZF1*. A revisão de literatura também apontou sua importância em doenças do espectro do autismo (GRISWOLD *et al.*, 2012). A justificativa biológica para que alterações no *COBL* estejam associadas ao autismo está baseada no papel deste gene no desenvolvimento e função neural. O *COBL* possui 17 éxons e está localizado no cromossomo 7 (banda citogenética 7p12.1). A proteína codificada por este gene possui domínios ricos em prolina (PRM) e domínios de ligação aos monômeros de actina (WH2, do inglês *Wiskott-Aldrich syndrome protein homology 2*). *COBL* apresenta três cópias do domínio WH2 e várias cópias do domínio PRM, incluindo uma entre o primeiro e segundo domínio WH2 (WINCKLER; SCHAFER, 2007; QUINLAN; KERKHOFF, 2008).

Os domínios WH2 coordenam diversas interações funcionais entre monômeros de actina e promovem a polimerização da actina de maneira dose-dependente, fenômeno denominado nucleação da actina (WINCKLER; SCHAFER, 2007). Este processo demanda a atuação de fatores de nucleação, como o complexo Arp2/3, forminas e a proteína Spire para estabilizar o oligômero de actina e iniciar a polimerização do filamento. A função de *COBL* foi descoberta em 2007, sendo principalmente associada ao controle da morfologia neural e do desenvolvimento, tendo em vista sua localização em regiões com alta dinâmica de actina, modulando a morfologia celular, e o seu papel como indutor da ramificação de dendritos nos neurônios (AHUJA *et al.*, 2007), o que justifica o papel biológico das alterações em *COBL* em doenças neuronais, como autismo (GRISWOLD *et al.*, 2012).

A localização de cada quebra no *COBL* encontrada neste estudo, além das quebras encontradas em outros trabalhos da literatura está ilustrada na Figura 6.1. Apesar dos dados desse estudo em conjunto com os relatos publicados na literatura indicarem que *COBL* é uma região de maior frequência de quebras nas  $\Delta IKZF1$ , os pontos de quebra do lado mais telomérico das deleções variaram consideravelmente entre os casos. Como não houve uma região de *hotspot* antes de *IKZF1*, a implementação da detecção das *IKZF1*  $\Delta 1-8$  por MP-PCR tornou-se inviável. Apesar disso, o estudo apresentou como alternativa ao objetivo inicial uma ferramenta importante para a avaliação de CNAs no cromossomo 7 a partir do desenvolvimento de um ensaio de MLPA customizado. A técnica tem relevância não somente para a investigação de alterações promotoras de *IKZF1*  $\Delta 1-8$ , mas também para a identificação de monossomia 7 e outras aberrações com valor clínico para outras neoplasias, como, por exemplo, as leucemias mieloides agudas (DE ROOIJ *et al.*, 2015; EISFELD *et al.*, 2016).

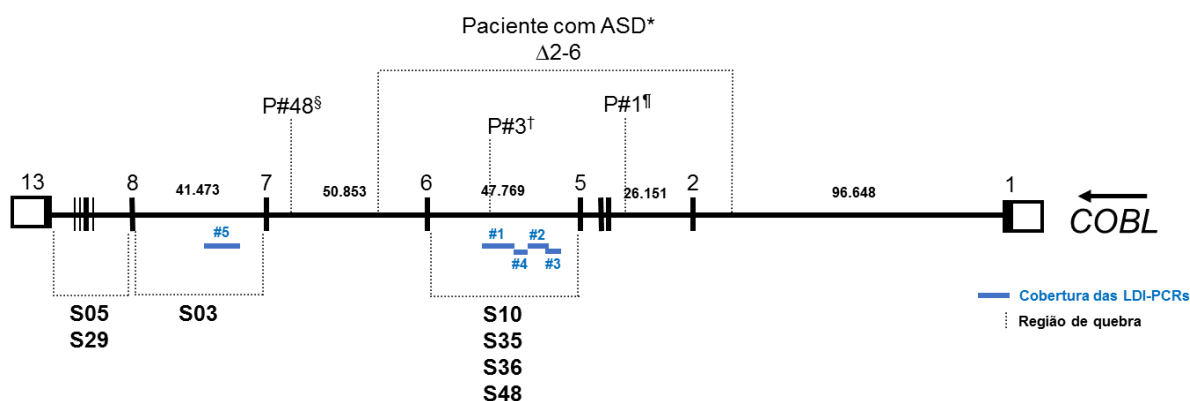


Figura 6.1. Sumário de pontos de quebra presentes no *COBL* em amostras com *IKZF1*  $\Delta 1-8$ .

A estrutura do gene *COBL* e pontos de quebra encontrados em duas amostras (S35 e S36) analisadas por microarranjo neste estudo e previamente reportadas na literatura: \*deleção intersticial no *COBL* encontrada no paciente autista da família 39391 (GRISWOLD *et al.*, 2012); § paciente 48 com LLA-CPB pediátrica, que apresentou deleção *IKZF1*  $\Delta 1-8$  e quebra do DNA no *COBL* (BAUGHN *et al.*, 2015); † paciente 3 diagnosticado com LLA-CPB pediátrica (MEYER, C.; ZUR STADT, U.; ESCHERICH, G.; HOFMANN, J.; BINATO, R.; BARBOSA TDA, C.; *et al.*, 2013); ¶ paciente com câncer coloretal esporádico metastático (GONZALEZ-GONZALEZ *et al.*, 2014). As barras azuis horizontais destacam as regiões analisadas por LDI-PCR, enquanto as linhas pretas tracejadas apontam a localização dos pontos de quebra nos íntrons de *COBL* identificados nas amostras estudadas.

#### 6.4 Mecanismo relacionado com a quebra do DNA nas deleções completas de *IKZF1*

Os rearranjos gênicos são consequentes da quebra da dupla fita do DNA em duas regiões distintas do genoma, seguido do reparo desses segmentos (TSAI *et al.*, 2008). Nas neoplasias linfoides, os rearranjos são derivados de três mecanismos: (1) recombinação mediada por RAG, que reconhece sequências sinais de recombinação (RSSs) formadas pelas sequências consenso 5'-CACAGTG-3' e 5'-ACAAAACCC-3' com espaçadores de 12 ou 23 pares de base, 12RSS ou 23RSS, respectivamente; (2) recombinação de troca de classe, na qual a proteína AID desamina citidinas da fita simples de alças tipo R em *loci* de imunoglobulinas, promovendo a quebra da dupla fita do DNA; (3) quebras aleatórias causadas por espécies reativas de oxigênio ou radiação ionizante. Nesse caso, as quebras do DNA devem apresentar pontos de quebra mais dispersos; no entanto, somente quebras em locais que levam a vantagens proliferativas para o clone leucêmico devem persistir na população celular (GREAVES; WIEMELS, 2003).

Diversos estudos apontam que o mecanismo promotor de deleções intragênicas de *IKZF1* pode ser atribuído à ação de RAG, tendo em vista a identificação de RSSs nas proximidades dos pontos de quebra (MULLIGHAN *et al.*, 2008; IACOBUCCI *et al.*, 2009). No entanto, a associação entre a recombinação por RAG e as *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 ainda não havia sido esclarecida. A partir da metodologia de busca de RSSs funcionais com o algoritmo RIC score, o trabalho mostrou que as regiões de ponto de quebra das *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 não são semelhantes às RSSs, sugerindo que outro mecanismo de quebra do DNA deve estar relacionado com esse tipo de deleção de *IKZF1*. Além disso, as sequências de quebra das *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 identificadas nesse estudo não apresentaram nucleotídeos adicionais na junção da deleção, sugerindo que além da ausência da participação de RAG, as *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 também não estão associadas com a ação de TdT.

Por outro lado, RSSs e nucleotídeos adicionais foram encontrados em deleções intragênicas de *IKZF1* e fusões *IKZF1-COBL*. Com isso, os resultados demonstram que, enquanto o mecanismo causador de deleções intragênicas de *IKZF1* está associado com a atividade de RAG e TdT, as grandes deleções intersticiais e monossomia 7 que levam à *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 devem estar relacionadas com outros mecanismos causadores de instabilidade genômica.

Para melhor compreender os mecanismos causadores das *IKZF1*  $\Delta$ 1-8, o estudo também identificou a localização do motivo CpG mais próximo dos pontos de quebra. Conforme discutido em (TSAI *et al.*, 2008), os rearranjos gênicos podem ser derivados de atividade combinada de AID e RAG. Dessa forma, a atividade de AID sobre citosinas metiladas no carbono 5 (5'-mC) em dinucleotídeos CpG pode levar à formação de erros de pareamento. Na tentativa de reparar a bolha formada pelo não pareamento correto das bases, RAG poderia causar o rearranjo errôneo levando à deleção intersticial. No entanto, o estudo mostrou que sequências CpG estão distantes dos pontos de quebra de *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 e de deleções intragênicas de *IKZF1*, revelando assim que esse processo não deve justificar a formação de tais alterações.

Outro mecanismo associado com rearranjos gênicos em leucemias está relacionado com a atividade de topoisomerase e endonucleases. Em leucemias secundárias a tratamentos com inibidores de topoisomerase II, observa-se alta frequência de rearranjos envolvendo o gene *KMT2A* (ou *MLL*) (ZHANG *et al.*, 1996; COWELL, I. G.; AUSTIN, 2012). Estudos de mapeamento da região de quebra sugerem que estruturas secundárias no DNA devem ser reconhecidas pela enzima topoisomerase, facilitando a ação de nucleases que promovem a quebra da dupla fita (FROELICH-AMMON; GALE; OSHEROFF, 1994; LE *et al.*, 2009). Nesse estudo, foi possível identificar estruturas secundárias do DNA nas regiões de quebra de deleções de *IKZF1*, no entanto, a afirmação de seu papel na promoção dessas alterações ainda deve ser interpretada com cautela.

Por fim, as análises de dados de DNase-seq e CHIP-seq para inferir o estado de compactação da cromatina nas regiões de quebra mostraram que os pontos de quebra em *COBL* estavam presentes em regiões de cromatina mais acessível. Estudos demonstram que as taxas de recombinação estão associadas com a presença de cromatina constitutivamente aberta, juntamente com a presença de motivos específicos (ADRIAN; CORCHADO; COMERON, 2016). As regiões de cromatina mais aberta podem ter maior interação com agentes químicos e outras proteínas que promovam a quebra da dupla fita do DNA. No entanto, a ausência de marcadores de cromatina mais aberta nos pontos de quebras em outras regiões demonstra que outros mecanismos devem estar associados com a promoção das *IKZF1*  $\Delta$ 1-8.

Outros estudos também mostram que a determinadas regiões do genoma sofrem maior estresse replicativo e, portanto, são mais suscetíveis à quebra da dupla fita de DNA. Por definição, essas regiões são denominadas sítios frágeis comuns (CFSs) e podem ocorrer em genes mais longos, em regiões com enriquecimento de repetições do dinucleotídeo AT e quando há replicação incompleta do DNA (DURKIN; GLOVER, 2007). Nesses segmentos do genoma, a cromatina geralmente está mais fechada, porém, pode apresentar estruturas secundárias que geram sua instabilidade. Por outro lado, os sítios frágeis de replicação inicial (ERFSs) ocorrem em regiões com transcrição ativa; portanto, próximos a regiões repetitivas e regiões ricas em dinucleotídeos CpG e com maior densidade de origens de replicação, em um processo independente de atividade de AID (MORTUSEWICZ *et al.*, 2013). Os ERFSs são mais enriquecidos em pares de genes com direções opostas, como no caso da transcrição convergente entre *IKZF1* e *FIGNL1* (BARLOW *et al.*, 2013). Os resultados das análises de deleções completas e intragênicas identificaram quebras do DNA frequentemente envolvendo o gene *COBL*, inclusive fusões entre *IKZF1* e *COBL*. O fato desse genes estarem localizados próximos um do outro (~900 Mb), juntamente com o fato de que apresentam transcrição convergente, sugere a presença de uma instabilidade na região, que poderia propiciar a quebra do DNA e rearranjos com *COBL* e *FIGNL1*.

Outra questão importante relacionada à formação de translocações e rearranjos em leucemias é o momento ou estágio maturativo em que a alteração ocorre. Dado o envolvimento de RAG, TdT e AID no desenvolvimento dessas alterações, o período em que esses genes são expressos é essencial para a formação dos rearranjos. Como a expressão desses genes sofre variações durante a maturação da célula B, a formação dessas alterações deve ocorrer em estágios maturativos específicos (LIEBER, 2016). Nesse contexto, RAG e TdT apresentam níveis mais elevados nos estágios pró-B/pré-B, quando são essenciais para o processo de recombinação dos segmentos V, D e J dos genes das imunoglobulinas. Dessa forma, os rearranjos de *KMT2A*, *ETV6-RUNX1* e *BCR-ABL1* provavelmente ocorrem antes do estágio pró-B, ou seja, antes da expressão de RAG e TdT, tendo em vista que estudos já publicados não encontraram sequências RSSs e nucleotídeos adicionais nas junções desses rearranjos (PINE *et al.*, 2003; HOTFILDER *et al.*, 2005; JANSEN *et al.*, 2007). Por outro lado, células B e, mais especificamente, células pré-B apresentam expressão de AID para realizarem o rearranjo de troca de

classe (CROUCH *et al.*, 2007). Portanto, a formação de rearranjos gênicos localizados próximos a sítios CpGs têm sido associadas a estágios mais maduros da célula B, como o caso de rearranjos de *bcl-1/2* e *E2A-PBX1* (TSAI *et al.*, 2008).

As deleções intragênicas de *IKZF1* devem ser geradas durante as etapas maturativas pró/pré-B, tendo em vista a presença de RSSs e nucleotídeos adicionais nas proximidades desses rearranjos (LIEBER, 2016). No entanto, as deleções completas de *IKZF1* não apresentaram tais motivos nos locais de ponto de quebra, nem associação com sítios CpG. Além disso, as *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 também estão presentes em LMAs, principalmente em decorrência de monossomia 7 (DE ROOIJ *et al.*, 2015). Dessa forma, o estudo sugere que as *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 devem ser formadas em estágios mais imaturos da diferenciação B, provavelmente em uma célula-tronco hematopoiética mieloide-linfoide comum.



## 7 CONCLUSÕES

- Não foram observadas diferenças nas características clinico-laboratoriais entre pacientes com deleção  $\Delta 1-8$  e intragênica de *IKZF1*. O mesmo foi observado em casos sem alterações de *IKZF1*;
- As deleções completas de *IKZF1* estão associadas com deleções de genes adjacentes, como *ZBPB*, *DDC* e *FIGNL1*, mostrando que as *IKZF1*  $\Delta 1-8$  compreendem grandes deleções no cromossomo 7, que levam à hemizigose de diversos genes. Além disso, a raridade de deleções cooperativas em *EBF1* e *BTG1* revela que o processo de leucemogênese nas LLA-CPB com *IKZF1*  $\Delta 1-8$  independe de tais alterações;
- Análise citogenético-molecular revelou que as deleções completas de *IKZF1* são consequentes de deleção intersticial no braço curto do cromossomo 7 (28%), monossomia 7 (19%), deleção com ponto de quebra no *COBL* (17%), deleção completa de *IKZF1* sem comprometimento de outras regiões analisadas (14%), isocromossomo (7q) (11%) e perda do braço curto de uma cópia do cromossomo 7 (11%);
- Translocações não balanceadas entre os cromossomos 7 e 9 podem promover a *IKZF1*  $\Delta 1-8$  através da perda do derivativo 7. Essas translocações geralmente promovem a fusão de *PAX5* com *ELN*, *POM121* ou *AUTS2* em 7q11.2;
- A investigação de pontos de quebra em amostras com *IKZF1*  $\Delta 1-8$  permitiu a identificação de *hotspot* no gene *COBL* em 17% das amostras analisadas. A inclusão de amostras com deleção da região terminal de *IKZF1* mostrou que os rearranjos de *COBL* também podem ser encontrados em deleções intragênicas de *IKZF1*, as quais frequentemente têm ponto de quebra no íntron 5 de *COBL*. Tendo em vista que *IKZF1* e *COBL* estão em direções opostas, a fusão de ambos não forma uma proteína quimérica;
- O estudo identificou sequências sinais de recombinação de RAG em deleções intragênicas de *IKZF1*, incluindo nos casos com *IKZF1-COBL*. No entanto, não foi observada a presença desses motivos nas deleções completas. Apesar disso, os pontos de quebra das deleções completas de *IKZF1* com envolvimento de *COBL* coincidiram com regiões de cromatina mais aberta;

- Apesar da maior frequência de rearranjos de *COBL* em *IKZF1*  $\Delta$ 1-8, houve grande variação do ponto de quebra entre as amostras, principalmente na região 7pter. Dessa forma, não foi possível implantar a detecção das *IKZF1*  $\Delta$ 1-8 na metodologia de MP-PCR para o diagnóstico do *status* de *IKZF1*. Apesar disso, nesse estudo foi desenvolvida uma combinação de ensaios de MLPA que norteiam a identificação das principais alterações no cromossomo 7 presentes em *IKZF1*  $\Delta$ 1-8.

## 8 REFERÊNCIAS

ADRIAN, A. B.; CORCHADO, J. C.; COMERON, J. M. Predictive Models of Recombination Rate Variation across the *Drosophila melanogaster* Genome. **Genome Biol Evol**, v. 8, n. 8, p. 2597-612, Sep 02 2016.

AHUJA, R. *et al.* Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 337-50, Oct 19 2007.

ARBER, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 19 2016.

ASAI, D. *et al.* IKZF1 deletion is associated with a poor outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Japan. **Cancer Med**, v. 2, n. 3, p. 412-9, Jun 2013.

ASPLAND, S. E.; BENDALL, H. H.; MURRE, C. The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. **Oncogene**, v. 20, n. 40, p. 5708-17, Sep 10 2001.

BARBOSA, T. C. *et al.* Frequency of copy number abnormalities in common genes associated with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cytogenetic subtypes in Brazilian children. **Cancer Genet**, v. 208, n. 10, p. 492-501, Oct 2015.

BARROW, T. M. *et al.* Aberrant methylation of imprinted genes is associated with negative hormone receptor status in invasive breast cancer. **Int J Cancer**, v. 137, n. 3, p. 537-47, Aug 1 2015.

BAUGHN, L. B. *et al.* Integration of cytogenomic data for furthering the characterization of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: a multi-institution, multi-platform microarray study. **Cancer Genet**, v. 208, n. 1-2, p. 1-18, Jan-Feb 2015.

BEHM, F. G. *et al.* Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. **Blood**, v. 87, n. 7, p. 2870-7, Apr 1 1996.

BROZEK, I. *et al.* Cytogenetic analysis and clinical significance of chromosome 7 aberrations in acute leukaemia. **J Appl Genet**, v. 44, n. 3, p. 401-12, 2003.

BRUN, L. *et al.* Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. **Neurology**, v. 75, n. 1, p. 64-71, Jul 6 2010.

CAMPANA, D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Hematol**, v. 19, n. 4, p. 313-8, Jul 2012.

CATOVSKY, D. *et al.* A classification of acute leukaemia for the 1990s. **Ann Hematol**, v. 62, n. 1, p. 16-21, Feb 1991.

CAYE, A. *et al.* Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-

cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 98, n. 4, p. 597-601, Apr 2013.

CHROUSOS, G. P.; KINO, T. Ikaros transcription factors: flying between stress and inflammation. **J Clin Invest**, v. 115, n. 4, p. 844-8, Apr 2005.

CLAPPIER, E. *et al.* An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. **Leukemia**, v. 28, n. 1, p. 70-7, Jan 2014.

COWELL, I. G.; AUSTIN, C. A. Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to anti-topoisomerase II agents. **Int J Environ Res Public Health**, v. 9, n. 6, p. 2075-91, Jun 2012.

COWELL, L. G. *et al.* Identification and utilization of arbitrary correlations in models of recombination signal sequences. **Genome Biol**, v. 3, n. 12, p. RESEARCH0072, 2002.

CRIST, W. *et al.* Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 76, n. 3, p. 489-94, Aug 1 1990.

CROUCH, E. E. *et al.* Regulation of AID expression in the immune response. **J Exp Med**, v. 204, n. 5, p. 1145-56, May 14 2007.

DE ROOIJ, J. D. *et al.* Recurrent deletions of IKZF1 in pediatric acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 100, n. 9, p. 1151-9, Sep 2015.

DE SOUZA REIS, R., SR. *et al.* Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatr Blood Cancer**, v. 56, n. 1, p. 58-64, Jan 2011.

DEN BOER, M. L. *et al.* A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 2, p. 125-34, Feb 2009.

DILLON, L. W. *et al.* DNA topoisomerases participate in fragility of the oncogene RET. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75741, 2013.

DORGE, P. *et al.* IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. **Haematologica**, v. 98, n. 3, p. 428-32, Mar 2013.

DRUKER, B. J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 4808-17, Dec 15 2008.

DUPLOYEZ, N. *et al.* Acquisition of genomic events leading to lymphoblastic transformation in a rare case of myeloproliferative neoplasm with BCR-JAK2 fusion transcript. **Eur J Haematol**, v. doi: 10.1111/ejh.12752. [Epub ahead of print], Mar 3 2016.

DYER, M. J. *et al.* Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers? **Blood**, v. 115, n. 8, p. 1490-9, Feb 25 2010.

EISFELD, A. K. *et al.* Mutational landscape and gene-expression patterns in adult acute myeloid leukemias with monosomy 7 as a sole abnormality. **Cancer Res**, Oct 26 2016.

ERIDANI, S. *et al.* Monosomy 7 and Ph-positive acute lymphoblastic leukaemia: cytogenetic and molecular aspects. **Leuk Res**, v. 11, n. 11, p. 965-9, 1987.

EZZAT, S. *et al.* An essential role for the hematopoietic transcription factor Ikaros in hypothalamic-pituitary-mediated somatic growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 7, p. 2214-9, Feb 14 2006.

FLACH, J. *et al.* An accumulation of cytogenetic and molecular genetic events characterizes the progression from MDS to secondary AML: an analysis of 38 paired samples analyzed by cytogenetics, molecular mutation analysis and SNP microarray profiling. **Leukemia**, v. 25, n. 4, p. 713-8, Apr 2011.

FROELICH-AMMON, S. J.; GALE, K. C.; OSHEROFF, N. Site-specific cleavage of a DNA hairpin by topoisomerase II. DNA secondary structure as a determinant of enzyme recognition/cleavage. **J Biol Chem**, v. 269, n. 10, p. 7719-25, Mar 11 1994.

GAIKWAD, A. *et al.* Prevalence and clinical correlates of JAK2 mutations in Down syndrome acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 144, n. 6, p. 930-2, Mar 2009.

GEORGOPOULOS, K. *et al.* The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. **Cell**, v. 79, n. 1, p. 143-56, Oct 7 1994.

GEORGOPOULOS, K.; MOORE, D. D.; DERFLER, B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. **Science**, v. 258, n. 5083, p. 808-12, Oct 30 1992.

GONZALEZ-GONZALEZ, M. *et al.* Identification of a characteristic copy number alteration profile by high-resolution single nucleotide polymorphism arrays associated with metastatic sporadic colorectal cancer. **Cancer**, v. 120, n. 13, p. 1948-59, Jul 1 2014.

GREAVES, M. F.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639-49, Sep 2003.

GRISWOLD, A. J. *et al.* Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. **Hum Mol Genet**, v. 21, n. 15, p. 3513-23, Aug 1 2012.

HAGMAN, J.; RAMIREZ, J.; LUKIN, K. B lymphocyte lineage specification, commitment and epigenetic control of transcription by early B cell factor 1. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 356, p. 17-38, 2012.

HAREWOOD, L. *et al.* Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. **Leukemia**, v. 17, n. 3, p. 547-53, Mar 2003.

HARRISON, C. J. *et al.* Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 125, n. 5, p. 552-9, Jun 2004.

HEEREMA, N. A. *et al.* Secondary cytogenetic aberrations in childhood Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia are nonrandom and may be associated with outcome. **Leukemia**, v. 18, n. 4, p. 693-702, Apr 2004.

HITCHINS, M. P. *et al.* Maternal repression of the human GRB10 gene in the developing central nervous system; evaluation of the role for GRB10 in Silver-Russell syndrome. **Eur J Hum Genet**, v. 9, n. 2, p. 82-90, Feb 2001.

HJALGRIM, L. L. *et al.* Age- and sex-specific incidence of childhood leukemia by immunophenotype in the Nordic countries. **J Natl Cancer Inst**, v. 95, n. 20, p. 1539-44, Oct 15 2003.

HOF, J. *et al.* Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 23, p. 3185-93, Aug 10 2011.

HOLMFELDT, L. *et al.* The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, v. 45, n. 3, p. 242-52, Mar 2013.

HOTFINDER, M. *et al.* Leukemic stem cells in childhood high-risk ALL/t(9;22) and t(4;11) are present in primitive lymphoid-restricted CD34+CD19- cells. **Cancer Res**, v. 65, n. 4, p. 1442-9, Feb 15 2005.

HUNGER, S. P. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. **Blood**, v. 87, n. 4, p. 1211-24, Feb 15 1996.

IACOBUCCI, I. *et al.* Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). **Blood**, v. 114, n. 10, p. 2159-67, Sep 3 2009.

ILLERT, A. L. *et al.* Grb10 is involved in BCR-ABL-positive leukemia in mice. **Leukemia**, v. 29, n. 4, p. 858-68, Apr 2015.

IMAMURA, T. *et al.* IKZF1 deletion is enriched in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia patients showing prednisolone resistance. **Leukemia**, v. 30, n. 8, p. 1801-3, Aug 2016.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943-55, Jun 1 2013.

JAGER, R. *et al.* Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. **Leukemia**, v. 24, n. 7, p. 1290-8, Jul 2010.

JANSEN, M. W. *et al.* Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement. **Leukemia**, v. 21, n. 4, p. 633-41, Apr 2007.

JIA, M. *et al.* The impact of IKZF1 deletion on the prognosis of acute lymphoblastic leukemia: an updated meta-analysis. **Cancer Biomark**, v. 14, n. 6, p. 493-503, 2014.

JOSHI, I. *et al.* Loss of Ikaros DNA-binding function confers integrin-dependent survival on pre-B cells and progression to acute lymphoblastic leukemia. **Nat Immunol**, v. 15, n. 3, p. 294-304, Mar 2014.

KABIR, N. N.; KAZI, J. U. Grb10 is a dual regulator of receptor tyrosine kinase signaling. **Mol Biol Rep**, v. 41, n. 4, p. 1985-92, 2014.

KASTNER, P. *et al.* Function of Ikaros as a tumor suppressor in B cell acute lymphoblastic leukemia. **Am J Blood Res**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 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, n. 6, p. 1258-66, Jun 2007.

KUIPER, R. P. *et al.* IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. **Leukemia**, v. 24, n. 7, p. 1258-64, Jul 2010.

KURZROCK, R. *et al.* A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 325, n. 6105, p. 631-5, Feb 12-18 1987.

L'HOTE, D. *et al.* Fidgetin-like1 is a strong candidate for a dynamic impairment of male meiosis leading to reduced testis weight in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27582, 2011.

LE, H. *et al.* Rearrangements of the MLL gene are influenced by DNA secondary structure, potentially mediated by topoisomerase II binding. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 48, n. 9, p. 806-15, Sep 2009.

LIEBER, M. R. Mechanisms of human lymphoid chromosomal translocations. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 6, p. 387-98, May 25 2016.

MA, X. *et al.* Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Commun**, v. 6, p. 6604, 2015.

MARTINELLI, G. *et al.* IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 31, p. 5202-7, Nov 1 2009.

MERELLI, I. *et al.* RSSsite: a reference database and prediction tool for the identification of cryptic Recombination Signal Sequences in human and murine genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. Web Server issue, p. W262-7, Jul 2010.

MEYER, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. **Leukemia**, v. 27, n. 11, p. 2165-76, Nov 2013.

MEYER, C. *et al.* Refinement of IKZF1 recombination hotspots in pediatric BCP-ALL patients. **Am J Blood Res**, v. 3, n. 2, p. 165-73, 2013.

MEYER, C. *et al.* Refinement of IKZF1 recombination hotspots in pediatric BCP-ALL patients. **Am J Blood Res**, v. 3, n. 2, p. 165-73, 2013.

MEYER, J. A. *et al.* Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, v. 45, n. 3, p. 290-4, Mar 2013.

MILNE, T. A. *et al.* MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. **Mol Cell**, v. 10, n. 5, p. 1107-17, Nov 2002.

MOORMAN, A. V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Blood Rev**, v. 26, n. 3, p. 123-35, May 2012.

\_\_\_\_\_. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 101, n. 4, p. 407-16, Apr 2016.

MOORMAN, A. V. *et al.* A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 124, n. 9, p. 1434-44, Aug 28 2014.

MROUE, R. *et al.* Monoallelic loss of the imprinted gene Grb10 promotes tumor formation in irradiated Nf1<sup>+/-</sup> mice. **PLoS Genet**, v. 11, n. 5, p. e1005235, May 2015.

MULLIGHAN, C. G. *et al.* Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, v. 41, n. 11, p. 1243-6, Nov 2009.

MULLIGHAN, C. G. *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 446, n. 7137, p. 758-64, Apr 12 2007.

MULLIGHAN, C. G. *et al.* BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 110-4, May 1 2008.

MULLIGHAN, C. G. *et al.* Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 5, p. 470-80, Jan 29 2009.

MULLIGHAN, C. G. *et al.* JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 23, p. 9414-8, Jun 9 2009.

MULLIGHAN, C. G. *et al.* CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 471, n. 7337, p. 235-9, Mar 10 2011.



NAKAYAMA, H. *et al.* Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. **Cancer Res**, v. 59, n. 16, p. 3931-4, Aug 15 1999.

OLSSON, L. *et al.* Deletions of IKZF1 and SPRED1 are associated with poor prognosis in a population-based series of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia diagnosed between 1992 and 2011. **Leukemia**, v. 28, n. 2, p. 302-10, Feb 2014.

OLSSON, L.; JOHANSSON, B. Ikaros and leukaemia. **Br J Haematol**, v. 169, n. 4, p. 479-91, May 2015.

PINE, S. R. *et al.* TEL-AML1 fusion precedes differentiation to pre-B cells in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**, v. 27, n. 2, p. 155-64, Feb 2003.

PREVOT, D. *et al.* The leukemia-associated protein Btg1 and the p53-regulated protein Btg2 interact with the homeoprotein Hoxb9 and enhance its transcriptional activation. **J Biol Chem**, v. 275, n. 1, p. 147-53, Jan 7 2000.

PUI, C. H. **Childhood Leukemias**. Cambridge University Press, 2006. ISBN 9780521825191.

PUI, C. H. *et al.* Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 551-65, Feb 10 2011.

QUINLAN, M. E.; KERKHOFF, E. Actin nucleation: bacteria get in-Spired. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 1, p. 13-5, Jan 2008.

REBOLLO, A.; SCHMITT, C. Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. **Immunol Cell Biol**, v. 81, n. 3, p. 171-5, Jun 2003.

RINGROSE, L.; PARO, R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. **Annu Rev Genet**, v. 38, p. 413-43, 2004.

ROBERTS, K. G.; MULLIGHAN, C. G. How new advances in genetic analysis are influencing the understanding and treatment of childhood acute leukemia. **Curr Opin Pediatr**, v. 23, n. 1, p. 34-40, Feb 2011.

\_\_\_\_\_. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 12, n. 6, p. 344-357, Jun 2015.

RUSSELL, L. J. *et al.* IGH@ translocations are prevalent in teenagers and young adults with acute lymphoblastic leukemia and are associated with a poor outcome. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 14, p. 1453-62, May 10 2014.

RUSSO, C. *et al.* Philadelphia chromosome and monosomy 7 in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 77, n. 5, p. 1050-6, Mar 1 1991.

SCHATZ, D. G.; JI, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p. 251-63, Apr 2011.

SCHEIJEN, B. *et al.* Tumor Suppressors BTG1 and IKZF1 Cooperate during Mouse Leukemia Development and Impact Relapse Rate in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v. 126, n. 23, p. 905-905, 2015-12-03 00:00:00 2015.

SCHRAENEN, A. *et al.* mRNA expression analysis of cell cycle genes in islets of pregnant mice. **Diabetologia**, v. 53, n. 12, p. 2579-88, Dec 2010.

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

SCHWAB, C. J. *et al.* Evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification as a method for the detection of copy number abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 49, n. 12, p. 1104-13, Dec 2010.

SCHWICKERT, T. A. *et al.* Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros. **Nat Immunol**, v. 15, n. 3, p. 283-93, Mar 2014.

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

SOULIER, J. *et al.* Amplification of band q22 of chromosome 21, including AML1, in older children with acute lymphoblastic leukemia: an emerging molecular cytogenetic subgroup. **Leukemia**, v. 17, n. 8, p. 1679-82, Aug 2003.

STRICKER, R. B.; LINKER, C. A. Acute lymphoblastic leukemia with monosomy 7 in a Hiroshima survivor 37 years after the bomb. **JAMA**, v. 250, n. 5, p. 640-1, Aug 5 1983.

SWANSON, P. C. The bounty of RAGs: recombination signal complexes and reaction outcomes. **Immunol Rev**, v. 200, p. 90-114, Aug 2004.

TSAI, A. G. *et al.* Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. **Cell**, v. 135, n. 6, p. 1130-42, Dec 12 2008.

USVASALO, A. *et al.* Focal 9p instability in hematologic neoplasias revealed by comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism microarray analyses. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 49, n. 4, p. 309-18, Apr 2010.

VAN DER VEER, A. *et al.* IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL. **Blood**, v. 123, n. 11, p. 1691-8, Mar 13 2014.

VARDIMAN, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 16-20, Mar 19 2010.

VARDIMAN, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-51, Jul 30 2009.

- VENN, N. C. *et al.* Highly sensitive MRD tests for ALL based on the IKZF1 Delta3-6 microdeletion. **Leukemia**, v. 26, n. 6, p. 1414-6, Jun 2012.
- WAANDERS, E. *et al.* The origin and nature of tightly clustered BTG1 deletions in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia support a model of multiclonal evolution. **PLoS Genet**, v. 8, n. 2, p. e1002533, 2012.
- WAANDERS, E. *et al.* Integrated use of minimal residual disease classification and IKZF1 alteration status accurately predicts 79% of relapses in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 25, n. 2, p. 254-8, Feb 2011.
- WINCKLER, B.; SCHAFFER, D. A. Cordon-bleu: a new taste in actin nucleation. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 236-8, Oct 19 2007.
- XIE, S. *et al.* Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. **Oncogene**, v. 21, n. 47, p. 7137-46, Oct 17 2002.
- XIE, S. *et al.* Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. **Oncogene**, v. 20, n. 43, p. 6188-95, Sep 27 2001.
- YANG, Y. L. *et al.* IKZF1 deletions predict a poor prognosis in children with B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia: a multicenter analysis in Taiwan. **Cancer Sci**, v. 102, n. 10, p. 1874-81, Oct 2011.
- YUAN, J.; CHEN, J. FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 26, p. 10640-5, Jun 25 2013.
- ZALIOVA, M. *et al.* ERG deletion is associated with CD2 and attenuates the negative impact of IKZF1 deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 28, n. 1, p. 182-5, Jan 2014.
- ZHANG, Y. *et al.* Secondary acute leukaemias with 11q23 rearrangement: clinical, cytogenetic, FISH and FICTION studies. **Br J Haematol**, v. 92, n. 3, p. 673-80, Mar 1996.
- ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 13, p. 3406-15, Jul 1 2003.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Anexo I

#### Formulário de inclusão de amostras do PHOP, INCA (Parte I)

Exames - Requisição - Incluir

enviar cancelar

VOLTAR

Tipo de Exame  Hematológico  Tumor Pediátrico

#### Dados do Paciente

Nome Paciente\*

Nome da Mãe\*

Identificação da Mãe\*  Telefone da Mãe

Nome do Pai

Data nascimento\*  [ buscar paciente ] Idade  Faixa etária

Data diagnóstico\*  Sexo\*  Cor\*

Registro Hospitalar

Síndrome Down\*  Sim  Não

Outras Síndromes Genéticas\*  Sim  Não

Logradouro Residência\*  Número Residência\*  Complemento Residência

CEP Residência\*  Bairro Residência\*

Estado Residência\*  Município Residência\*

Região Residência

Estado Naturalidade\*  Município Naturalidade\*

#### Dados da Instituição/Médico

Instituição\*  UF

Médico\*

#### Dados Clínicos

Suspeita Diagnóstica

Tratamento Utilizado

Outras Informações Clínicas

Baço\*  Sim  Não

Fígado\*  Sim  Não

Linfonodos\*  Sim  Não

Tumoração\*  Sim  Não

Sistema Nervoso Central Comprometido\*  Sim  Não

Alargamento de Mediastino\*  Sim  Não

Medicamentos sendo usados pelo paciente\*  Sim  Não

Uso Prévio de Corticóide\*  Sim  Não

Tem irmã(o) gemelar?\*  Sim  Não

Tem irmã(o) não gemelar ou primo de 1º grau com câncer?\*  Sim  Não

## Formulário de inclusão de amostras do PHOP, INCA (Parte II)

### Dados Laboratoriais

Leucometria\*   
Hemoglobina   
Blastos\*  %

Hematócrito  %  
Plaquetas

### Dados da Amostra

#### Amostra Enviada\*

- Sangue Periférico  
 Medula Óssea  
 Outros

Anticoagulante:  EDTA  Heparina  
Anticoagulante:  EDTA  Heparina

Lâminas Medula Óssea  Lâminas Sangue Periférico

#### Motivo da Coleta\*

- Diagnóstico  Recaída  DRM  
 Amostra da Mãe  Outros

Data da Coleta\*

Projeto

Data do Envio da Amostra\*

### Dados da Entrevista

Entrevista com a mãe

Data da entrevista com a mãe

### Follow-up

Data

Observação

### Observação

\*Itens de preenchimento obrigatório

[ enviar ]

## **9.2 Anexo II**

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA



INSTITUTO NACIONAL DE  
CÂNCER/ INCA/ RJ



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise Genômica de Deleções no gene IKZF1 em Leucemias Linfoblásticas Agudas Infantis

**Pesquisador:** MARIANA EMERENCIANO CAVALCANTI DE SÁ

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 33709814.7.0000.5274

**Instituição Proponente:** Coordenação de Pesquisa

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ  
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 944.566

**Data da Relatoria:** 28/02/2015

#### **Apresentação do Projeto:**

Conforme descrito no Parecer Substanciado CEP/INCA Nº 748.804 de 13 de Agosto de 2014.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Conforme descrito no Parecer Substanciado CEP/INCA Nº 748.804 de 13 de Agosto de 2014.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Conforme descrito no Parecer Substanciado CEP/INCA Nº 748.804 de 13 de Agosto de 2014.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Conforme descrito no Parecer Substanciado CEP/INCA Nº 748.804 de 13 de Agosto de 2014.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Conforme descrito no Parecer Substanciado CEP/INCA Nº 748.804 de 13 de Agosto de 2014.

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 20.231-092

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3207-4550

**Fax:** (21)3207-4556

**E-mail:** cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 944.566

Em resposta às pendências apontadas pelo CEP/INCA foram submetidos em 28/01/2015 os seguintes arquivos:

- PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_341318.pdf
- Termo\_de\_Acordo\_28Jan2015.pdf
- Resposta Parecer 748.804.pdf
- TCLE\_IKZF1.pdf
- Projeto\_IKZF1\_CEP\_v2\_28.01.15.doc
- documentos 441.11.pdf
- Declaracao\_Ausencia\_Termo\_Assentimento\_28Jan2015.pdf

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Trata-se da análise das respostas às pendências apontadas no Parecer Consubstanciado CEP/INCA Nº 748.804 de 13 de Agosto de 2014:

**PENDÊNCIA 1.1**

**RESPOSTA:** Na seção "População de Estudo" foram atendidos os esclarecimentos solicitados. "As amostras biológicas utilizadas neste estudo são de medula óssea (MO) obtidas antes de qualquer procedimento terapêutico e provenientes das instituições colaboradoras no Brasil, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão abaixo descritos.

1. Seleção dos casos – coorte retrospectiva: Serão avaliadas as amostras de MO que foram recebidas das coletas já realizadas em pacientes com até 16 anos de idade, com diagnóstico de LLA-cpB, e atendidos nas instituições no Brasil. Somente serão aceitas para análises deste estudo, as amostras biológicas referentes aos pacientes cujos responsáveis tenham assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) específico do Programa de Hematologia-Oncologia Pediátricos (PHOP) localizado no Centro de Pesquisas (CPQ), INCA-RJ, e também aceitem assinar o TCLE específico para este estudo.

É previsto o recebimento de amostras que foram coletadas durante o período de Janeiro de 2009 a dezembro de 2014. Estas serão consideradas, para efeitos de análises deste estudo, como "amostras retrospectivas" ou "AR".

2. Seleção dos casos – coorte prospectiva: Serão avaliadas as amostras de MO que serão recebidas das coletas a serem realizadas em pacientes com até 16 anos de idade, para diagnóstico de LLA-

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 20.231-092

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3207-4550

**Fax:** (21)3207-4556

**E-mail:** cep@inca.gov.br





Continuação do Parecer: 944.566

cpB, e que serão atendidos nos centros de pesquisa colaboradores no Brasil. Somente serão aceitas para as análises deste estudo, as amostras biológicas referentes aos pacientes que assinarem o TCLE específico do PHOP, e também o TCLE específico para este estudo. Estas amostras biológicas serão consideradas, para efeitos de análises deste estudo, como "amostras prospectivas" ou "AP".

O recrutamento de pacientes elegíveis para este estudo, será realizado em cada instituição, pelo pesquisador participante e/ou profissional/is da área clínica encarregado/s do contato com o paciente. Este profissional/is deverão ser designado(s) pelo pesquisador participante responsável pela instituição, e ter os respectivos registros nos arquivos deste estudo (Currículo Vitae, licença profissional, treinamentos, Identificações no formulário de profissionais designados para o estudo, por exemplo), como forma de garantirmos que as amostras biológicas serão selecionadas de acordo com este projeto de pesquisa. Somente serão selecionados os pacientes que estejam de acordo com os critérios de inclusão e exclusão acima descritos. Para esta população de pacientes será apresentado o TCLE para o responsável do paciente elegível. A aplicação destes documentos também será realizada pelos profissionais qualificados e treinados para esta tarefa, nas instituições participantes.

i. Critérios de inclusão: a) Paciente com idade até 16 anos (incompletos); b) Paciente diagnosticado com LLA-cpB, de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS); c) Disponibilidade de amostras de MO; d) Paciente e responsável que aceitarem participação neste estudo, através de assinaturas nos TCLEs.

ii. Critérios de exclusão: a) Paciente com leucemias associadas a síndromes congênitas e mielodisplasias; b) Paciente com material insuficiente ou células de baixa viabilidade; c) Paciente com 16 anos de idade ou mais."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

#### PENDÊNCIA 1.2

RESPOSTA: Estes esclarecimentos foram dados nas seções "Tipo do estudo" e "População de Estudo": "Estudo retrospectivo e prospectivo de análise molecular qualitativa."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

#### PENDÊNCIA 1.3

RESPOSTA: O esclarecimento quanto ao critério adotado para definir o número amostral encontra-se na seção "Desenho do Estudo". "Estima-se analisar aproximadamente 30 amostras de medula

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 20.231-092

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3207-4550

**Fax:** (21)3207-4556

**E-mail:** cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 944.566

óssea (MO) de pacientes com diagnósticos de LLA-cpB. Este número foi estimado através de cálculo amostral a partir da prevalência da lesão molecular em questão (8)."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

#### PENDÊNCIA 1.4

RESPOSTA: O texto foi re-escrito, conforme no item "Análise dos dados". "Os resultados brutos do 100k SNP Array serão adquiridos pelo programa Affymetrix GCOS (versão 1.4) e os dados analisados serão gerados pelo programa GTYPE (versão 4.0). Os valores de cópia numérica e LOH serão inferidos pelo algoritmo CNAT (versão 3.0). O algoritmo CNAG v.2.0 (Copy Number Analyzer for GeneChip Mapping 100K arrays) também será usado para a análise dos dados de cópia numérica e LOH. Arquivos de referência serão gerados a partir da amostra de remissão (quando disponível) para a análise pareada com a amostra tumoral. Caso contrário, os dados serão comparados com os dados de um agrupamento de amostras em remissão."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

#### PENDÊNCIA 1.5

RESPOSTA: O item referente a "BENEFICIOS" foi removido do projeto e inserido no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

#### PENDÊNCIA 1.6

RESPOSTA: O projeto foi adequado segundo as observações explicitadas nesta pendência.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

#### PENDÊNCIA 2

RESPOSTA: Seguem abaixo as respostas para cada subitem.

2.1, 2.2, 2.3 - As declarações pertinentes ao projeto de acordo com os requisitos estabelecidos na Resolução Nº 441 de 12 de maio de 2011 estão apresentadas.

2.4 - Foi elaborado um modelo de Termo de Acordo para aprovação do CEP.

2.5 - A informação referente ao armazenamento de amostras foi revisada.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

#### PENDÊNCIA 3

RESPOSTA: O cronograma foi adequado conforme solicitado.

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 20.231-092

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3207-4550

**Fax:** (21)3207-4556

**E-mail:** cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE  
CÂNCER/ INCA/ RJ



Continuação do Parecer: 944.566

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 4

RESPOSTA: Diante dos esclarecimentos explicitados nesta pendência, foi elaborado o TCLE apropriado para o projeto de pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

RIO DE JANEIRO, 04 de Fevereiro de 2015

---

**Assinado por:**  
**Carlos Henrique Debenedito Silva**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 20.231-092

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3207-4550

**Fax:** (21)3207-4556

**E-mail:** cep@inca.gov.br

### 9.3 Anexo III

#### **Trabalho científico diretamente relacionado ao doutorado do aluno:**

LOPES, B. A. *et al.* *COBL* is a novel hotspot for *IKZF1* deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**, Jul 13 2016.