



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

**ELDA PEREIRA NORONHA**

**PERFIL IMUNOFENOTÍPICO E MOLECULAR DAS LEUCEMIAS  
AGUDAS DE CÉLULAS-T PEDIÁTRICAS**

**Orientadora: 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

ELDA PEREIRA NORONHA

Perfil imunofenotípico e molecular das leucemias agudas de células-T 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. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Rio de Janeiro

2016



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

**ELDA PEREIRA NORONHA**

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

Perfil imunofenotípico e molecular das leucemias agudas de células-T 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.

**Aprovada em:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

Dr. Martin Hernan Bonamino (INCA)

Dra. Daniella Areas Mendes da Cruz (FIOCRUZ)

Dra. Mihoko Yamamoto (UNIFESP)

Dr. Luiz Claudio Santos Thuler (INCA)

Dra. Maura Rosane Valerio Ikoma (Hospital Amaral Carvalho) – Suplente externo

Dra. José Andrés Morgado Díaz (INCA)-Suplente Interno

Rio de Janeiro

2016

N852p Noronha, Elda Pereira.

Perfil imunofenotípico e molecular das leucemias agudas de células-T pediátricas / Elda Pereira Noronha. – Rio de Janeiro, 2016. 158 f.: il. color.

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

Orientador: Maria do Socorro Pombo de Oliveira.

1. Leucemia Linfoma Linfoblástico de Células T Precursoras. 2. Imunofenotipagem. 3. Genômica. 4. Sobrevida. I. Oliveira, Maria do Socorro Pombo de (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99419

## AGRADECIMENTOS

É neste momento que paro para reflexão e me dou conta da grandiosidade de **Deus**, agradeço, não só hoje, mas todos os dias da minha vida. Sem Ele, não teria força e coragem para vencer os desafios.

À minha orientadora Maria do Socorro Pombo de Oliveira, a minha mentora científica, por todos os ensinamentos passados, por todas as oportunidades, e principalmente por todos os grandes desafios a que me confiastes. Como eu cresci com cada um deles! Serei eternamente grata! Não posso deixar de agradecer também, por todas as risadas, por todos os conselhos e cuidados de mãe, por todo carinho e pela oportunidade de te conhecer fora do ambiente de trabalho e descobrir quão especial tu és.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer, em especial ao Dr. Luís Felipe Ribeiro e Marcelo Soares, coordenadores durante o meu período de doutorado; aos secretários Rodrigo Mafra, Daniele Brito, Andreia Dantas, por todos os esforços para tornar o nosso programa cada vez melhor.

Ao Ministério da Saúde pela bolsa de pós-graduação concedida.

Aos membros da banca por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Claudio Santos Thuler por ter me ensinado sobre análises de sobrevivência e SPSS.

Às pesquisadoras Marcela Mansur e Mariana Emerenciano por todos ensinamentos que compartilharam comigo ao longo desta jornada. Em especial, a Marcela Mansur, por ter sido quem iniciou, de forma brilhante, o trabalho com as leucemias de células-T no nosso Programa, o qual estou dando continuidade. Agradeço por toda a sua organização e por toda sua ajuda nas análises de mutações, muito obrigada por me ensinar.

A todo corpo Técnico do PHOP, vocês são a nossa base, meu eterno agradecimento a cada um de vocês. Rosângela Esposito, Eugênia Granado, Gisele Moledo, Bruno Aguiar, Camila Andrade, Carolina Zampier, Bruna Souza, Ingrid Koster. Não deixando de esquecer aqueles que já nos deixaram, mas que muito contribuíram, Virginia, Mariana Santana, Nara de Oliveira e Rafaela Tanuri. Meu agradecimento especial a amiga Alessandra Faro, sem você eu não teria dado conta de seguir com projeto de pesquisa e participar da caracterização das amostras. E à Carolina Zampier pela ajuda com os milhares de PCRs do *NOTCH1* e por sempre me fazer acreditar que as coisas eram bem mais simples do que eu pensava.

À Liuana Carvalho pela ajuda nos PCRs do *FBXW7*.

À Suellen Valadares, Neze Jaqueline Rosa Lima, Francianne Gomes Andrade e Tállita Meciany pela ajuda na coleta do seguimento dos pacientes.

Aos médicos participantes do Grupo de Estudo Brasileiro de Leucemia na Infância.

À Thayana da Conceição Barbosa, por ter me acompanhado nos meus primeiros passos na biologia molecular, e que ficava do meu lado, quando eu ficava nervosa por fazer um PCR, rs! “Thayana, não sai de perto de mim, fica do meu lado e vê se estou fazendo certo!” Obrigada Thay, por essas, e por muitas outras que sempre tentou me ajudar e me orientar.

À Francianne Andrade e Júlio César Santoro pelo apoio na realização da técnica e RQ-PCR do *FLT3*, e por sempre me oferecerem ajuda nas horas de sufoco.

À amiga e parceira de trabalho Eugênia Granado, o meu agradecimento eterno, por todos os ensinamentos, por todas as discussões sobre as células-T. Por todas as vezes que parei você para ficarmos horas e horas discutindo sobre o mundo das células-T, mesmo eu atrapalhando o seu serviço diário, você sempre parava para escutar as minhas viagens científicas. O meu muito obrigada pelo seu apoio incondicional e por sua amizade!

Ao nosso grupo de reunião, Ingrid, Eugênia, Filipe, Fran, Gisele, Luísa e Priscilla, obrigada pelo apoio.

Ao Bruno Lopes, pessoa genial e que admiro muito, por sempre estar disposto a ajudar e ensinar quem quer que seja.

À Luísa Vieira Codeço Marques, minha filha científica, rs! Agradeço a sua paciência comigo, a sua preocupação e sua amizade, obrigada por toda ajuda que você me deu neste último ano. Você é a melhor IC que alguém poderia ter.

A todos os amigos que conquistei no PHOP! Em especial a minha amiga Caroline Barbieri (Cherrie), não tenho palavras para agradecer a ela por cuidar de mim tantas vezes, pela sua amizade, pela sua parceria. Ao longo desses anos aprendi muito com você!

Às minhas amigas Haíssa Oliveira Brito e Ana Isabela Soares Martins amigas fundamentais, da época de escola. Em especial Haíssa, companheira na escola, no cursinho, e na faculdade, você foi fundamental durante toda a minha jornada (IC ao Doutorado), sem a sua influência, provavelmente, não estaria onde estou. Sim, você foi a minha grande incentivadora de seguir uma carreira acadêmica, desde da época da graduação. Te agradeço por sempre me fazer acreditar que eu podia!

Às minhas *Girls Magia*, Rafaela Montalvão, Hanna Soares, Marcela Costa e Aline Scovino, como vocês são simplesmente fundamentais na minha vida. Obrigada pelo apoio, pelo carinho, pela amizade, pelas conversas que nos fazem refletir.

Aos meus pais, Raimundo Nonato e Maria José, pelo apoio incondicional. Vocês são exemplos de dedicação e amor aos filhos. Aos meus irmãos Felipe, Marina, Claudio, Leila e Mariana. Amo infinitamente!

Aos meus pais Cariocas Tia Jesus e Tio Josué por terem me acolhido em sua casa, em seus corações.

Ao meu noivo José Odilon, pela sua dedicação, pelo seu amor, pelo seu apoio, sem você na minha vida tudo seria mais difícil.

À minha sogra Elizabete, por todo o cuidado e amor. Ao meu sogro Sérgio, pelas conversas e pelos ensinamentos passados em cada uma delas. Muito muito obrigada.

À minha prima Mylena Pires pela amizade, pelo carinho, pela torcida por mim.

Aos Amigos Pepe, Camila e a pequena Alicia, pelos momentos de alegria, de leveza e pelo apoio.

Ao Daniel Oliveira, pelos jantares maravilhoso, pelos vinhos, pelas conversas para descontrair, enquanto eu e a Dra. Socorro trabalhávamos nesta tese, e por ter me ensinado: “Introdução primeiro e conclusão por último!”, rs!

A toda a minha família Pereira e Noronha que torceram por mim!

*“Para os crentes, Deus está no princípio das coisas; para os cientistas, no final de toda reflexão.”*

Max Planck

## RESUMO

Perfil imunofenotípico e molecular das leucemias agudas de células-T pediátricas

**Introdução:** Leucemia linfoblástica de células-T (LLA-T) é uma doença heterogênea que representa de 10-15% das LLA pediátricas. Diversas alterações como fusões gênicas envolvendo fatores de transcrição e mutações em proto-oncogenes estão associadas às LLAs-T sem, contudo, haver consenso no valor prognóstico. **Objetivos:** Avaliar possíveis associações dos diferentes perfis maturativos, bem como a expressão celular do CD127, CD135 e CD117, às alterações somáticas em LLA-T (Mutação em *IL-7R*, *FLT3*, *FBXW7*, *NOTCH1*, *N-KRAS* e rearranjos gênicos *STIL-TALI* e *TLX3*) e a influência na sobrevida livre de eventos (SLE). **Material e Métodos:** 189 pacientes (< 19 anos) com LLA-T foram avaliados quanto ao perfil imunofenotípico, incluindo marcadores como CD127, CD135 e CD117 pela citometria de fluxo multiparamétrica (CFM). Mutações e fusões gênicas foram identificadas por testes moleculares (PCR, sequenciamento direto e RT-PCR). Foram analisadas as sobrevidas global (SG) e sobrevida livre de eventos (SLE), em cinco anos, pelo método de *Kaplan-Meier* e diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de *log-rank*. Para avaliação da distribuição das variáveis categóricas utilizou-se o teste exato de *Fisher* ou Qui-quadrado. Para a comparação de variáveis contínuas utilizou-se os testes não paramétricos de *Mann-Whitney* ou *Kruskal wallis*. P valor < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** Foram identificados, sete casos (3,7%) de Leucemia Aguda Bifenotípica Mielóide/T, 18 casos (9,5%) de LLA de células precursoras T precoces (LLA-ETP), os casos restantes foram identificados como: T-II (CD2<sup>pos</sup> e/ou CD5<sup>pos</sup> e/ou CD8<sup>pos</sup> e CD4<sup>neg</sup> mCD3<sup>neg</sup>) (n = 26), T-II/III (CD8<sup>pos</sup>CD4<sup>pos</sup>CD1a<sup>neg</sup> mCD3<sup>neg</sup>) (n = 12), T-III (CD1a<sup>pos</sup>mCD3<sup>neg</sup>) (n = 35), T-III/IV (CD1a<sup>pos</sup>mCD3<sup>pos</sup>) (n= 38), T-IVDP (CD1a<sup>neg</sup>mCD3<sup>pos</sup>CD8<sup>pos</sup>CD4<sup>pos</sup>) (n=22), T-IVSP (CD1a<sup>neg</sup>mCD3<sup>pos</sup>CD8<sup>pos</sup> ou CD4<sup>pos</sup>) (n= 14), T-IVDN (CD1a<sup>neg</sup> mCD3<sup>pos</sup> CD8<sup>neg</sup> CD4<sup>neg</sup>) (n=15). A frequência das alterações moleculares foram: *NOTCH1*(43,7%), *FBXW7* (18,1%), *IL7R* (7,2%), *N-KRAS* (9%), *FLT3* (5,5%), *STIL-TALI* (23,6%), *TLX3* (11,8%). Observamos que *FLT3<sup>mut</sup>* foi mais frequente nas LLA-ETP, 29,4% (5/17) (p<0,001); *IL7R<sup>mut</sup>* 27,3% (3/11) (p=0,034) e *NOTCH1<sup>mut</sup>* 73% (8/11) (p=0,06) no subtipo T-II/III e *STIL-TALI* no T-IVSP (5/10) (p = 0,04). Observamos associação da expressão celular alta do CD135 e expressão intermediária/alta do CD117 ao *FLT3<sup>mut</sup>* (p<0,01) e baixa expressão celular do CD117 ao *IL7R<sup>mut</sup>* (p = 0,02), assim como associação entre alta expressão de CD135 e *TLX3<sup>pos</sup>*, e expressão intermediária/alta do CD127 com *N-KRAS<sup>mut</sup>* (p = 0,02). As análises de SG e SLE foram semelhantes, 41,7% (IC95%:37,9-45,4) e 40,3% (IC95%: 36,5 - 44,1), respectivamente. Dos subgrupos identificados, T-II foi o que apresentou maior SLE (51,2%) quando comparado aos demais subtipos (38,5%) (p = 0,027) e o subtipo T-IVSP foi o que apresentou menor SLE (31,2%) quando comparado aos demais subtipos (41,0%) (p=0,075). Em relação as alterações moleculares, casos com *NOTCH1<sup>mut</sup>* tiveram SLE (45,3%) maior do que os casos sem esta alteração SLE (37,1%) (p = 0,043). Casos *STIL-TALI<sup>pos</sup>* tiveram SLE menor (26,7%) (p<0,001). A associação das alterações moleculares (*NOTCH1<sup>mut</sup>* +*IL7R<sup>mut</sup>*, *FBXW7<sup>mut</sup>* + *N-KRAS<sup>mut</sup>*) não influenciaram na SLE de forma significativa. **Conclusões:** Nossos resultados demonstram a heterogeneidade imunofenotípica dos casos de LLA-T, com a identificação de 9 subgrupos distintos. Identificamos o potencial da expressão celular do CD117 e CD135, avaliada pela CFM, como preditores mutações em *FLT3*, *IL7R* e *TLX3*. Além da identificação de subgrupos imunofenotípicos e alterações moleculares com impacto na SLE, sendo potenciais marcadores de prognóstico.



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

**ABSTRACT**

Immunophenotypic and molecular profile in childhood T-cell acute leukemia

T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) is a heterogeneous and aggressive disease that represents 10-15% of childhood ALL. Several alterations such as fusion genes involving transcription factors and mutations in proto-oncogenes are associated with T-ALL, however, without consensus in outcome. **Aim:** To evaluate the association among different maturation profiles, as well as the cellular expression of CD127, CD135 and CD117, to somatic alterations in T-ALL (mutations in *IL7R*, *FLT3*, *FBXW7*, *NOTCH1*, *N-KRAS* and *STIL-TAL1* and *TLX3* gene rearrangements) and influence in event-free survival (EFS). **Methods:** A cohort of 189 T-ALL cases (<19 years old) were evaluated in relation to the immunophenotype profile, including the CD127, CD135 and CD117 markers by multiparametric flow cytometry (MFC). Mutations and fusion genes were identified according to standard molecular techniques (PCR, direct sequencing and RT-PCR). The overall survival (OS) and event-free survival (EFS), in five years, were analyzed by the Kaplan-Meier method and differences among the groups were compared by log-rank test. To evaluate the distribution of categorical variables, the Fisher's exact test or chi-square test were used. To compare continuous variables the non-parametric tests, Mann-Whitney or Kruskal wallis, were used. P values < 0.05 were considered statistically significant. **Results:** We identified seven cases (3.7%) of Myeloid-T biphenotypic acute leukemia (BAL), 18 cases (9.5%) of early T cell precursor ALL (ETP-ALL) and the remaining cases were identified as: T-II (CD2<sup>pos</sup> and/or CD5<sup>pos</sup> and/or CD8<sup>pos</sup> and CD4<sup>neg</sup> mCD3<sup>neg</sup>) (n = 26), T-II/III (CD8<sup>pos</sup>CD4<sup>pos</sup>CD1a<sup>neg</sup> mCD3<sup>neg</sup>) (n = 12), T-III (CD1a<sup>pos</sup>mCD3<sup>neg</sup>) (n = 35), T-III/IV (CD1a<sup>pos</sup>mCD3<sup>pos</sup>) (n = 38), T-IVDP (CD1a<sup>neg</sup>mCD3<sup>pos</sup>CD8<sup>pos</sup>CD4<sup>pos</sup>) (n = 22), T-IVSP (CD1a<sup>neg</sup>mCD3<sup>pos</sup> CD8<sup>pos</sup> or CD4<sup>pos</sup>) (n = 14), T-IVDN (CD1a<sup>neg</sup>mCD3<sup>pos</sup>CD8<sup>neg</sup>CD4<sup>neg</sup>) (n = 15). The frequencies of somatic molecular alterations were: (43.7%) *NOTCH1*, (18.1%) *FBXW7*, (7.2%) *IL7R*, (9%) *N-KRAS*, (5.5%) *FLT3*, (23.6%) *STIL-TAL1*, (11.8%) *TLX3*. Regarding the immunophenotype-genotype association, *FLT3*<sup>mut</sup> was present in 29.4% (5/17) of ETP-ALL cases (p<0.001), *IL7R*<sup>mut</sup>, 27.3% (3/11) (p = 0.034), and *NOTCH1*<sup>mut</sup>, 73% (8/11) (p=0.06), were frequent in the T-II/III subgroup. Additionally, *STIL-TAL1* appeared more frequently in T-IVSP cases, 50% (5/10) (p = 0.04). An association between CD135<sup>high</sup> (p < 0.01) and CD117<sup>intermediate/high</sup> (p=0.02) with *FLT3*<sup>mut</sup>, CD117<sup>low</sup> with *IL7R*<sup>mutated</sup> (p<0.01), and CD135<sup>high</sup> with *TLX3*<sup>pos</sup> was observed as well as an association between CD127<sup>intermediate/high</sup> with *N-KRAS*<sup>mut</sup> (p = 0.02). The OS and EFS analysis were similar, 41.7% (CI95%: 37.9-45.4) e 40.3% (CI95%: 36.5 – 44.1), respectively. The T-II subgroup showed better (EFS), 51.2% versus 38.5% of all others (p = 0.027), while the T-IVSP subgroup was associated with a worse outcome, 31.2% versus 41.0% all others (p = 0.075). Regarding molecular alterations, *NOTCH1*<sup>mut</sup> had better EFS, 45.3% versus 37.1% *NOTCH1*<sup>wt</sup> (p = 0.043), and *STIL-TAL1*<sup>pos</sup> had worst EFS, 26.7% versus 45% *STIL-TAL1*<sup>neg</sup> (p<0.001). The association of molecular alterations (*NOTCH1*<sup>mut</sup>+*IL7R*<sup>mut</sup>, *FBXW7*<sup>mut</sup> + *N-KRAS*<sup>mut</sup>) did not influence significantly the EFS. **Conclusion:** Our results demonstrate the phenotypic heterogeneity of T-ALL cases, with the identification of 9 distinct subgroups. We ascertained the potential of CD135 and CD117 cell expression, assessed by MFC, as predictors of *FLT3*, *IL7R* and *TLX3* mutations. We also identified immunophenotypic subgroups and molecular alterations that influence the EFS, being potential prognostic markers.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leucemias agudas: aspectos gerais	1
1.2. Fatores prognósticos e estratificação de risco	3
1.3. Leucemia linfoblástica aguda de células-T (LLA-T)	3
1.4. Ontogenia das células-T	4
1.5. Classificação dos subtipos maturativos e valor prognóstico	8
1.5.1. A expressão dos fenótipos aberrantes nas LLAs-T pediátricas	10
1.5.2. Leucemia de células precursoras T precoces-LLA-ETP ( <i>Early T cell precursor acute lymphoblastic leucemia</i> )	11
1.5.3. Leucemia bifenotípica ou Leucemia aguda de fenótipo misto	13
1.6. Alterações genômicas-moleculares das LLAs-T pediátricas	14
1.6.1. Alterações do gene <i>NOTCH1</i> e <i>FBXW7</i>	15
1.6.2. Rearranjo <i>STIL-TAL1</i> e a expressão aberrante de <i>TAL1</i>	19
1.6.3. Expressão ectópica do <i>TLX3(HOX11L2)</i>	22
1.6.4. Mutações no <i>RAS</i>	23
1.7. Expressão e alterações moleculares na cadeia alfa do receptor de interleucina-7 (IL7R $\alpha$ ) em LLA-T	24
1.8. Expressão dos receptores cKIT/CD117 e FLT3/CD135 e mutações no gene <i>FLT3</i>	27
2. HIPÓTESE	29
3. OBJETIVOS	31
4. DESENHO DO ESTUDO	32
5. CASUÍSTICA	33
5.1. Critérios de inclusão	33
5.2. Critérios de exclusão	33
5.3. Amostras	33
5.4. Informações clínicas de seguimento	33
6. MÉTODOS	34
6.1. Análise morfológica	34
6.2. Imunofenotipagem	34
6.2.1. Anticorpos utilizados na imunofenotipagem	34

6.2.2. Preparação das amostras para marcação imunofenotípica em amostras frescas	35
6.2.3. Congelamento de células em dimetil sulfoxido (DMSO) para uso posterior para marcação imunofenotípica	36
6.2.4. Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo	37
6.2.5. Critérios de classificação dos subtipos de LLA-T	38
6.3. Testes moleculares	41
6.3.1. Detecção das alterações <i>STIL-TALI</i> e <i>TLX3</i> .	41
6.3.2. Extração de DNA	42
6.3.3. Detecção de mutações no gene <i>FLT3</i> .	43
6.3.4. Sequenciamento para detecção das mutações nos genes <i>NOCT1</i> , <i>IL7R</i> , <i>FBXW7</i> , <i>KRAS</i> e <i>NRAS</i> .	44
6.4 Análises Estatísticas	49
6.5 Aspectos éticos	50
7. RESULTADOS	51
7.1. Caracterização Clínico-demográfica das amostras.	51
7.2. Caracterização dos perfis imunofenotípico e subtipos maturativos.	53
7.2.1. Caracterização do perfil imunofenotípico de acordo com a classificação EGIL (1995)	53
7.2.2. Caracterização do perfil imunofenotípico dos casos de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras-T precoces – LLA-ETP	55
7.2.3. Caracterização do perfil imunofenotípico dos subtipos de leucemia linfoblástica agudas de células-T	57
7.2.4 . Características demográficas e clínicas e dos subtipos pós-reclassificação	62
7.2.5. Avaliação de marcadores não específicos de linhagem T em LLA-T	64
7.2.6 Análises das expressões celulares de CD127, CD135 e CD117 em LLA-T.	67
7.3. Avaliação das alterações moleculares	72
7.3.1. Avaliação das alterações moleculares <i>TLX3</i> , <i>STIL-TALI</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>IL7R</i> , <i>FBXW7</i> e <i>RAS</i>	72
7.3.2. Análise de associações entre as alterações moleculares	74

7.4. Associação entre os subtipos maturativos pós-reclassificação e alterações moleculares	76
7.5. Avaliação da expressão do CD127 de acordo com status das alterações moleculares	81
7.6. Avaliação da expressão do CD117 e CD135 de acordo com status das alterações moleculares	84
7.7. Análise de sobrevida	86
7.7.1. Análise sobrevida livre de eventos das variáveis clínicas e demográficas	87
7.7.2. Análise sobrevida livre de eventos dos subtipos de acordo com o subtipo celular da LLA-T	89
7.7.3 Análise sobrevida livre de eventos de acordo com os marcadores imunofenotípicos	93
7.7.4 Análise sobrevida livre de eventos de acordo com as alterações moleculares e suas associações.	93
8. DISCUSSÃO	97
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	114
10. REFERÊNCIAS	115
11. ANEXOS	140

## LISTA DE TABELAS

Tabela 7.1.	Características clínicas demográficas dos pacientes com leucemia/linfoma linfoblástico T no período de 2005-2014	52
Tabela 7.2.	Porcentagem de blastos positivos para os marcadores celulares de superfície utilizados para a classificação dos casos de LLA-ETP	56
Tabela 7.3.	Frequência de expressão celular dos marcadores de diferenciação de células T nos subtipos pós-reclassificação	61
Tabela 7.4.	Características clínicas e demográficas dos subtipos pós-reclassificação	62
Tabela 7.5.	Frequência dos marcadores celulares mielóides, de células tronco, células NK e CD10 nos subtipos maturativos pós-reclassificação	65
Tabela 7.6.	Características demográficas e clínicas de acordo com o status do CD127 em termos de intensidade mediana de fluorescência (IMF) e porcentagem de células positivas	68
Tabela 7.7.	Sumário das características demográficas, clínicas e subtipos de acordo com as alterações moleculares	73
Tabela 7.8.	Análise de associações entre as alterações moleculares.	75
Tabela 7.9	Associação das alterações moleculares de acordo com os subtipos maturativos pós-reclassificação.	78
Tabela 7.10.	Alterações moleculares de acordo com o tipo de expressão celular do TCR	79
Tabela 7.11.	Sobrevida livre de eventos em 60 meses das variáveis clínicas e demográficas.	87
Tabela 7.12.	Análise de sobrevida livre de eventos de acordo com os subtipos maturativos de acordo com a classificação EGIL.	89

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Estágios de desenvolvimento da célula-T no timo	7
Figura 1.2.	Estrutura do receptor NOTCH1	16
Figura 1.3.	Proteína FBXW7 com seus domínios	18
Figura 1.4.	Representação do <i>locus</i> <i>TAL1</i> e da região 5' gene <i>SIL</i>	20
Figura 1.5.	Exemplo de ativação transcricional por ação do complexo pentamérico com a participação do TAL1 (SCL)	21
Figura 1.6.	Estrutura do receptor da Interleucina -7(IL-7)	24
Figura 1.7.	Estrutura da proteína IL-7R $\alpha$ com a delimitação da região onde ocorrem as mutações	26
Figura 1.8.	Estrutura do receptor FLT3	28
Figura 4.1.	Fluxograma do Estudo	32
Figura 6.1.	Exemplo de análise de citometria de fluxo	37
Figura 6.2.	Eletroforese em gel de agarose de 2% ilustrando casos positivos para o rearranjo <i>STIL-TAL1</i>	41
Figura 6.3.	Eletroforese em gel de agarose de 2% ilustrando casos positivos para o <i>TLX3</i>	42
Figura 6.4.	Eletroforese em gel de agarose 3% representando casos com <i>FLT3</i> mutado	43
Figura 6.5.	Mutação pontual em heterozigose no domínio HD, éxon 26 do <i>NOTCH1</i>	46
Figura 6.6.	Mutação complexa em heterozigose no domínio PEST, éxon 34 do <i>NOTCH1</i>	46
Figura 6.7.	Mutação pontual em heterozigose nos éxons 9 e 10 do <i>FBXW7</i>	47
Figura 6.8.	Mutação pontual em heterozigose nos códons 12 e 13 do <i>NRAS</i>	48
Figura 6.9.	Mutação complexa em heterozigose no éxon 6 do <i>IL7R</i>	49
Figura 7.1.	Frequência dos subtipos de acordo com a classificação EGIL	53
Figura 7.2.	Exemplo de casos de LAB-M/T	54
Figura 7.3.	Exemplo de LLA-ETP	55
Figura 7.4.	Fluxograma de classificação dos subtipos maturativos segundo classificação EGIL e reclassificação	58

Figura 7.5.	Exemplos de subtipos maturativos de LLA-T	60
Figura 7.6.	Comparação da mediana da idade e leucometria de acordo com os subtipos maturativos pós-reclassificação	63
Figura 7.7.	Distribuição dos casos positivos para CD34, HLA-DR, CD13/33, CD117, CD11b e CD10 de acordo com os subtipos maturativos	66
Figura 7.8.	Exemplos de expressão celular do CD127 em blastos de LLA-T	67
Figura 7.9.	Expressão celular do CD127 de acordo com os subtipos maturativos pós-reclassificação	69
Figura.7.10.	Diferenças da expressão celular do CD117 de acordo com os subtipos maturativos pós-reclassificação	70
Figura.7.11.	Diferenças da expressão celular do CD135 de acordo com os subtipos maturativos pós-reclassificação	71
Figura.7.12.	Frequências dos casos com alterações moleculares de acordo com cada subtipos pós-reclassificação	80
Figura 7.13.	Expressão do CD127 em membrana celular de acordo com status do <i>IL7R</i>	81
Figura 7.14.	Expressão do CD127 em membrana celular de acordo com status do <i>N-KRAS</i>	82
Figura 7.15.	Expressão do CD127 em membrana celular de acordo com status de outras alterações moleculares	83
Figura 7.16.	Expressão do CD117 em membrana celular de acordo com status de outras alterações moleculares em relação a intensidade mediana de fluorescência (IMF) e porcentagem de células positivas	84
Figura 7.17.	Expressão do CD135 em membrana celular acordo com status de outras alterações moleculares em relação a IMF e porcentagem de células positivas	85
Figura 7.18.	Curva de <i>Kaplan Meier</i> para a SG, SLE da coorte total e de acordo com os protocolos de tratamento	86
Figura 7.19.	Curva de <i>Kaplan Meier</i> para a SLE em 60 meses da coorte de acordo com variáveis clínicas e demográficas.	88

Figura 7.20.	Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da sobrevida livre de eventos (SLE) entre os subtipos de acordo com a classificação EGIL	90
Figura 7.21.	Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da SLE entre os subtipos LLA-ETP, T-II e T-II/III	91
Figura 7.22.	Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da SLE entre os subtipos T-III, T-III/IV, T-IV	92
Figura 7.23.	Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da sobrevida livre de eventos (SLE) de acordo com o status do <i>NOTCH1</i> , <i>FBXW7</i> e <i>STIL-TAL1</i>	94
Figura 7.24.	Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da sobrevida livre de eventos (SLE) de acordo com combinações do status do <i>NOTCH1</i> e <i>FBXW7</i>	95
Figura 7.25.	Curvas de Kaplan Meier mostrando SLE de acordo com associações das alterações moleculares	96

## LISTA DE QUADROS

Quadro 6.1.	Painel de anticorpos utilizados na caracterização das LLA-T	35
Quadro 6.2.	Marcadores utilizados para a classificação dos subtipos maturativos com base na classificação EGIL	39
Quadro 6.3	Sistema de pontuação da Classificação EGIL para definição de leucemia aguda bifenotípica	39
Quadro 6.4	Sistema de pontuação baseado na porcentagem de células positivas de 11 marcadores para identificação de LLA-ETP	40
Quadro 7.2	Marcadores celulares mielóides, de células tronco hematopoéticas e T nas Leucemias Agudas Bifenotípicas de Fenótipo Mielóide T	54

## ABREVIATURAS

- AcMo: anticorpos monoclonais
- Asp : aspartato
- APC: alofocianina
- MPO: mieloperoxidase
- BAL: leucemias agudas bifenotípicas
- BCL11B: *B cell Lymphoma 11B* ou *CTIP2*
- bHLH: base helix-loop-helix
- CD : *cluster of differentiation* (grupamentos de diferenciação)
- cdk : ciclina dependente de kinase
- cCD3: CD3 intracitoplasmático
- cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar
- CN: controle negativo
- CM: células mononucleares
- CFM: citometria de fluxo multiparamétrica
- CpB: célula precursora B
- DIT: duplicações *in tandem*
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DN: duplo negativo
- DP: duplo positivo
- dNTP: desoxinucleotídeos
- DTK : domínio tirosina quinase
- EGIL: *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (Grupo europeu para caracterização imunológica das leucemias agudas)
- ETP: *early thymic precursor* (precursor tímico precoce)
- FITC: isotiocianato de fluoresceína
- FLT3: *FMS-like Tyrosine kinase-3*
- GAPDH: gliceraldeído -3- fosfato desidrogenase
- HD: *heterodimerization domain* (domínio de heterodimerização)
- HLA-DR: *human leucocitary antigen-DR* (antígeno leucocitário humano-DR)
- HOX11:*TLX1 (T cell leukemia homeobox 1)*
- HOX11L2: *TLX3 (T cell leukemia homeobox 3)*
- ISP: imaturo simples positivo

ICN: *intracellular domain of NOTCH1* (domínio intracelular do *NOTCH1*)  
Ile: isoleucina  
IL: interleucina  
IL-7R $\alpha$ : cadeia alfa do receptor de Interleucina-7  
IMF: intensidade mediana de fluorescência  
LABM/T: leucemia aguda bifenotípica mielóide T  
LAFM: leucemia aguda de fenótipo misto  
LDB-1: *lim domain binding protein-1*  
Lin: linhagem  
LLB-T: linfoma linfoblástico de células-T  
LLA: leucemia linfoblástica aguda  
LLA-ETP: LLA de células precursoras-T precoces  
LMA: leucemia mielóide aguda  
LMO1: *LIM domain only 1*  
LMO2: *LIM domain only 2*  
LYL1: *Lymphoblastic Leukemia Associated Hematopoiesis Regulator 1*  
m: membrana  
M: mielóide  
MHC: complexo principal de histocompatibilidade  
MO: medula óssea  
Neg: negativo  
Mut: mutado  
NCI: *National Cancer Institute*  
NK: *natural killer*  
PBS: tampão fosfato  
PE: ficoeritrina  
PerCP: proteína piridina de clorofila  
Pos: positivo  
PMLP: progenitor linfóide multipotente  
RAG: *recombinase activating gene* (recombinase ativadora de genes)  
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa  
SCL: *steam cell leukemia*  
SG: sobrevida global

SLE: sobrevida livre de eventos

*SIL: SCL interrupting locus*

SFB: soro fetal bovino

SP: sangue periférico

SP: simples positivo

Sp1: *specificity protein1*

SSC: *side scatter*

FSC: *forward scatter*

TA: temperatura ambiente

TAD : *transactivation domain* (domínio de transativação)

*TAL1 : T-cell acute lymphocytic leukemia-derived sequence-1*

TdT: desoxinucleotidil-transferase terminal

TCR: *T-cell receptor* (receptor de célula-T)

WHO: *World Health Organization* (Organização mundial de saúde)

WT: *wild-type* (Selvagem)

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Leucemias agudas: aspectos gerais

As leucemias agudas são as neoplasias mais incidentes na infância (LINABERY; ROSS, 2008; DE CAMARGO, *et al.*, 2010) e compreendem um grupo heterogêneo de doenças malignas do sistema hematopoiético, caracterizadas pela expansão clonal de células precursoras indiferenciadas ou progenitoras mais maduras. Estas células imaturas malignas que proliferam na medula óssea podendo infiltrar o sangue periférico e outros tecidos são denominadas blastos e são originadas como consequência de anormalidades em genes que controlam os mecanismos naturais de proliferação, diferenciação/maturação e/ou apoptose (OLIVEIRA; POLINETO, 2004).

As causas da ocorrência da leucemia na infância ainda são enigmáticas, porém existem alguns fatores etiológicos postulados que podem estar associados com a leucemogênese, dentre eles podemos citar a exposição à radiação ionizante, a pesticidas, uso de drogas durante a gravidez, susceptibilidade genética e infecções (GREAVES M, 2006).

A patofisiologia das leucemias agudas e seus sinais e sintomas clínicos podem ser explicados pela supressão da hematopoese normal devido à proliferação dos blastos na medula óssea e expansão para outros órgãos. Os sintomas mais comuns incluem dores ósseas e nas articulações, febre (em decorrência da neutropenia), fraqueza, falta de ar, palidez (em decorrência da anemia), sangramentos e hemorragias (em decorrência da trombocitopenia). Os órgãos extramedulares comumente atingidos, além das células blásticas leucêmicas no sangue periférico, são baço, timo, fígado e linfonodos e ainda com menor frequência o acometimento do sistema nervoso central e testículos. (ONCIU, 2009; BOMKEN; VOORMOR, 2009). As anormalidades laboratoriais mais comuns incluem anemia, neutropenia, trombocitopenia e leucopenia ou leucocitose com hiperleucocitose ( $>100 \times 10^9/L$ ) presente em aproximadamente 15% dos pacientes pediátricos (PUI, 2006; ONCIU, 2009).

De um modo geral, de acordo com a linhagem hematopoiética envolvida, as leucemias agudas podem ser classificadas em dois grandes grupos, como leucemia linfoblástica aguda (LLA) ou Leucemia mielóide aguda (LMA). As LLA e LMA são então subdivididas e caracterizadas biologicamente pela proliferação descontrolada de células linfóides imaturas (B ou T) ou de linhagem mielóide, respectivamente. Em crianças, as LLA são mais incidentes do que as LMA. As LLA de células precursoras B (LLA-cpB) representam aproximadamente 80%

dos casos de LLA, enquanto as leucemias de células T (LLA-T) representam 10-15%. Além disso as LLA acometem principalmente crianças do sexo masculino (LINABERY; ROSS, 2008).

Existe ainda um tipo mais raro de leucemia aguda, originadas de uma célula precursora com potencial de diferenciação tanto da linhagem linfóide quanto mielóide que representam cerca de 5% dos casos e são difíceis de classificar devido à co-expressão em uma mesma célula, de antígenos mielóides e linfóides, sendo por essa razão designados de leucemias agudas de linhagem mista, híbrida ou leucemia bifenotípica aguda (MATUTES *et al.*, 1997).

As células leucêmicas de pacientes com LLA podem expressar várias combinações de antígenos que são normalmente expressos em precursores de linfócitos em determinados estágio de maturação. Os fenótipos associados à leucemia podem ser identificados devido à coexpressão de marcadores que raramente ou nunca aparecem simultaneamente na diferenciação hematopoiética normal (HRUSAK; PORWIT-MACDONALD, 2002). Assim a natureza clonal das células pode ser identificada pela expressão de fenótipos aberrantes, ou seja, a expressão anormal desses antígenos (expressão de antígenos de outra linhagem celular, expressão antigênica com assincronismo, maior ou ausência de expressão), que claramente se diferenciam da expressão das células normais. Estes fenótipos aberrantes podem refletir o padrão de expressão gênica desregulado e estar correlacionado com anormalidades genéticas (HRUSAK; PORWIT-MACDONALD, 2002; ORFAO, 2006).

Além das variações de imunofenótipo, muitos subtipos de LLA são caracterizados por diversas alterações genéticas em células progenitoras hematopoiéticas que são comprometidas com as linhagens de células B ou T e alteram vias fundamentais do desenvolvimento celular, que incluem o desenvolvimento hematopoiético, sinalização ou proliferação e regulação epigenética. Estas alterações levam à parada maturativa em estágios específicos de desenvolvimento. E em alguns casos a primeira alteração pode surgir em uma célula tronco hematopoiética com capacidade de desenvolver-se em várias linhagens. O desafio é entender a interação entre essas alterações e como as vias que elas afetam interferem na proliferação, diferenciação e sobrevivência de células progenitoras linfóides que levam à leucemia (PUI; ROBISON, LOOK, 2008).

O perfil detalhado de alterações submicroscópicas e a análise mutacional têm refinado a classificação das leucemias, com a identificação de alterações genéticas que coexistem e cooperam com alterações cromossômicas na leucemogênese (PUI *et al.*, 2012). Assim novos

subtipos de LLA com importância no prognóstico podem ser identificados por seu perfil imunomolecular distinto.

## **1.2. Fatores prognósticos e estratificação de risco**

Os principais critérios de estratificação de risco utilizados como base para a maioria dos protocolos seguem os critérios do *National Cancer Institute* (NCI). Estes critérios são baseados na idade e leucometria ao diagnóstico do paciente, onde os pacientes de risco padrão possuem idade entre 1-9 anos e a contagem de leucócito menor que  $50 \times 10^9/L$  e pacientes de alto risco possuem idade maior ou igual a 10 anos e leucometria maior ou igual a  $50 \times 10^9/L$  (SMITH *et al.*,1996). Afim de evitar uma maior intensidade de tratamento, reduzir efeitos adversos em pacientes com grandes chances de cura, modernos protocolos de tratamento empregam o sistema de estratificação de risco para alocar pacientes em braços de tratamento de diferente intensidade.

Porém a categoria de risco dos pacientes pode ser modificada por fatores prognósticos mais refinados além dos critérios de idade e leucometria. Diversos estudos clínicos tem identificado algumas características preditoras de prognóstico como imunofenótipo, presença/ausência de leucemia testicular ou no sistema nervoso central, presença/ausência de lesões genéticas (como exemplo de bom prognóstico: a fusão *ETV6-RUNX1*, hiperdiploidia; como exemplo de mau prognóstico: rearranjo do gene *KMT2A (MLL)*, hipodiploidia, amplificação intracromossomal do cromossomo 21, a fusão BCR-ABL, além da resposta inicial ao tratamento que é avaliada pela maioria dos grupos pela detecção da doença residual mínima em etapas específicas determinados a partir do início do tratamento (HUNGER, *et al.*, 2013). Contudo muitos desses critérios de risco são aplicados principalmente para as LLA-cpB e tem pouco valor prognóstico nas LLA-T (PUI, ROBSON, LOOK, 2008).

## **1.3. Leucemia linfoblástica aguda de células-T (LLA-T)**

As LLA-T representam uma proliferação maligna com parada maturativa em diferentes estágios iniciais do desenvolvimento das células-T. Acometem aproximadamente 15% dos casos das LLA na infância e 25% dos casos em adultos. Os pacientes usualmente apresentam uma alta contagem de leucócitos, podem apresentar organomegalia, particularmente o alargamento de mediastino e o envolvimento do sistema nervoso central

(CHIARETTI; FOÁ, 2009). Crianças com LLA-T possuem um médio a elevado risco de recaída e em comparação aos pacientes com LLA-cpB possuem um pior prognóstico. A recorrência da leucemia é a principal causa de falha do tratamento nas LLAs-T e a maioria delas ocorrem durante ou imediatamente após o término do tratamento (JEHA; PUI, 2009; PIETERS; CARROL, 2010; SZCZEPÁNSKI *et al.*, 2011). Em crianças e adolescentes (idade inferior a 19 anos) as neoplasias linfoblásticas de células precursoras T podem ainda ser classificadas, além da LLA-T, como linfoma linfoblástico de células-T (LLB-T), que são doenças neoplásicas biologicamente similares derivadas de células linfóides imaturas de linhagem T (PATEL *et al.*, 2012). No geral o critério utilizado para distinguir entre leucemia e linfoma é baseado na extensão de comprometimento da medula óssea (MO): pacientes com menos de 25% de blastos na MO e sem blastos no sangue periférico (SP) são diagnosticados como LLB-T, e em caso de 25% ou mais de blastos na medula óssea pacientes são diagnosticados como LLA-T. Ambas as doenças possuem características comuns, como aspectos clínicos: alargamento de mediastino, mediana de idade ao diagnóstico e respondem a quimioterapia para LLA, além do perfil imunofenotípico e morfologia dos linfoblastos. O Grupo de Estudo Internacional de Linfomas e a Organização Mundial de Saúde (OMS) designam ambas malignidades como Leucemia/linfoma linfoblástico T (HARRIS *et al.*, 1994; BOROWITZ; CHAN, 2008; BURKHARDT, 2009).

#### **1.4. Ontogenia de células-T**

As células-T assim como as diversas células do sistema hematopoiético são derivadas de células tronco pluripotentes. A progênie da célula tronco migra de órgão primários como o fígado fetal ou medula óssea e entram no timo através da vênula pós-capilar localizada próximo a região cortico-medular onde irão se desenvolver em célula-T (Figura 1.1). O processo de desenvolvimento e diferenciação dos timócitos, desde a entrada da célula precursora no timo, migração dentro do órgão até a sua saída como células maduras, é controlado por diversos processos, onde há interação com diferentes componentes do microambiente. Como exemplo, interação direta célula-célula, assim como a matriz extracelular e moléculas solúveis, como citocinas, quimiocinas, esfingolipídios e hormônios. Além disso, durante o processo de diferenciação da célula-T, os progenitores passam por diferentes estágios celulares que podem ser discriminados com base na expressão de marcadores presentes na superfície celular e no citoplasma até a seleção final de todos os subtipos de células-T que compõem a constelação de

tráfego de células do sistema imune (SPITS *et al.*, 1998; SAVINO *et al.*, 2004; SAVINO *et al.*, 2016).

Os mais imaturos progenitores tímicos vindos da medula óssea (*Early T cell precursor* - ETP) estão presentes no subconjunto de células denominado de duplo-negativo (DN) 1, assim chamados devido à ausência de expressão dos co-receptores CD4 e CD8. Em murinos apresentam o fenótipo com baixos níveis de marcadores de linhagem ( $\text{Lin}^-$ ), alta expressão do receptor de crescimento de células tronco, KIT ( $\text{CD117}^+$ ), ausência da expressão da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 ( $\text{CD25}^-$ ) e alta expressão da molécula de adesão  $\text{CD44}^+$  e possuem potencial multi-linhagem, incluindo potencial para o desenvolvimento de células B, T, mielóide e *natural killer* (NK) e células dendríticas (ARDAVIN *et al.*, 1993; BHANDoola; SAMBANDAM, 2006; BEL; BHANDoola, 2008; WADA *et al.*, 2008). O próximo subconjunto de população, denominado de DN2, caracteriza-se pelo fenótipo  $\text{Lin}^- \text{CD117}^+ \text{CD25}^+ \text{CD44}^+$ , perde o potencial para diferenciar-se em célula B, mas mantém o potencial de diferenciação para as células T NK, macrófagos e células dendríticas (WADA *et al.*, 2008). Alguns progenitores com potencial mielóide e T permanecem evidentes ajustando ao estágio DN2, contudo, a maioria das células DN2 tem ausência de potencial mielóide (BELL; BHANDoola, 2008). As células DN2 com altos níveis de expressão de KIT ( $\text{CD117}$ ) são denominadas de DN2a permanecem sem o comprometimento total com a linhagem T enquanto as células DN2 que diminuem a expressão do KIT (DN2b) são completamente comprometidas com a diferenciação T. A progressão para o estágio DN2b não requer o rearranjo do TCR (Receptor de célula-T), mas a progressão tardia além do estágio DN3a ( $\text{Lin}^- \text{CD117}^- \text{CD25}^+ \text{CD44}^-$ ) é completamente dependente. Assim o comprometimento com a linhagem T ocorre antes do estágio DN3a, quando as células diminuem a proliferação, as RAG (*Recombinase activating gene*) começam a ser reguladas positivamente e os rearranjos dos genes do TCR são iniciados. (ROTHENBERG; ZHANG; LI, 2010). No estágio DN3 as células param a proliferação, aumentam o rearranjo do TCR e geram os primeiros lócus de TCR completamente rearranjado. As células-T DN3 que sucedem o rearranjo gênico do TCR se tornam ativadas pela seleção dependente de TCR e são denominadas de DN3b, estas diferenciam-se das células DN3 que ainda não foram selecionadas (DN3a). A expressão da cadeia  $\beta$  do TCR qualifica as células para serem submetidas a seleção  $\beta$  (ROTHENBERG; MOORE; YUI, 2008). A seleção  $\beta$  é o processo pelo qual as células precursoras T com um rearranjo bem sucedido do *locus* do  $\text{TCR}\beta$  são selecionados para continuidade da diferenciação. A cadeia  $\beta$  pareia com uma cadeia pré-cadeia  $\alpha$  chamada de

pT $\alpha$  para formar um pré-receptor de células-T (pré-TCR), assim, o timócito recebe um sinal desse receptor e interrompe os rearranjos dos locos da cadeia  $\gamma$  e  $\delta$  e fica comprometido com a linhagem  $\alpha\beta$ . O receptor pré-TCR que é expresso na superfície celular, formando um complexo com as moléculas CD3 (pré-T: CD3) leva à proliferação celular, à interrupção de rearranjos posteriores da cadeia  $\beta$  e a expressão de CD4 e CD8, se tornando células duplo positivas, e eventualmente podendo adquirir na superfície celular o complexo TCR $\alpha\beta$ . Um rearranjo bem sucedido do locus de cadeia  $\alpha$  é obtido pela maioria dos timócitos em desenvolvimento, assim a maioria das células duplo positivas produzem um receptor de célula-T  $\alpha\beta$  durante sua vida relativamente curta. Estas se preparam então para seleção positiva e negativa para gerar células T TCR $\alpha\beta^+$ , CD4 $^+$  ou CD8 $^+$ . Alternativamente as células DN3 que rearranjam com sucesso as cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  do TCR ao invés da cadeia  $\beta$  são selecionadas como células-T  $\gamma\delta$  (SPITS, 2002; ROTHENBERG; MOORE; YUI, 2008; GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2012). A ordem precisa dos eventos subsequentes não é tão clara, como é para as células-T  $\alpha\beta$ , para as células que seguem a via de diferenciação para a linhagem T  $\gamma\delta$  (ROTHENBERG; ZHANG; LI, 2010). Na Figura 1.1 podemos observar os diversos estágios de diferenciação do precursor de linfócito T no timo.

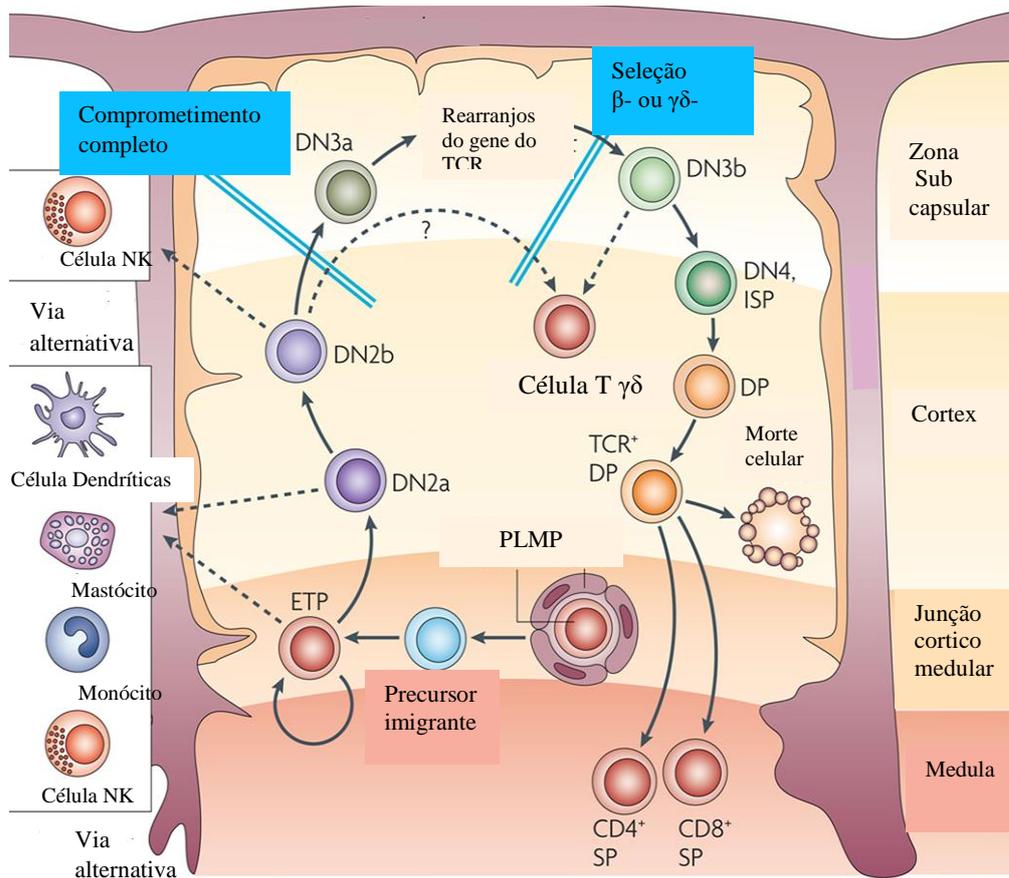


Figura 1.1. Seção transversal em lóbulo tímico mostrando a via de migração do precursor de célula-T durante o desenvolvimento. Linhas pontilhadas mostram vias alternativas de desenvolvimento que ainda são possíveis para ETP e para diferentes subconjuntos de células DN2 (DN2a e DN2b) antes de seu completo comprometimento com a linhagem T (Adaptado de ROTHENBERG; MOORE; LI, 2008). PLMP, progenitor linfóide multipotente; ETP, progenitor tímico precoce; DN, duplo negativo, ISP, imaturo simples positivo; DP, duplo positivo.

Baseando-se no modelo de diferenciação das células-T em murinos podemos entender a diferenciação das células-T em humanos, entretanto com diferenças de alguns marcadores. Os possíveis precursores de células-T da medula óssea de humano expressam o CD34 que é um marcador encontrado em células tronco hematopoiéticas e na maioria dos progenitores das células humanas. O marcador de linhagem T CD7 aparece em células da medula óssea e no fígado fetal, que também expressam o CD34, contudo muitas dessas células podem desenvolver-se em células NK e células dendríticas (BARCENA *et al.*, 1993), desta forma

considera-se que os primeiros precursores das células-T são CD34<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup> que na sua maioria expressam o CD3 intracitoplasmático (cCD3), indicando comprometimento com a linhagem T. Assim o cCD3 representa o primeiro marcador que indica o comprometimento para a linhagem T, e será posteriormente utilizado para trazer o TCR rearranjado para a superfície da célula-T. Este estágio inicial é denominado de pró-T (SHORTMAN; WU, 1996; BENÉ, 2005). Observa-se ainda que existe uma expressão diminuída do CD38 nos estágios mais imaturos e que vai aumentando nos próximos estágios de desenvolvimento (SPITS *et al.*, 1998) e por fim desaparece nos estágios maduros. O CD2 pode estar presente nos precursores iniciais embora em baixos níveis, assim como o CD5. O próximo estágio, denominado de pré-T, será caracterizado por um padrão mais completo de marcadores de superfície de célula-T, onde além da expressão do CD7 há também a expressão do CD2 e CD5 (SHOTMAN; WU, 1996). Em estágio mais diferenciado CD1a é expresso e então os timócitos alcançam a região do córtex do timo, e é nesta fase que os genes do TCR começam a rearranjar-se, esta fase é conhecida como T-cortical. Somente as células com um rearranjo perfeito irão continuar no processo de maturação. Então as células irão primeiro coexpressar o CD4 e CD8, e serão submetidas a seleção positiva. Desta forma, durante o processo de diferenciação, as células têm a expressão do TCR aumentada, perdem a expressão do CD1a e passam a ser simples positiva para CD4 ou CD8, que permitem através do reconhecimento do MHC de classe II ou classe I, decidir o destino das células T. As células-T que passarem pela seleção tímica positiva e negativa com sucesso, irão então alcançar os órgãos linfóide secundários periféricos (BÉNÉ, 2005, TAGHON; WAEGEMANS; VAN DEV WALLE, 2012).

### **1.5. Classificação dos subtipos maturativos e valor prognóstico**

A imunofenotipagem das células leucêmicas parece refletir estágios sequenciais da ontogenia inicial dos linfócitos. (GREAVES, 1981). Baseado na diferenciação normal dos linfócitos, em 1995 o Grupo Europeu de Estudos (EGIL- *European Group of Immunological Characterization of Leukemias*) propôs uma classificação imunológica das leucemias agudas de células T e B que as pormenoriza em seus vários estágios de diferenciação (BÉNÉ *et al.*, 1995). Esta classificação é amplamente aceita e vem sendo aplicada uniformemente ao longo dos anos na prática clínica.

A LLA-T podem ser classificadas em quatro grupos, baseando-se na expressão do CD1a, CD2, CD5, CD7, CD8, CD3 na membrana da célula. A LLA-T mais imaturas são

denominadas pela classificação EGIL de T-I (pró-T), são o subtipo mais raros e são caracterizadas pela ausência de todos os marcadores de linhagem T que se apresentam em estágios mais maduros, sendo expresso neste subtipo apenas o CD3 intracitoplasmático (cCD3) e o CD7. O subtipo T-II (pré-T) poderá expressar além do cCD3 e CD7, o CD2 e/ou CD5 e/ou CD8, com ausência do CD3 em membrana (mCD3) e CD1a. A LLA-T classificadas como T-III (T-cortical) são o subtipo de maior frequência, são caracterizadas principalmente pela presença do CD1a e são frequentemente positivas para CD4 e CD8 e parcialmente para o mCD3. As LLA-T maduras (T-IV) são definidas como negativas para o CD1a e positivas para o mCD3. (BÉNÉ *et al.*, 1995; BÉNÉ, 2005)

Em 2003 foi proposto por ASNAFI *et al.* (2003a) uma classificação baseada na expressão celular dos TCRs e na configuração dos rearranjos gênicos das cadeias dos TCR ( $\delta$ ,  $\gamma$ , e  $\beta$ ). Resumidamente, esta classificação sugere três estágios principais: imaturo (cadeia  $\beta$  intracitoplasmática, mCD3, TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  negativos), pré- $\alpha\beta$  (cadeia  $\beta$  intracitoplasmática positiva, mCD3, TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  negativos), TCR $\alpha\beta$  (mCD3 e TCR $\alpha\beta$  positivo) ou TCR $\gamma\delta$  (mCD3 e TCR  $\gamma\delta$  positivo). Esta classificação baseada no status dos rearranjos do TCR não é utilizada na prática clínica. Embora tanto a classificação EGIL quanto a proposta por ASNAFI *et al.* (2003a) distingam estágios de desenvolvimento de células-T, muito dos casos de LLA-T não tem equivalência em relação a estas duas classificações, por exemplo: pró/pré-T e imaturo, T-cortical e pré- $\alpha\beta$  ou maduro e TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$  (VAN GROTEL *et al.*, 2008; MEIJERINK *et al.*, 2010). Principalmente porque a classificação de ASNAFI *et al.* (2003a) não leva em consideração, a expressão do CD1a como um marcador definidor de subtipos, como é utilizado pela classificação EGIL.

Várias características imunofenotípicas parecem estar associadas ao aumento do risco de falha no tratamento, desta forma o reconhecimento de subgrupos caracterizados imunofenotipicamente pode ter relevância no prognóstico da LLA-T, porém o impacto prognóstico desses fatores difere de acordo com a estratégia de tratamento utilizada. UCKUN *et al.* (1997) identificaram um pequeno grupo de pacientes com imunofenótipo caracterizado como pró-T, que responderam a primeira fase do tratamento (fase de indução) de forma semelhante aos demais subgrupos maturativos, porém apresentou uma sobrevida livre de eventos e a sobrevida global muito menor do que os outros grupos em estágios mais maduros de desenvolvimento. Esta observação de que o fenótipo mais imaturo tem um pior prognóstico ainda permanece válida para estudos mais recentes que utilizam protocolos de tratamentos mais atuais (COUSTH-SMITH *et al.*, 2009; MEIJERINK, 2010). Um marcador imunofenotípico que

tem sido tradicionalmente associado a um excelente prognóstico para LLA-T é o CD1a. Em três estudos multicêntricos com crianças com LLA-T foi constatado que o grupo de pacientes com LLA-T cortical (CD1a<sup>+</sup>) tem uma melhor resposta inicial ao tratamento e uma sobrevida livre de eventos significativamente melhor quando comparados às LLAs-T com fenótipo imaturo ou maduro (LUDWIG *et al.*, 1993; NIEHUES *et al.*, 1999; PULLEN *et al.*, 1999). Em pacientes pediátricos tratados pelo protocolo alemão BFM-2000, o CD1a também foi preditor de bom prognóstico (BREIT *et al.*, 2006). Por outro lado, uma análise retrospectiva de pacientes selecionados de vários protocolos do Grupo Pediátrico de Oncologia Holandês (*Dutch Childhood Oncology Group* – DCOG) não foi encontrada diferença no prognóstico entre pacientes CD1a<sup>+</sup> e CD1a<sup>-</sup> (VAN GROTEL *et al.*, 2006; VAN GROTEL *et al.*, 2008; MEIJERINK, 2010).

### **1.5.1. A expressão dos fenótipos aberrantes nas LLAs-T pediátricas**

As células-T leucêmicas podem ser diferenciadas das células-T normais principalmente pela expressão de marcadores de imaturidade como TdT (terminal desoxinucleotidil-transferase) e CD34, CD1a e a ausência da expressão do CD3 na membrana. O CD45 que é um marcador pan-leucocitário pode também auxiliar na identificação das células leucêmicas pela sua diferença de expressão nessas células, ajudando a discriminar os blastos (intermediária a baixa expressão) dos linfócitos normais (alta expressão do CD45) (CRAIG; FOON, 2008).

Além dos marcadores descritos acima que comumente são expressos nas LLAs-T, podemos citar ainda marcadores de linhagem mielóide como CD117, CD13, CD33, CD15, e ainda marcador de células NK CD56 que foram relatados estar expressos em blastos de LLA-T, principalmente nos estágios mais imaturos (Pró-T) (revisado em BÉNÉ, 2004).

A expressão de marcadores de linhagem mielóide em LLA-T pediátricas tratadas pelo protocolo XI e XII do Hospital Infantil de Pesquisa *Saint Jude* foi vista em 20% dos casos, porém essa expressão não foi associada há um pior prognóstico (PUI *et al.*, 1990). Da mesma forma, pacientes pediátricos tratados pelo protocolo do *Children's Cancer Group (CCG)*, que expressaram os marcadores mielóides CD13 ou CD33, obtiveram uma resposta inicial ao tratamento, assim como a sobrevida livre de eventos similar aos pacientes sem a expressão desses marcadores (UCKUN *et al.*, 1998).

Cabe ressaltar que os estudos realizados que correlacionam a expressão de marcadores mielóides em LLA-T pediátricas e prognóstico não estratificaram a expressão dos marcadores mielóide de acordo com os subtipos maturativos. Embora sejam mais frequentes nos subtipos mais imaturos, a expressão desses marcadores também pode ser vista nos subtipos mais maduros. Em estudo realizado em adultos com LLA-T, foi observada a expressão do CD13 em subgrupos maturativos tidos como bom prognóstico (LLA-T cortical/madura), estes por sua vez apresentaram uma sobrevida significativamente menor do que os pacientes com esses perfis maturativos sem a expressão do CD13 (VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2013).

### **1.5.2. Leucemia de células precursoras T precoces-LLA-ETP (*Early T cell precursor acute lymphoblastic leucemia*)**

A expressão de fenótipos aberrantes de linhagem mielóide e/ou marcadores de imaturidade nas LLAs-T é utilizada para auxiliar na identificação de um subgrupo de LLA-T que foi denominada de *early T cell acute lymphoblastic leukemia* (LLA-ETP) e que representam de 5 a 15% dos casos de LLA-T. Os casos de LLA-ETP parecem refletir o perfil das células mais precoces que migram da medula óssea para o timo.

Coustan-Smith *et al.* (2009) analisaram o perfil de expressão gênica de 55 casos de LLA-T, utilizando um conjunto de genes que demonstram ser diferencialmente expresso em células-T precoces - ETP (*early T cell precursor*) e um outro conjunto de genes expressos em subpopulações tímicas mais maduras para as devidas comparações, assim, identificaram 13 casos com o perfil de expressão gênica que se assemelhavam ao descrito para ETP. Ao avaliarem o perfil imunofenotípico dos 13 casos, observaram que 9 casos apresentaram um perfil imunofenotípico imaturo característico, com ausência de expressão do CD8 e CD1a (< 5% de linfoblastos positivos), fraca expressão do CD5 (< 75% de linfoblastos positivos) e a expressão de um ou mais dos seguintes marcadores de células troncos ou marcadores mielóides em pelo menos 25% dos linfoblastos: CD117, CD34, antígeno do leucócito humano - HLA-DR, CD13, CD33, CD11b ou CD65. Os quatro outros casos que apresentaram o perfil gênico de ETP tiveram algumas características imunofenotípicas diferentes: três tinham expressão do CD5 (com um caso com ausência de marcador mielóide ou marcador de célula tronco) e um outro caso apresentou alta expressão do CD3 de membrana e a expressão do TCR  $\gamma\delta$ . O perfil imunofenotípico característico com ausência de CD1a, CD8, fraca expressão do CD5 e a presença de marcadores mielóides ou de célula tronco foi utilizado para a validação dos

resultados em outra coorte independente. Os autores chegaram à conclusão que os pacientes com este perfil imunofenotípico apresentavam um alto risco de recaída, resposta inicial ruim a prednisona, falha na remissão e taxas de sobrevida menores.

Posteriormente outros trabalhos também confirmaram o pior prognóstico desse subtipo de leucemia (MA *et al.*, 2012; ALLEN *et al.*, 2013; CHOPRA *et al.*, 2013), contudo um estudo realizado com crianças e adultos jovens (até 25 anos) tratados pelo protocolo do *Medical Research Council UK ALL 2003* não encontrou diferenças nos casos classificados como LLA-ETP, em relação a sobrevida livre de eventos, sobrevida global e taxas de recaídas, quando comparados com as LLA-T típicas (PATRICK *et al.*, 2014).

Cabe ressaltar que uma outra proposta de classificação através do perfil imunofenotípico foi proposta por Inukai *et al.* (2011). Neste trabalho os autores propuseram que a identificação da LLA-ETP seria melhor caracterizada por um sistema de pontuação, que levasse em considerações outros marcadores presentes nas LLAs-T que não foram abordados no estudo inicial de identificação das LLA-ETP proposto por Coustan-Smith *et al.* (2009).

Esse sistema de pontuação foi comparado ao perfil imunofenotípico proposto por Coustan-Smith *et al.* (2009) para identificação das LLA-ETP e testado na coorte de pacientes avaliados por estes autores. Observaram que o sistema de pontuação proposto tinha uma especificidade de 100% e sensibilidade de 94,1% enquanto o perfil proposto por Coustan-Smith *et al.* (2009) possuía especificidade de 100% e sensibilidade de 76,5% na identificação dos casos de LLA-T com o perfil de expressão gênica semelhantes as ETP. Os pacientes caracterizados por esse sistema de pontuação apresentaram uma pior resposta ao tratamento inicial na fase de indução, e ainda uma sobrevida livre de eventos significativamente menor (INUKAI *et al.*, 2011).

O sequenciamento do genoma inteiro dos casos caracterizados como LLA-ETP demonstrou que as alterações moleculares encontradas nesse subtipo eram comuns as alterações encontradas em LMA, e o perfil transcricional dos blastos era semelhante ao perfil das células tronco hematopoiéticas normais e precursores de granulócitos e macrófagos. As mutações frequentemente acometiam genes envolvidos na regulação e desenvolvimento das células hematopoiéticas (*GATA3*, *ETV6*, *RUNX1*, *IKZF1* e *EP300*), receptores de citocina e via de sinalização do RAS (*NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *IL7R*, *JAK3*, *JAK1*, *SH2B3* e *BRAF*), e em genes modificadores de histona (*EZH2*, *EED*, *SUZ12*, *SETD2* e *EP300*). Por outro lado, mutações ativadoras no gene *NOTCH1*, frequentemente mutado nas LLA-T, são de baixa prevalência nesse subtipo (ZHANG *et al.*, 2012). Esses achados sugerem que novos regimes de

quimioterapia, talvez incluindo drogas ativas em tumores mielóides, validadas em modelos animais relevantes são urgentemente necessárias para o tratamento da LLA-ETP de alto risco. E ainda, terapias alvos podem ser avaliadas num futuro próximo para aquelas leucemias que possuem mutações ativadoras em genes como *FLT3*, *JAK1*, *JAK3*, *IL7R* e *NOTCH1*. (HAYDU; FERRANDO, 2013).

### **1.5.3. Leucemia bifenotípica ou Leucemia aguda de fenótipo misto**

Ao se discutir sobre fenótipos aberrantes em LLA-T e as LLA-ETP, não podemos deixar de citar os casos de leucemias agudas bifenotípicas (LAB) que podem ter semelhanças com a LLA-ETP recentemente descrita. As LAB foram inicialmente definidas como um tipo raro de leucemia aguda com um surgimento provável em uma célula progenitora multipotente com a capacidade de se diferenciar ao longo de ambas as linhagens mielóide e linfóide (SACAMURRA *et al.*, 1983).

O sistema de pontuação proposto pela classificação EGIL em 1995 (BÉNÉ *et al.*, 1995) permitiu uma melhor definição das LAB claramente distinguindo-as das clássicas leucemias agudas que expressam aberrantemente um ou dois marcadores de outra linhagem. Na classificação EGIL, os antígenos são categorizados de acordo com sua especificidade para uma dada linhagem e à sua expressão são atribuídos pontos. Casos de leucemias agudas, cujo imunofenótipo some pontuação superior a dois pontos para linhagem mielóide e a um ponto para linhagem linfóide são enquadrados como bifenotípica.

Na mais recente publicação sobre a classificação de tumores hematopoiéticos e tecidos linfóides da Organização Mundial de Saúde (BOROWITZ; CHAN, 2008), as leucemias agudas onde os blastos exibiam características de mais de uma linhagem foi revisada, e a leucemia aguda bifenotípica então passou a ser denominada de leucemia aguda de fenótipo misto (LAFM). Esta leucemia foi dividida de acordo com as linhagens envolvidas como: B/mielóide ou T/mielóide, que são os tipos mais frequentes, ou mais raramente tripla linhagem B/T/Mielóide ou B/T (BOROWITZ *et al.*, 2008).

Para serem enquadradas nessa classificação os principais antígenos de diferenciação, das três linhagens, foram mantidos para auxiliar na identificação. A associação com a linhagem mielóide é definida pela expressão da mieloperoxidase (MPO) ou células que mostram uma diferenciação monocítica, confirmada pela expressão de pelo menos dois dos antígenos associados a monócitos: CD11c, CD14, CD64, lisozima e ou atividade da esterase não

específica demonstrada por citoquímica. A associação com a linhagem T é caracterizada pela expressão citoplasmática da cadeia épsilon do CD3 ou na membrana (mais rara). A associação com a linhagem B requer a expressão de vários marcadores. A forte expressão do CD19 deve ser concomitante com pelo menos um dos seguintes marcadores: expressão no citoplasma ou membrana do CD79a, CD22 e/ou expressão na membrana do CD10. Se a expressão do CD19 for fraca, dois dos marcadores citados devem estar expressos para confirmar a associação com a linhagem B (BOROWITZ, M *et al.*, 2008; BÉNÉ; PORWIT, 2012).

Na prática clínica não há um consenso no direcionamento de tratamento, se linfóide ou mielóide, para os pacientes com LAFM. Poucos relatos existem na literatura que correlacionam o prognóstico dos pacientes com LAFM, devido à raridade dos casos esta avaliação se torna difícil. MATUTES *et al.* (2011) em estudo com adultos e crianças mostrou que a média de sobrevida desses pacientes foi de 18 meses, e em cinco anos apenas 37% dos pacientes permaneciam vivos. Além disso, a presença da translocação *BCR-ABL*, a terapia direcionada para LMA, e a idade adulta foram preditores de pior prognóstico. Em um estudo realizado apenas com crianças com LAFM foi observada uma menor sobrevida livre de eventos em paciente tratados como LMA do que os casos tratados como LLA. Além disso, entre os pacientes tratados como LLA, os pacientes com LAFM apresentaram um pior prognóstico comparado aos pacientes que receberam o mesmo tratamento e não tinham o fenótipo misto, essa diferença foi mais acentuada nos casos tratados como LLA-cpB. O prognóstico de casos tratados como LLA-T não foi possível avaliar devido ao reduzido número de casos (MEJSTRÍKOVÁ *et al.*, 2010).

### **1.6. Alterações genômicas-moleculares das LLAs-T pediátricas**

As análises moleculares das LLAs-T têm identificado um grande número de alterações genômicas somáticas indicando que a LLA-T é uma doença complexa. A transformação das células-T é um processo resultante de múltiplas etapas em que diferentes alterações genéticas cooperam para alterar o mecanismo normal de controle do crescimento celular, proliferação, sobrevivência, e diferenciação durante etapas cruciais no desenvolvimento de timócitos (VAN VLIERBERGHE; FERRANDO, 2012).

Dentre as várias alterações genéticas podemos citar os rearranjos e translocações cromossômicas que resultam muitas vezes na expressão aberrante de diversos fatores de transcrição, mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Essas alterações

podem muitas vezes estarem ligadas à parada em distintos estágios de desenvolvimento das células-T (FERRANDO *et al.*, 2002).

As translocações cromossômicas que ocorrem na LLA-T, em 35% dos casos há o envolvimento do locus do TCR e provavelmente ocorrem nos estágios de diferenciação em que há o rearranjo V(D)J do TCR. Durante o rearranjo do TCR, outros locus genéticos podem apresentar-se com uma configuração de cromatina aberta, assim podem estar suscetíveis a atividade das enzimas recombinases ativadoras de genes - RAG1 e RAG2. Esta recombinação ilegítima dos genes do TCR leva a uma expressão gênica aberrante dando origem a células-T com uma desregulação do ciclo celular, proliferação e diferenciação. Estas translocações promovem a justaposição do promotor dos genes do TCR com genes que codificam fatores de transcrição, que passam assim, a ter sua transcrição controlada pelos promotores do TCR (AIFANTIS; RAETZ; BUONAMICI, 2008).

Alguns exemplos de fatores de transcrição que participam das translocações com os genes do TCR são: MYC, *TAL1* (*T-cell acute lymphocytic leukemia-derived sequence-1*, também conhecido como *Stem Cell Leukemia SCL*), *LYL1* (*Lymphoblastic leukemia-derived sequence 1*) e *HOX11* (*Homeobox-11*, também conhecido como *TLX1*), *HOX11L2* (também conhecido com *TLX3*), *LMO1* (*LIM - domain only*) e *LMO2*. Estas translocações são normalmente associadas com outras anormalidades cromossômicas (exemplos: *KMT2A-MLL1* (conhecido como *MLL-ENL*), *NUP214-ABL1*, *PICALM-MLL10* (conhecido como *CALM-AF10*), *BCL11B-TLX3* e o rearranjo *STIL-TAL1*) (GRABHER; BOEHMER; LOOK, 2006), além de mutações pontuais ou inserções/deleções ou superexpressão de oncogenes, sugerindo que múltiplas vias têm que ser alteradas para indução e progressão da leucemia (GRABHER; BOEHMER; LOOK, 2006; AIFANTIS; RAETZ; BUONAMICI, 2008). Algumas dessas alterações, que são alvos desse estudo, serão discutidos mais detalhadamente.

### **1.6.1. Alterações do *NOTCH1* e *FBXW7***

O *NOTCH1* codifica um receptor pertencente a uma família que incluem 4 receptores (NOCTH 1-4). A sua via regula vários programas celulares que incluem a diferenciação, proliferação e apoptose e tem papel crítico no desenvolvimento da célula-T, sendo importante no comprometimento de progenitores pluripotentes com a linhagem T e o desenvolvimento normal da célula, regulando o comprometimento com as linhagens TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  e CD4 ou CD8 (ROBEY *et al.*, 1996; DEFTOS *et al.*, 2000; TAGHON; WAEGEMANS; VAN

DEVWALLE, 2012). O NOTCH1 é um receptor transmembrana, que possui uma estrutura composta por uma porção extracelular contendo 36 estruturas repetidas denominadas de fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor like repeat – EGF*), e uma porção rica em cisteína que possui três estruturas repetidas denominadas *Lin12/Notch repeats* (LNRs), e uma região transmembrana denominada de domínio heterodímero (*heterodimerization domain-HD*). O domínio LNR juntamente com o HD formam uma região reguladora negativa (NRR) que bloqueia a clivagem proteolítica pela metaloproteinase na ausência da interação ligante-receptor (GORDON *et al.*, 2007). A porção intracelular do NOCHT1 (ICN1) é composta por: região chamada de domínio RAM (TAMURA *et al.*, 1995), domínio *ankirin repeat* composto por sete subunidades repetidas (LUBMAN; KOROLEV; KOPAN, 2004), um domínio de ativação transcricional (*Transcriptional activation domain - TAD*) e o domínio C-terminal denominado de PEST (Domínio rico em prolina, ácido glutamina, serina e treonina) que é importante para ubiquitinação e estabilidade da proteína, regulando a renovação (*turnover*) da porção intracelular do receptor (KUROOKA; KURODA K; HONJO, 1998). A estrutura geral do NOTCH1 pode ser visualizada na Figura 1.2.

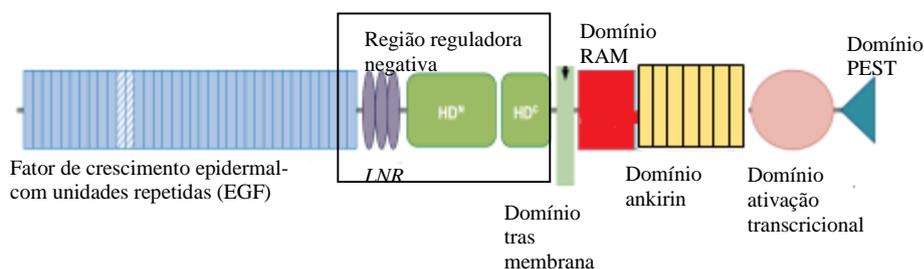


Figura 1.2. Estrutura do receptor NOTCH1. Estrutura composta por uma porção extracelular contendo 36 estruturas repetidas (EGF), e uma região com três estruturas repetidas (LNRs) (em lilás), e uma região transmembrana chamada HD (em verde). Região reguladora Negativa composta pelo HD e o domínio LNR. A porção intracelular do NOCHT1 composta por domínio RAM (vermelho), domínio *ankirin* (amarelo) composto por sete subunidades repetidas, um domínio de ativação transcricional (TAD) e o domínio C-terminal denominado de PEST (Fonte: ASTER; PEAR; STEPHEN, 2008).

A porção extracelular o NOTCH1 contendo a região EGF é responsável pela interação com os ligantes do NOTCH1 (*Delta-like1-4, Jagged1-2*) presentes em células vizinhas no timo. A interação com o ligante inicia uma série de eventos de clivagens proteolíticas. A primeira

clivagem acontece na porção extracelular do NOTCH1 e é catalisada por uma proteína da família das metaloproteinase chamada de família ADAM (Família das desintegrinas e metaloproteinase). A segunda clivagem acontece na porção intracelular do NOTCH1 e é orquestrada pelo complexo  $\gamma$ -secretase. Esses dois eventos proteolíticos liberam a porção intracelular do NOTCH1 da membrana celular e, como o NOTCH1 possui duas sequências de localização nuclear, ele é translocado para o núcleo. No núcleo a porção intracelular do NOTCH1 associa-se ao repressor transcricional CSL (CBF1/supressor *de hairless/Lag1*). Essa interação promove o recrutamento de proteínas co-ativadoras, como a MAML1 (*mastermind-like1*) e a histona acetilase p300, resultando na transcrição de diversos genes alvos do NOTCH1. (AIFANTIS; RAETZ; BUONAMICI, 2008). Dentre os mais bem caracterizados genes alvos da via do NOTCH1 podemos citar o *c-Myc* (WENG *et al.*, 2006), *Deltex*, *PreT $\alpha$* , *Hes1* (DEFTOS *et al.*, 2000), além do receptor de IL-7 (*IL-7R $\alpha$* ) (GONZÁLES-GARCÍA, *et al.*, 2009) que será abordado posteriormente. E entre as mais importantes cascatas de sinalização ativada via NOTCH1 podemos citar a via PI(3)Kinase/Akt/mTOR (HALES; TAUB; MATHERLY, 2014).

A ativação transcricional do NOTCH1 é finalizada pela fosforilação do domínio PEST pela ciclina C: cdk8, essa fosforilação irá promover a ligação da proteína FBXW7 à região mais distal do domínio PEST que irá ubiquitinar e promover a degradação proteolítica da porção intracelular do NOTCH1 pelo proteossoma. O FBXW7 é uma enzima do tipo ubiquitina ligase que faz parte do complexo proteico denominado de SCF (*SKP1-Cullin1-F-box*) que tem como alvo vários proto-oncogenes, como c-MYC, c-JUN, ciclina E além do NOTCH1 (THOMPSON *et al.*, 2007; DEMAREST *et al.*, 2008). A estrutura da proteína FBXW7 é composta por uma região denominada de F-box e um outro domínio denominada de WD40 que possui 7 subunidade repetidas. O FBXW7 reconhece seus substratos através de uma pequena região conservada no domínio WD40, que possui três resíduos conservados de Arginina (ARG<sup>465</sup>, ARG<sup>479</sup>, ARG<sup>505</sup>) (Figura1.3) (AIFANTIS; RAETZ; BUONAMICI, 2008).

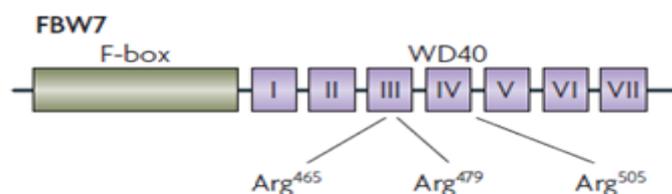


Figura 1.3. Proteína FBXW7 com seus domínios. Região denominada de F-box (em cinza), domínio WD40 (em lilás) que possui três resíduos conservados de Arginina (ARG<sup>465</sup>, ARG<sup>479</sup>, ARG<sup>505</sup>) (Fonte: AIFANTIS; RAETZ; BUONAMICI, 2008).

O *NOTCH1* foi inicialmente identificado com papel na leucemogênese da LLA-T quando foi descoberta uma translocação cromossômica rara (menos de 1% dos pacientes) com o *locus* do TCR $\beta$ , t(7;9)(q34;q34.3), em células de paciente com LLA-T (ELLISEN *et al.*, 1991). Posteriormente confirmou-se o seu papel na leucemogênese, quando se observou que mutações no *NOTCH1* estava presente em 50% dos casos de LLA-T (WENG *et al.*, 2004; MANSUR *et al.*, 2012). A maioria das mutações concentravam-se nos domínios HD (26%) e PEST (12,5%) e em ambos os domínios em 17,7% dos casos (WENG *et al.*, 2004). As mutações encontradas no domínio HD desestabilizam a interação entre as duas subunidades, que induz uma clivagem do receptor independente de ligante, levando a ativação constitutiva da via de sinalização do NOTCH1 (MALECKI *et al.*, 2006). Alteração no sítio que possui um centro conservado de Treonina (T<sup>2512</sup>) no domínio PEST promove um impedimento de interação com o FBXW7 e posterior degradação pelo proteossoma, aumentando o tempo de meia-vida do domínio intracelular e mantendo a via de sinalização mediada pelo NOTCH1 ativada (THOMPSON *et al.*, 2007).

Trabalhando-se com a hipótese que o FBXW7 poderia potencialmente funcionar como um supressor de tumor por regular a expressão das proteínas NOTCH, transcritos do *FBXW7* foram sequenciados em coorte de pacientes com LLA-T. Esta análise demonstrou que uma significativa porção, 20% a 30% dos casos testados, tinham mutações que afetavam um dos três resíduos conservados de arginina (R<sup>465</sup>, R<sup>479</sup>, e R<sup>505</sup>) localizados no domínio WD40 do FBXW7, essas alterações impediam a interação com o domínio PEST do NOTCH1 impedindo, da mesma forma que as alterações no domínio PEST, a degradação proteossomal e aumentando o tempo de meia-vida do domínio intracelular (THOMPSON *et al.*, 2007; MALYUKOVA, *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado que mutações no domínio HD do *NOTCH1* e mutações no *FBXW7* podiam acontecer concomitante na mesma amostra sugerindo que essas alterações podem ter

efeitos sinérgicos na indução da leucemogênese (MALYUKOVA *et al.*, 2007; O'NEIL *et al.*, 2007).

Posteriormente diversos estudos tentam demonstrar o papel prognóstico dessas alterações em pacientes com LLA-T pediátrica que possuem mutações no *NOTCH1* e/ou *FBXW7*. Jenkinson *et al.* (2013) demonstram que pacientes com mutações no *NOTCH1* e *FBXW7* apresentam um melhor prognóstico, mesmo sendo pacientes classificados com alto-risco, por apresentarem uma resposta ruim ao tratamento e doença residual mínima positiva. Zuurbier *et al.* (2010) e Clappier *et al.* (2010) observaram que as mutações foram associadas a uma boa resposta ao tratamento, mas não tiveram influência na sobrevida livre de eventos, assim o valor prognóstico de alterações no *NOCHT/FBXW7* não seria consistente e depende do protocolo de tratamento utilizado.

Em relação ao perfil maturativo dos casos com *NOTCH1* mutado, GROTEL *et al.* (2008) observaram que mutações no *NOTCH1* não estavam restritas a um estágio de desenvolvimento específico, porém a menor frequência foi observada nos casos mais maduros. Zuurbier, *et al.* (2010) observaram maior frequência no subtipo cortical. Baixa frequência dessa alteração foi observada nos casos mais imaturos como as LLA-ETP (ZHANG *et al.*, 2012).

### **1.6.2. Rearranjo *STIL-TAL1* e a expressão aberrante de *TAL1***

O gene *TAL1* (*T-cell acute lymphocytic leukemia-derived sequence-1*, também conhecido como *Stem Cell Leukemia-SCL*), é um fator de transcrição localizado no cromossomo 1p32 e é membro de uma família de genes que possuem um domínio básico com um motivo do tipo helix-loop-helix (bHLH), que confere a capacidade de se ligar a sítios específicos de DNA e dimerizar proteínas (CHEN *et al.*, 1990; HSU *et al.*, 1993). O *TAL1* tem um papel fundamental na hematopoese e é expresso normalmente em progenitores hematopoéticos, além de células de linhagem eritróide, mastócitos e de linhagem megacariocítica, células endoteliais e células do sistema nervoso central (VISVADER *et al.*, 1991; APLAN *et al.*, 1992a; PORCHER *et al.*, 1996).

Este gene foi descoberto pela observação de que casos de LLA-T apresentavam a translocação t(1;14)(p32;q11) envolvendo o *TAL1* e o locus dos genes da cadeia  $\delta$  do TCR, promovendo assim a desregulação da expressão do *TAL1*, porém essa alteração corresponde apenas de 1 a 3% dos casos de LLA-T pediátricas (CHEN *et al.*, 1990; CARROL *et al.*, 1990).

A alteração na expressão do *TAL1*, também pode ocorrer independente de alterações cromossômicas (FERRANDO *et al.*, 2002), porém a causa mais bem definida da desregulação da expressão do *TAL1* é devida ao rearranjo com o *STIL* localizado também no cromossomo 1 (APLAN; LOMBARDI; KIRSCH, 1991). A porção 5' do *TAL1* sofre uma deleção de aproximadamente 90kb, como resultado dessa deleção, os éxons codificantes do *TAL1* são justapostos ao primeiro éxon não codificante do *STIL*. Assim o *TAL1* passa a ter sua transcrição controlada pelo promotor *STIL*, Figura 1.4. As alterações cromossômicas envolvendo o *TAL1* parecem ser associados somente à leucemia de linfócitos T e podem ser mediadas por uma ação ilegítima das recombinases que participam do rearranjo dos genes do TCR. A frequência do rearranjo *STIL-TAL1* nas LLA-T varia de 9 a 25% dos casos (APLAN *et al.*, 1990; BROWN *et al.*, 1990; BERNARD *et al.*, 1991; APLAN *et al.*, 1992b; BREIT *et al.*, 1993; CAVÉ *et al.*, 2004).

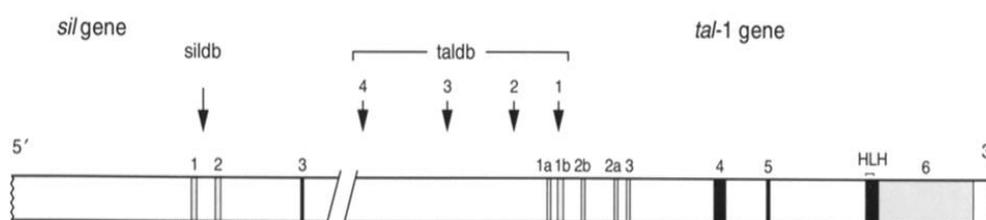


Figura 1.4. Representação do locus *TAL1* e da região 5' gene *STIL*. As regiões indicadas pelas setas representam os locais onde podem ocorrer os pontos de quebra e deleção dos genes para dar origem a fusão *STIL-TAL1*. Em preto representam os éxons codificadores de proteína, em cinza os éxons não codificantes, no éxon 6 o motivo helix-loop-helix (HLH) indicada em preto. (Fonte: BREIT *et al.*, 1993).

A presença da alteração *STIL-TAL1*, tem sido reportada como exclusiva da linhagem  $\alpha\beta$  (BREIT *et al.*, 1993; ASFANI *et al.*, 2004; VAN GROTEL *et al.*, 2008), sem concentração dos casos num perfil maturativo específico (VAN GROTEL *et al.*, 2008), porém a elevada expressão do *TAL1* foi associada a um perfil cortical mais maduro (mCD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>) (FERRANDO *et al.*, 2002). O valor prognóstico dessa alteração é controverso, Cavé *et al.* (2004) e Van Grotel *et al.* (2008) encontraram um melhor prognóstico nos pacientes com essa alteração, porém no estudo realizado por Mansur *et al.* (2009) foi demonstrado que pacientes com a fusão *STIL-TAL1* apresentavam um pior prognóstico.

A expressão aberrante do *TAL1* parece contribuir para a iniciação do processo leucemogênico por promover a formação de complexos proteicos aberrantes capazes de ativar inapropriadamente a expressão de genes na diferenciação celular (LÉCUYER; HOANG, 2004). O *TAL1* pode tanto ativar ou reprimir a transcrição, e sua habilidade de regular a expressão gênica é dependente da sua integração dentro de um complexo multifatorial contendo outras proteínas reguladores (LÉCUYER; HOANG, 2004; PALOMERO *et al.*, 2006). Para que o *TAL1* se ligue a regiões específicas do DNA é necessário que esteja complexado com outras classes de proteínas que possuem o motivo bHLH. O *TAL1* pode exercer seu efeito oncogênico por inibir a função normal das proteínas - E2A (E12 e E47) que é um fator de transcrição importante na regulação da diferenciação linfóide. A proteína E2A parece recrutar complexos remodeladores de cromatina para os seus genes alvos com o objetivo de facilitar a transcrição. O *TAL1* pode exercer seu efeito inibitório por interferir nesse processo (LÉCUYER; HOANG, 2004). Na presença de TAL1, E47 preferencialmente forma um complexo TAL1-E47 ao invés do homodímero E47-E47. Num cenário que permiti a formação do homodímero E47-E47, a expressão de TAL1 pode reprimir a transcrição por recrutar a proteína E47 para o complexo bHLH. Como consequência dessa observação o efeito do TAL1 na transcrição de um dado gene alvo irá depender do ambiente celular e das proteínas que se associam ao *TAL1* (HSU *et al.*, 1994).

Em células hematopoéticas, além das proteínas E2A, fazem parte do complexo multifatorial as proteínas LMO, LDB-1 (*Lim domain binding protein 1*), GATA-1 e por intermédio da proteína do tipo dedo de zinco Sp1 (*specificity protein1*) ligam-se ao DNA, Figura.1.5. Esse complexo tem como alvo a região promotora de genes alvos ativando sua transcrição, como exemplo, o *cKIT*, que codifica um receptor do tipo tirosina quinase essencial para o desenvolvimento hematopoético normal (LÉCUYER *et al.*, 2002).

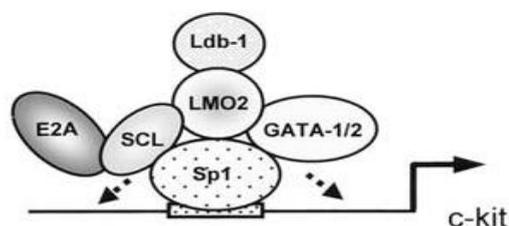


Figura 1.5: Exemplo de ativação transcricional por ação do complexo pentamérico com a participação do TAL1 (SCL). Complexo contendo as proteínas SCL (TAL1), E2A, LMO2, Ldb-1, e GATA1/2 e ativação do promotor do gene *c-KIT* através de uma interação com a proteína Sp1 (Adaptado de LÉCUYER; HOANG, 2004).

### 1.6.3. Expressão ectópica do *TLX3* (*HOX11L2*)

*TLX3* (também conhecido como *HOX11L2*) está localizado no *locus* 5q35 e pertence à família dos genes homeobox de classe II que codificam fatores de transcrição (DEAR *et al.*, 1993). Possuem um domínio altamente conservado que permite sua interação com o DNA e proteína (HOLLAND *et al.*, 2007). Embora muitos genes da família Homeobox estejam envolvidos na regulação da hematopoese, o *TLX3* não participa desse processo e não é expresso durante o desenvolvimento normal das células-T (SHIMAMOTO *et al.*, 1998; VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2008), e também parece estar envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico (HORNBRUCH *et al.*, 2005).

Nas LLA-T a expressão ectópica do *TLX3* é associada principalmente a translocação t(5;14)(q35;q32), onde ocorre a justaposição do *TLX3* ao gene *BCL11B*, um fator de transcrição com importante papel no desenvolvimento e comprometimento com a linhagem T (LI; LEID; ROTHENBERG, 2010). Essa translocação acomete aproximadamente 22% das LLA-T pediátricas (BERNARD *et al.*, 2001).

Embora muitos casos de *TLX3*<sup>+</sup> expressem o CD1a, o imunofenótipo desses casos são heterogêneos e o estágio preciso da parada maturativa em timócitos corticais mais imaturos não é conhecida. Observa-se que aproximadamente 40% dos casos *TLX3*<sup>+</sup> tem um perfil mais imaturo, enquanto que outros 40% apresentam-se no estágio de diferenciação cortical e expressam a cadeia  $\beta$  do TCR. Porém a expressão do TCR $\alpha\beta$  na superfície celular não é comumente visualizada nesses casos, por outro lado observa-se uma frequente expressão do TCR $\gamma\delta$ . E ainda nos casos com o TCR $\gamma\delta$  observou-se também o frequente rearranjo do TCR $\beta$  e a expressão da cadeia  $\beta$  (AISFANI *et al.*, 2004; VAN GROTEL *et al.*, 2008; DADI *et al.*, 2012). Dadi *et al.* (2012) sugere que a ausência TCR $\alpha\beta$  em casos *TLX3*<sup>+</sup> implica numa parada de maturação no estágio celular cortical mais imaturo, antes da expressão da cadeia  $\alpha$  do TCR. Nestas leucemias há um aumento dos níveis da marca epigenética de silenciamento H3K27me3 (Trimetilação da Lis-27(K) da histona H3) próximo dos *locus* do TCR $\alpha$ , sugerindo que segmentos não rearranjados do TCR $\alpha$  são epigeneticamente silenciados na presença de TLX1/3 (DADI *et al.*, 2012).

Em alguns estudos, a presença da translocação do *TLX3* foi associada a um pior prognóstico (BALLERINI *et al.*, 2008; VAN GROTEL *et al.*, 2008) e em outros a um bom prognóstico (ATTARBASCHI *et al.*, 2009) e ainda estudos que não foi observado impacto no prognóstico (CAVÉ *et al.*, 2004; MANSUR *et al.*, 2009). Supondo que a inconsistência do valor

prognóstico do rearranjo do *TLX3* poderia ser atribuída a diferenças no número de casos expressando o CD1a que é um marcador de bom prognóstico, Van Grotel *et al.* (2006) demonstraram que independente da expressão do CD1a a presença do *TLX3* apresentou um pior prognóstico.

#### 1.6.4. Mutações no *RAS*

As proteínas *RAS* compõe a cascata de sinalização de pelo menos duas principais vias Raf/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR (STEELMAN *et al.*, 2008; MCCUBREY *et al.*, 2012) que desencadeiam a proliferação e sobrevivência celular.

A família *RAS* contém três genes que codificam quatro proteínas homólogas N-*RAS*, H-*RAS*, K-*RAS4A* e K-*RAS4B* que são membro da família de proteínas ligadas ao GTP (guanina trifosfato) e que se localizam na membrana citoplasmática e geralmente são alvos a jusante (*downstream*) da sinalização de vários receptores de fatores de crescimento e citocinas, como FLT3, c-KIT. Na forma inativa, a *RAS* se liga ao GDP (Guanina difosfato) e quando ativado é ligado ao GTP. A ativação de *RAS* é catalisada por fatores de trocas de nucleotídeos chamados de GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*), que incluem SOS (*son of sevenless*), RasGRP (*Ras guanine nucleotide-releasing protein*) e RasGRF (*Ras guanine nucleotide-releasing factor*). Estes fatores favorecem a troca de GDP para GTP na proteína *RAS* mantendo-a ativada. Por outro lado, *RAS* é negativamente regulado pelas proteínas ativadoras GTPase (GAP), que estimulam a hidrólise do GTP e a formação de *RAS*-GDP inativo. Quando está mutado, o gene *RAS* produz proteína anormal que é resistente a hidrólise do GTP pela GTPase, resultando numa proteína constitutivamente ativa ligada ao GTP (KNIGHT; IRVING, 2014).

Mutações somáticas *NRAS*, *HRAS* ou *KRAS* são detectadas em aproximadamente 30% de todos os cânceres e predominantemente afetam os códons 12, 13 e 61, sendo *KRAS* e *NRAS* os mais frequentemente mutados, acometendo aproximadamente 10% a 15% dos casos de LLA-T. Embora mutações no *RAS* tenha uma baixa frequência nas LLA-T, 50% dos casos tem uma aberrante sinalização do *RAS*, sugerindo que a via do *RAS* tem um importante papel na leucemogênese (FRIEDERIKE, *et al.*, 2005; WIEMELS *et al.*, 2005; CHUNG; KONDO, 2011). Hartzel *et al* (2013) demonstrou que o fator de trocas de nucleotídeo *RasGRP1* é super expresso em LLA-T pediátricas, entretanto este aumento não foi observado em casos com *NRAS* e *KRAS*

mutado, demonstrando que sinalização aberrante da via do RAS pode ocorrer por outros fatores, além da mutação da proteína em si.

Trabalhos em modelos murinos tem demonstrado que células que expressam o *K-Ras* oncogênico (*KRAS*<sup>G12D</sup>), apresentam um bloqueio de diferenciação no estágio DN1. Estas células ao serem transplantadas em murinos selvagens resulta numa agressiva leucemia/linfoma de células-T, onde os linfoblastos apresentam um imunofenótipo duplo positivos (expressam CD4 e CD8) e aberrantemente mantém a expressão do CD44. E com a progressão da doença, aproximadamente 50% dos murinos adquirem mutações no *NOTCH1*, sugerindo uma cooperação dessas duas alterações na leucemogênese (KINDLER, *et al.*, 2008).

### 1.7. Expressão e alterações moleculares da cadeia alfa do receptor de interleucina-7(IL7R $\alpha$ ) em LLA-T

A interleucina-7 (IL-7) é produzida pelas células estromais da medula óssea e do timoe tem papel fundamental no desenvolvimento, homeostasia, proliferação e sobrevivência das células-T (FRY *et al.*, 2005).

A sinalização da IL-7 é mediada pela ligação ao seu receptor, um heterodímero que compreende uma cadeia alfa denominada de IL-7R $\alpha$  (também conhecido como CD127) e a cadeia gama comum dos receptores de citocinas ( $\gamma$ c; também conhecida como CD132) que faz parte do receptor de outras interleucinas como IL-2, IL-9, IL-15, IL-21 (ROCHMAN; SPOLSKI; LEONARD, 2009) (Figura1.6). Em humanos, a importância do receptor de IL7R $\alpha$  no desenvolvimento e sobrevivência das células-T veio da observação que pacientes com imunodeficiência severa combinada possuíam mutações do tipo perda de função no *IL7R $\alpha$*  e esses pacientes possuem ausência de células-T, mas não de célula B e NK (PUEL *et al.*, 1998).

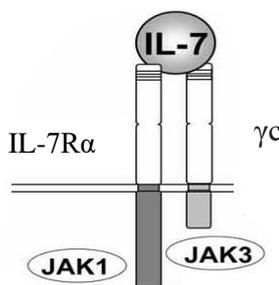


Figura 1.6. Estrutura do receptor da Interleucina -7(IL-7). A proteína Janus Kinase (JAK1) se liga a porção intracelular do IL-7R $\alpha$  e a JAK3 se liga a porção intracelular da  $\gamma$ c (Fonte: BARATA; CARDOSO; BOUSSIOTIS, 2005).

Durante o desenvolvimento das células-T no timo, a sinalização mediada pela ligação da IL-7 ao seu receptor ativa a via de sinalização através da fosforilação das proteínas Janus kinase 1 (JAK1), JAK3 e também pode ativar a via fosfatidil inositol 3- kinase (PI3K), resultando na fosforilação e ativação de transdutores de sinal e ativação do fator de transcrição STAT5, resultando no aumento de expressão de moléculas anti-apoptóticas como BCL-2 (*B cell lymphoma 2*) e a diminuição da expressão de moléculas pro-apoptóticas como BAX (BCL-2- proteína associada ao X), BIM (BCL-2-mediador da interação da morte celular) e BAD (BCL-2 antagonista da morte celular). A sinalização mediada pela IL-7 também leva a diminuição dos níveis de p27, um inibidor de ciclina dependente de quinases, evitando a apoptose e promovendo a progressão do ciclo celular (KARAWAJEW *et al.*, 2000; BARATA *et al.*, 2001; BARATA; CARDOSO; BOUSSIOTIS, 2005; MACKALL; FRY; GRESS, 2011).

Diversas evidências sugerem que a desregulação da sinalização do eixo IL-7/ IL-7R $\alpha$  pode ser oncogênica, ou pelo menos em parte contribuir para a progressão da leucemia (RIBEIRO *et al.*, 2013). A regulação da transcrição e expressão do IL-7R $\alpha$  é mediada pelo NOTCH1 não apenas no desenvolvimento normal dos timócitos mas também em células humanas de LLA-T, sugerindo que a conversa cruzada dessas vias pode ser relevante para a leucemogênese (GONZÁLEZ-GARCIA *et al.*, 2009). Foi demonstrado que IL-7 contribui para a progressão da LLA-T, em modelos murinos com deficiência de IL-7 houve uma diminuição da expansão das células leucêmicas na medula óssea, diminuição da infiltração em outros órgãos e a morte associada à leucemia demorou mais a ocorrer. Foi observado ainda que os pacientes com LLA-T tinham níveis significativamente menores do RNA mensageiro do IL-7R $\alpha$  comparados a precursores de células-T normais e que os níveis de IL-7 também eram menores no plasma de pacientes com LLA-T quando comparados aos doadores saudáveis, essas observações sugerem que as células humanas de LLA-T da maioria dos pacientes podem ser sensíveis a sinalização mediada pela IL-7 (SILVA *et al.*, 2011)

A confirmação da relevância biológica do eixo IL-7/IL-7R $\alpha$  na LLA-T em humano foi demonstrada recentemente através da identificação de mutações no IL7R $\alpha$  em aproximadamente 10% de pacientes com LLA-T (SHOCHAT *et al.*, 2011; ZENATTI *et al.*, 2011). Essas mutações afetam exclusivamente o éxon 6 e localizam-se na região justamembrana da porção extracelular do receptor no domínio transmembrana (ZENATTI *et al.*, 2011) (Fig. 1.7).

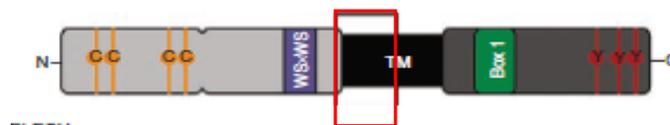


Figura 1.7. Estrutura da proteína  $IL-7R\alpha$  com a delimitação da região onde ocorrem as mutações. Em vermelho a delimitação da região da justamembrana da porção extracelular no domínio transmembrana (Fonte: ZENATTI *et al.*, 2011).

Na maioria das mutações ocorre a introdução de um resíduo de cisteínas não pareadas na região indicada acima, o que sugere promover a homodimerização do receptor e ativação da sinalização. Análise da via JAK-STAT e PI3K/Akt de células leucêmicas com mutação no  $IL7R\alpha$  demonstrou que esta mutação era do tipo ganho de função e induziam a ativação constitutiva da transdução de sinais mediada pelo  $IL7R\alpha$  independente do ligante. E ainda, as mutações induziam a fosforilação somente das proteínas JAK1 e STAT5 e não promovia a fosforilação de JAK3, o que acontece na sinalização fisiológica mediada pela IL-7. Foi demonstrado que a mutação no  $IL-7R\alpha$  ativa a transdução de sinal de maneira independente da porção  $\gamma c$  e das proteínas JAK3 e JAK2 (ZENATTI *et al.*, 2011).

As mutações no receptor  $IL-7R\alpha$  não estavam associadas a um estágio específico de maturação baseado na classificação EGIL (ZENATTI *et al.*, 2011). Cabe ressaltar que mutações no  $IL-7R\alpha$  foram reportadas em casos de LLA-ETP (ZHANG *et al.*, 2012) e recentemente foi demonstrado em modelos murinos que mutações ativadoras no  $IL-7R\alpha$  são suficientes para induzir a LLA-ETP em murinos transplantados com vetores retrovirais expressando  $oIL-7R\alpha$  mutados. O mecanismo celular em que esse receptor mutante induz LLA-ETP foi relacionado ao bloqueio da diferenciação de tímócitos no estágio DN2 em que a linhagem mielóide e o potencial de desenvolvimento de células-T coexistem (TREANOR *et al.*, 2014).

A presença de mutações no receptor  $IL-7R\alpha$  não demonstrou influência na sobrevida dos pacientes (ZENATTI *et al.*, 2011). O papel no prognóstico do IL-7e seu receptor  $IL-7R\alpha$  em pacientes com LLA-T foi inicialmente demonstrada por Karawajew *et al.* (2000). Neste estudo a avaliação da citorredução no dia 8 de tratamento e a presença de blastos na medula do dia 15 de tratamento demonstraram uma correlação negativa em relação a extensão da inibição da apoptose pela IL-7, ou seja, células leucêmicas de pacientes com alta sensibilidade a inibição da apoptose pela IL-7 foram mais sensíveis a terapia inicial, enquanto os pacientes que não respondiam a IL-7 apresentaram uma pobre resposta a corticoterapia. Neste mesmo estudo, a expressão do receptor  $IL-7R\alpha$  teve uma correlação positiva com a extensão da inibição da

apoptose. Em um estudo mais recente foi demonstrado que a baixa expressão do gene *IL7Ra* foi associada ao risco de recaída em pacientes com LLA-T e uma elevada resistência a corticoterapia (CLEAVER *et al.*, 2010).

### **1.8. Expressão dos receptores cKIT/CD117 e FLT3/CD135 e mutações no gene *FLT3***

O receptor FLT3/CD135 (*FMS-like Tyrosine kinase-3*) e o receptor de fator de células tronco (cKIT-*tyrosine-protein kinase/CD117*) são membros da família de receptores do tipo tirosina quinases e possuem estrutura parecidas contendo uma porção extracelular com cinco domínios semelhantes a imunoglobulina, que é o domínio de ligação ao ligante, um segmento transmembrana único, um domínio justa membrana e um domínio citoplasmático tirosina quinase (TAKASHI, 2011) (Figura 1.8).

Existem dois tipos de mutações no *FLT3* bem descritas, as duplicações *in tandem* (DITs) no domínio justamembrana e as mutações pontuais ou pequenas deleções/inserções que afetam os códons Asp835 ou Ile836 no domínio tirosina quinase (DTK) (NAKAO *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 2001) Fig.1.8, estas mutações resultam na ativação constitutiva do receptor independente do ligante. Estas alterações são comuns nas LMA e conferem um pior prognóstico (GILLILAND; GRIFFIN, 2002; LEVIS; SMALL, 2003; STAFFAS *et al.*, 2011). Em contraste, são raramente encontradas em LLA (ARMSTRONG *et al.*, 2004; VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2005; ANDERSON *et al.*, 2008). Devido à baixa frequência de pacientes com *FLT3* mutado em LLA-T o seu valor prognóstico não pode ainda ser avaliado. Porém foi observada uma elevada frequência de mutações no *FLT3* em pacientes pediátricos e adultos com LLA-ETP que é um subtipo de LLA-T de pior prognóstico (NEUMANN *et al.*, 2012; ZHANG, *et al.*, 2012).

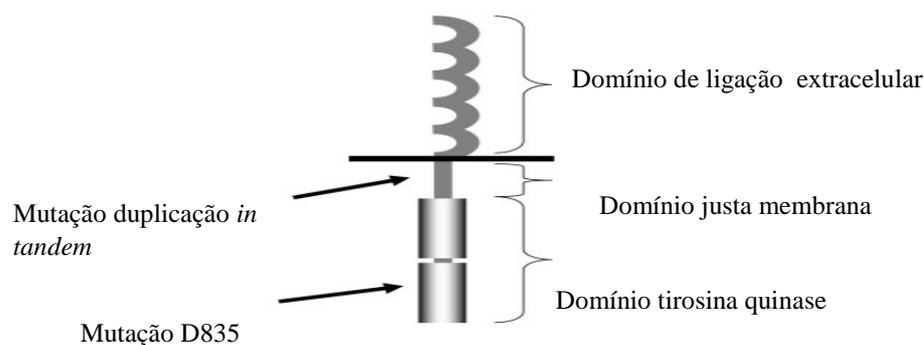


Figura 1.8. Estrutura do receptor FLT3. As setas mostram os locais onde ocorrem as mutações, no domínio tirosina quinases a mutação D835 e no domínio da justamembrana duplicação *in tandem* (Fonte: TAKAHASHI, 2011).

O receptor FLT3 e c-KIT contribuem para a proliferação das células hematopoéticas e são expressos em altos níveis nas células hematopoéticas multipotentes que possuem potencial para se diferenciar em células linfóide ou mielóides (PARCELLS *et al.*, 2006). Nas leucemias agudas o CD117 pode ser expresso nos blastos leucêmicos de aproximadamente 60% dos pacientes com LMA, frequentemente associados ao imunofenótipo imaturo e a sua expressão na LLA-cpB é rara (menos de 3% dos casos) (SPERLING *et al.*, 1997). Nas LLAs-T a expressão varia de 9 a 28% dos casos (SPERLING *et al.*, 1997; BENE *et al.*, 1998; VAN VLIERBERGHE, *et al.*, 2013). O CD135 é altamente expresso em LLA-cpB e em LMA e em menor frequência nas LLA-T (CAROW, *et al.*, 1996; DREXLER, 1996; VORA *et al.*, 2010). Estudos sugerem que a expressão do CD117 e o imunofenótipo imaturo das LLA-T pode identificar um subconjunto de LLA-T que possuem mutações no *FLT3* (PAIETTA *et al.*, 2004; HOEHN *et al.*, 2012; NEUMANN *et al.*, 2012; ZAREMBA *et al.*, 2012). Em estudo envolvendo pacientes adultos, 3 de 55 casos demonstraram mutações no *FLT3* e foram caracterizados por uma alta expressão do CD117, e um fenótipo imaturo (mCD3<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD2<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD1a<sup>-</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD4/CD8<sup>-</sup>/TdT<sup>+</sup>) (PAIETTA *et al.*, 2004). Entretanto numa coorte de 75 pacientes pediátricos, demonstrou apenas dois casos mutados, que possuíam um fenótipo um pouco mais maduro (mCD3<sup>-</sup>, CD34<sup>-/+</sup> CD2<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD1a<sup>-</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, TdT<sup>+</sup>) e com uma expressão variável do CD117 (VAN VLIERBERGHE, *et al.*, 2005). Cabe ressaltar que a maioria dos casos citados (PAIETTA *et al.*, 2004; HOEHN *et al.*, 2012; NEUMANN *et al.*, 2012; ZAREMA *et al.*, 2012) é baseado em coorte pequena de pacientes e apenas um (PAIETTA *et al.*, 2004) avalia pacientes pediátricos.

## 2. HIPÓTESE

Como exposto na revisão de literatura a LLA-T é uma doença com grande diversidade tanto do ponto de vista imunofenotípico quanto do genômico molecular. Em contraste com as LLA-cpB, onde a estratificação de riscos se baseia em faixas etárias, níveis de leucometria ao diagnóstico, e presença de fusões gênicas, (por exemplo, *ETV6-RUNX1* associado a LLA - CD10<sup>+</sup> com bom prognóstico), ainda não existe um consenso para alterações moleculares preditivas de recaída e de valor prognóstico nas LLA-T; tão pouco existem evidências de um perfil imunofenotípico específico associado com alterações moleculares (exclusivas). Embora estudos moleculares combinados com o perfil de expressão gênica tenham descoberto muitas informações em relação à biologia molecular da LLA-T, estas ainda se traduzem em poucos benefícios para estratificação de risco e decisão terapêutica, por apresentarem resultados controversos de acordo com os diversos grupos de estudos.

A recente caracterização da LLA-ETP, com um perfil de células imaturas, elevada frequência de alterações moleculares em receptores de citocina e de vias de sinalização celular do *RAS*, *BRAF*, *FLT3*, *IL7R*, *JAK3*, *JAK1*, e menor frequência de mutações no *NOTCH1* e ainda associada a prognóstico adverso; nos induziram a testar se as frequências dessas alterações moleculares podem estar associadas ao perfil maturativo de LLA-T em geral. Portanto, a identificação e caracterização do perfil imunofenotípico dos subgrupos maturativos de LLA-T e a identificação de determinadas alterações de genes envolvidos na leucemogênese das células-T (por exemplo *IL7R*), foram incluídos no nosso desenho de estudo como ponto de partida, reavaliadas em uma coorte de LLA-T, para testar se a expressão celular, avaliada pela citometria de fluxo, poderia ter relevância prognóstica e/ou preditoras de associações com alterações moleculares.

No contexto atual, estudos que avaliem a ação conjunta de diversas alterações genéticas e perfil imunofenotípico no prognóstico das LLAs-T ainda são relativamente escassos, e podem ser de grande importância também para se estabelecer algoritmo de testes indicativos de alterações moleculares, e é nessa proposta que se inserem as investigações deste trabalho.

Desta forma, a caracterização dos diversos subtipos maturativos de LLA-T, através de CFM, e ainda de acordo com as alterações moleculares, como a identificação de mutações nos genes *NOTCH1*, *FBXW7*, *RAS*, *IL7R*, *FLT3*, além da fusão gênica *STIL-TAL1* e expressão

anômala do *TLX3* podem contribuir para identificação de possíveis fatores prognósticos, se analisados em coortes capazes de gerar resultados significantes.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. OBJETIVO PRINCIPAL**

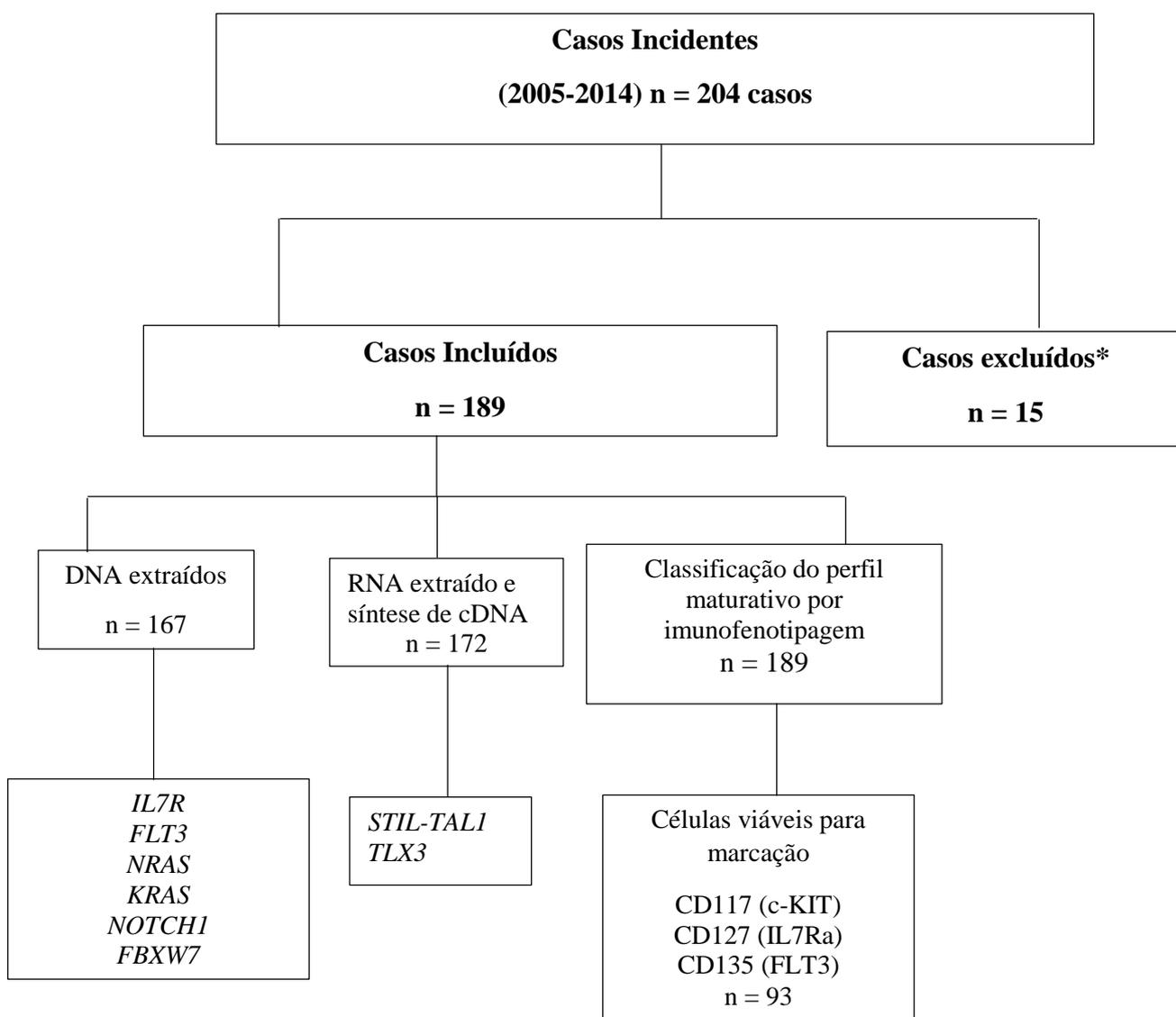
- Testar se os diferentes perfis imunofenotípicos das LLAs-T estão associados com determinadas alterações somáticas específicas; e, testar se estas associações são capazes de prever as chances de sobrevida livre de eventos e sobrevida global.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar o perfil imunofenotípico dos diferentes subtipos maturativos de LLA-T e caracterizar as possíveis LLA-ETP, leucemia aguda de fenótipo misto e expressão de fenótipos aberrantes.
- Identificar mutações nos genes *NOTCH1*, *FBXW7*, *IL7R*, *FLT3*, *RAS*, bem como os rearranjos gênicos *STIL-TAL1* e *TLX3*.
- Testar se existe associação entre as alterações moleculares, os subtipos maturativos e a expressão celular dos receptores IL-7R $\alpha$  (CD127), FLT3 (CD135) e c-KIT (CD117) em membrana celular de células blásticas de LLA-T.
- Avaliar o valor prognóstico do perfil imunofenotípico e de alterações moleculares na sobrevida de pacientes com LLA-T.

#### 4. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de coorte com amostras de pacientes com leucemias agudas da linhagem T que deram entrada no Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos do Instituto Nacional do Câncer no período de fevereiro de 2005 a fevereiro de 2014. O fluxograma abaixo mostra o desenho geral do estudo.



\* Foram excluídos do estudo 15 casos que não tiveram o perfil maturativo determinado por não terem sido testados para o CD3 de membrana e/ou CD1a.

Figura 4.1. Fluxograma do Estudo.

## **5. CASUÍSTICA**

### **5.1. Critérios de inclusão**

Foram incluídos no estudo amostras de pacientes com leucemia aguda com idade  $\geq 13$  meses e  $< 19$  anos que apresentavam marcadores imunofenotípicos de linhagem T, com mais de 25% de blastos e com disponibilidade de amostra de MO e/ou de SP; amostras coletadas para análise imunofenotípica e/ou molecular ao diagnóstico antes de qualquer tratamento oncológico.

### **5.2. Critérios de exclusão**

Amostras de pacientes com tratamento oncológico prévio; amostras de linfomas sem infiltração de MO por blastos ( $< 25\%$ ); amostra de recaídas de pacientes que não foram diagnosticados inicialmente no laboratório do PHOP; amostras com baixa viabilidade celular ( $\leq 60\%$ ), pacientes que apresentavam alguma anormalidade cromossômica constitucional e casos de LLA-T que não foram testados para o CD3 de membrana e/ou CD1a.

### **5.3. Amostras**

De uma série 204 casos, 189 foram elegíveis para o estudo. As amostras analisadas foram de aspirado de MO e/ou SP que foram avaliadas pela morfologia, imunofenotipagem e testes moleculares conforme recomendado pela OMS. A caracterização imunofenotípica foi feita em 189 casos, a extração de DNA para pesquisa de mutações em 167 casos, e a extração de RNA e síntese de cDNA para pesquisa de alterações cromossômicas (*STIL-TAL1* e *TLX3*) foi realizada em 172 casos. As amostras são procedentes dos Centros de tratamento Oncológico situadas em cidades de 4 regiões brasileiras (Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul) e que fazem parte do estudo epidemiológico-molecular (anexo 1). As informações demográficas e clínicas ao diagnóstico dos pacientes foram obtidas a partir do preenchimento de fichas de encaminhamento (anexo 2).

### **5.4. Informações clínicas de seguimento**

Para a avaliação da sobrevida global (SG), sobrevida livre de eventos (SLE) e resposta ao tratamento foi utilizada a ficha de coleta de dados clínicos (anexo 3) que foi enviada a cada serviço e preenchida com as informações da evolução dos pacientes por membros da equipe de tratamento do paciente (médicos ou enfermeiros).

### **5.5 . Tratamento**

Os pacientes foram tratados com dois protocolos distintos, que têm estratégia e composição de drogas semelhantes GBTLI-LLA-99 (alto risco) e BFM-ALL 95 e 2002, conforme descrito por Scrideli *et al.* (2009) e Stary *et al.* (2014).

## **6. MÉTODOS**

### **6.1 Análise morfológica**

Foi realizada contagem diferencial de aproximadamente 200 células no esfregaço da MO e/ou SP corado com o meio May-Grünwald-Giemsa.

### **6.2. Imunofenotipagem**

#### **6.2.1. Anticorpos utilizados na Imunofenotipagem**

Para a caracterização imunofenotípica das leucemias agudas utilizou-se anticorpos monoclonais (AcMo) marcados com dois ou quatro fluorocromos por tubo: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e proteína piridina de clorofila (PerCP) e alofocianina (APC) (Quadro 6.1), em diversas combinações, em duas etapas. Na primeira, foram testados antígenos intracitoplasmáticos (aMPO, cCD3, cCD22/cCD79, TdT) e o CD45, CD7, CD19 e CD3 na membrana para avaliação de percentual de blasto (CD45/SSC) e definição da linhagem. Em seguida, foram incluídos os AcMO contra antígeno da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-7 (CD127PerCP-Cy5.5) e o receptor FLT3 (CD135 PE) e CD117 PE e demais anticorpos para a caracterização do perfil imunofenotípico. No quadro em anexo 4 estão descritas a reatividade dos marcadores utilizados na caracterização imunofenotípica dos blastos de LLA-T.

Quadro 6.1. Painel de anticorpos utilizados na caracterização das LLA-T

<b>1ª etapa</b>			
<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP-CY5.5</b>	<b>APC</b>
TdT	cCD22+79a	CD45	cCD3
aMPO	cCD3	CD45	
CD7	CD19	CD45	mCD3
<b>2ª etapa</b>			
CD5	CD3	CD127	CD7
CD7	CD10	CD127	CD45
CD5	CD117	CD45	CD7
CD2	CD135	CD45	CD7
CD1a	CD3	CD7	CD45
CD4	CD8	CD3	CD45
TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$	CD3	CD45
HLA-DR	CD33	CD45	
CD15	CD11b	CD45	
CD13	CD117	CD45	CD34
CD16	CD56	CD45	CD3

C: citoplasma; m:membrana

### 6.2.2. Preparação das amostras para marcação imunofenotípica em amostras frescas

Para a marcação de membrana utilizou-se 50  $\mu$ L das amostras de MO ou SP incubadas, por 20 minutos, com quantidade pré-estabelecida pela titulação de cada anticorpo (geralmente um volume de 5-10  $\mu$ L), à temperatura ambiente (TA). Em seguida adicionou-se 2 mL da solução de lise FacsLysing da BD diluída 1:10 em água Milli-Q e incubou-se por 10 minutos a TA. As células foram centrifugadas a 453 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 2 mL de tampão fosfato (PBS) 1x (pH =7,4), então foram centrifugadas novamente, o PBS foi descartado e o *pellet* ressuspensas em 500  $\mu$ L de PBS.

Para a marcação intracitoplasmática foram usados 50  $\mu$ L das amostras em cada tubo. Adicionou-se 2 mL da solução de lise FacsLysing da BD diluída 1:10 em água Milli-Q e

incubou-se por 10 minutos a TA. As células foram centrifugadas a 453 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, e foram acrescentados 2 mL de tampão fosfato (PBS) 1x (pH =7,4), então foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi mantido invertido numa gaze para secar todo o volume residual. Posteriormente o *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de PBS/Tween20 0,5% e incubados durante 5 minutos, em seguida os anticorpos para antígenos intracelulares foram pipetados e amostra foi vortexada e incubadas por mais 15 minutos. Para a lavagem das células foi acrescentado 2 mL de Tween20 0,1%, centrifugadas por 453 g por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspendido em 500 µL de PBS.

Para a marcação dos demais marcadores de membrana, utilizou-se o mesmo protocolo descrito para a marcação do CD45.

### **6.2.3. Congelamento de células em dimetil sulfoxido (DMSO) para uso posterior de marcação imunofenotípica**

A etapa inicial para o congelamento de células consiste na separação celular para obtenção das células mononucleares (CM), baseada em gradiente de centrifugação através de Ficoll-Hypaque-Hystopaque® (densidade 1077). As amostras de MO e/ou SP foram depositadas em tubos Falcon de 15 mL e acrescentou-se o meio de cultura RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB) até completar o volume final de 10mL. Para separação de CM por Ficoll foi considerado a proporção de 3 mL de Ficoll para cada 1mL de amostra. A amostra foi transferida para o tubo Falcon contendo Ficoll, com cuidado para não misturar amostra com Ficoll e centrifugou-se a 453 g por 25 minutos, sem freio e sem aceleração. Após a centrifugação foi formado um anel na interfase do tubo contendo as células mononucleares. Este anel foi recolhido com pipeta Pasteur e transferido para um tubo Falcon de 15 mL. Para retirar o excesso de Ficoll, ao anel de células mononucleares recolhido, adicionou-se 10 mL de RPMI, então, o tubo foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 453 g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas, dependendo do tamanho do *pellet*, em 1 a 4 mL de RPMI. A viabilidade celular foi avaliada através da coloração pelo azul de Tripán 0,2% e as células foram observadas e contadas em câmara de Neubauer. Para congelamento, a suspensão de células foi centrifugada a 453 g por 5 minutos; desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em solução de congelamento gelada (SFB/DMSO 10%) e transferido para criotubos.

Os criotubos foram transferidos para o gelo e adicionou-se um volume de solução de congelamento suficiente para que se obtenha entre 10 a 20 x 10<sup>6</sup> células/mL, os criotubos contendo células em DMSO foram devidamente armazenados em tanques contendo N<sub>2</sub> líquido, para posterior utilização.

Para a marcação imunofenotípica com os AcMo anti-CD127, anti-CD135 e anti-CD117, os tubos de CM congelados foram descongelados rapidamente. As células foram lavadas com 10 mL de RPMI em tubo Falcon de 15 mL, foram submetidas a centrifugação de 453 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e em seguida foram ressuspensas em 1 a 3 mL de PBS+5% SFB.

Posteriormente avaliou-se a viabilidade celular e contagem das células em câmara de Neubauer e Azul de Trypan 0,2%. Utilizou-se um volume aproximado 50-60 µL da suspensão, contendo 1x10<sup>6</sup> células para realizar a marcação com os AcMo para antígenos de membrana descrita acima no item 5.2.2.2.

#### **6.2.4. Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo**

A aquisição das amostras foram feitas no citômetro de fluxo FACS Calibur™ da Becton Dickinson (BD) – San Jose – Califórnia – USA, usando o programa *CellQuest* (BD)™, após calibração do citômetro com o kit Calibrite beads (BD), através do programa FACS Comp (BD)™.

As análises foram feitas com auxílio do software Infinicyt™ (Cytognos – Salamanca – Espanha) de onde foram gerados os dados analisados, como porcentagem de células positivas para cada marcador. Utilizou-se o *dot plot* CD45 x Complexidade (SSC-*Side scatter*) (Fig. 6.1) para delimitar a área específica dos blastos, este *dot plot* discrimina as células blásticas leucêmicas que se localizam-se na região de baixa complexidade e fraca a moderada intensidade de expressão do CD45, os linfócitos apresentam intensidade forte do CD45, precursores eritróides são essencialmente negativos para o CD45, precursores neutrofílicos e eosinófilos tem maior complexidade interna, e monócitos maior complexidade interna e intensidade forte do CD45 (LACOMBE *et al.*, 1997; CRAIG; FOON, 2008).

Usando o *dot plot* CD45 x SSC os blastos foram identificados e então selecionados através de uma janela eletrônica (“*gate*”), representados em azul (Figura 6.1).

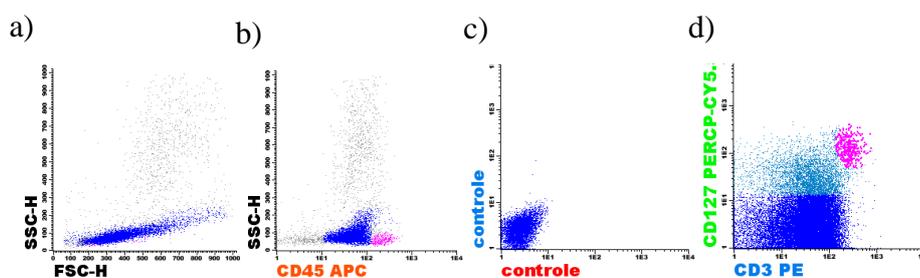


Figura 6.1: Exemplo de análise de citometria de fluxo. a) *Dot plot* tamanho (FSC-H) x granulosidade das células (SSC-H). b) *Dot plot* CD45 x SSC, mostrando blastos (azul) e linfócitos (rosa). c) *Dot plot* do tubo controle negativo da amostra. d) *Dot plot* com células positivas para o CD3PE e CD127 PerCP-Cy5.5. Em azul claro a porcentagem de células positivas (10%) para o CD127 e CD3 no *gate* dos blastos, definidas a partir do controle negativo.

Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas. O limiar para positividade foi baseado no controle negativo da amostra, sendo os marcadores considerados positivos quando expressados em mais de 20% das células do *gate* (BENE *et al.*, 1995).

Para os marcadores CD127, CD117 e CD135 além da porcentagem de células positivas, avaliou-se a intensidade mediana de fluorescência (IMF) das células blásticas. O valor da IMF foi obtido pela divisão do valor IMF do marcador em questão pela IMF do controle negativo. As expressões celulares dos antígenos foram determinadas como alta, intermediária ou baixa de acordo com valores do percentil da IMF. Casos com valores de IMF abaixo da mediana foram considerados como expressão baixa, casos com valores acima da mediana e abaixo do 75 percentil foram considerados com expressão intermediária e acima do 75 percentil como alta expressão. Análise desses marcadores foram feitas também pelo programa *Summit* versão 4.3 (DAKO).

### 6.2.5. Critérios de classificação dos subtipos de LLA-T

Para classificar os subtipos maturativos das leucemias agudas de linhagem T (caracterizada principalmente pela expressão citoplasmática da cadeia épsilon do CD3) e para classificação das leucemias agudas bifenóticas de fenótipo mielóide/T (LAB-M/T) utilizamos como base a classificação EGIL (BÉNÉ *et al.*, 1995, BÉNÉ *et al.*, 1998). No Quadro 6.2

observamos os critérios para a classificação dos subtipos maturativos. E no Quadro 6.3 o sistema de pontuação para a definição de LAB, cujo imunofenótipo some pontuação superior a dois pontos para linhagem mielóide e a um ponto para linhagem linfóide são enquadrados como bifenotípica.

Quadro 6.2. Marcadores utilizados para a classificação dos subtipos maturativos com base na classificação EGIL

Subtipo	Marcadores							
	cCD3	CD7	CD2	CD5	CD8	CD4	CD1a	CD3m
T-I (pró-T)	+	+	-	-	-	-	-	-
T-II (pré-T)	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
T-III (T- cortical)	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-
T-IV (T-madura)	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+

+: positivo; +/-: positivo ou negativo; -: negativo

Quadro 6.3. Sistema de pontuação da Classificação EGIL para definição de leucemia aguda bifenotípica

PONTOS	Linhagem B	Linhagem T	Linhagem Mielóide
<b>2</b>	cCD79a	CD3(c/m)	MPO
	cIgM	TCR- $\alpha\beta$	
	cCD22	TCR- $\gamma\delta$	
<b>1</b>	CD19	CD2	CD117
	CD10	CD5	CD13
	CD20	CD8	CD33
		CD10	CD65
<b>0,5</b>	TdT	TdT	CD14
	CD24	CD7	CD15
		CD1a	CD64

c: Citoplasma; m: membrana

Após a identificação dos casos de LAB-M/T e dos subtipos maturativos segundo a classificação EGIL, utilizamos duas classificações na tentativa de identificarmos os casos de

LLA-ETP. Inicialmente as LLA-ETP foram caracterizadas pelos critérios proposto por Counstan-Smith *et al.*, 2009: ausência de expressão do CD1a e CD8 (< 5% de blastos positivos para esses marcadores), fraca expressão do CD5 (< 75% de blastos positivos) e expressão em  $\geq 25\%$  dos blastos, de um ou mais marcadores de linhagem mielóide (CD13, CD33, CD117, CD11b, CD15, CD65) e/ou de células tronco (HLA-DR, CD34). Posteriormente utilizamos também um sistema de pontuação proposto por Inukai *et al.* (2011), para que o caso possa ser classificado como LLA-ETP o mesmo tem que obter um somatório igual ou superior a sete, baseado na expressão dos marcadores descritos na Quadro 6.4.

Quadro 6.4. Sistema de pontuação baseado na porcentagem de células positivas de 11 marcadores para identificação de LLA-ETP.

Pontuação	-2	-1	+1	+2
CD5	$\geq 75\%$			< 75%
CD8	$\geq 5\%$			< 5%
CD13			$\geq 25\%$	$\geq 75\%$
CD33			$\geq 25\%$	$\geq 75\%$
CD34			$\geq 25\%$	$\geq 75\%$
HLA-DR			$\geq 25\%$	$\geq 75\%$
CD2		$\geq 75\%$	< 20%	
m CD3		$\geq 75\%$	< 20%	
CD4		$\geq 75\%$	< 20%	
CD10		$\geq 75\%$	< 20%	
CD56			$\geq 20\%$	$\geq 75\%$

m: membrana

Fonte: Inukai *et al.* (2011)

## 6.3 Testes moleculares

### 6.3.1. Detecção das alterações *STIL-TAL1* e *TLX3*

Para a extração de RNA, síntese de cDNA, RT-PCR (reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa) do gene controle *GAPDH* e para detecção das alterações *STIL-TAL1* e *TLX3* utilizamos a metodologia previamente descrita por Mansur (2008).

Exemplo de casos positivos para estas alterações estão presentes nas Figuras 6.2 e 6.3

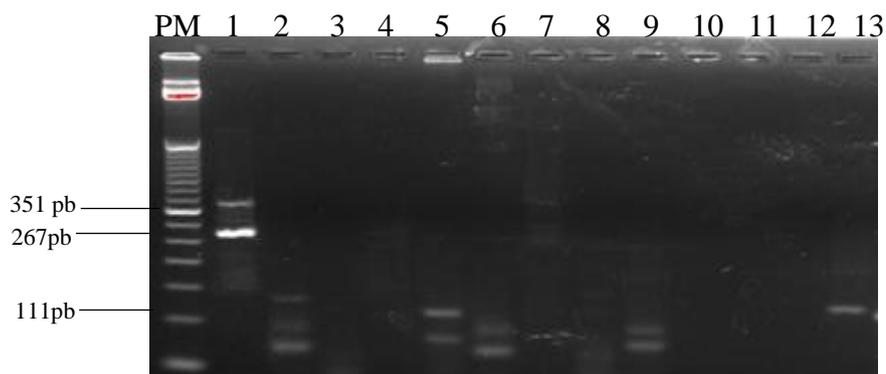


Figura 6.2. Eletroforese em gel de agarose de 2% corado com brometo de etídeo ilustrando casos positivos para o rearranjo *STIL-TAL1*. PM = peso molecular de 50 pares de base (pb), Casos 5 e 13 positivos com a presença de amplicon de 111 pb, o caso 1 com a presença das bandas de 267 pb e 351 pb, esses amplicons representam os três possíveis *splicings* alternativos. Os demais casos representam casos negativos para esta alteração. A presença de pelo menos um dos amplicons é suficiente para que o caso seja considerado positivo.

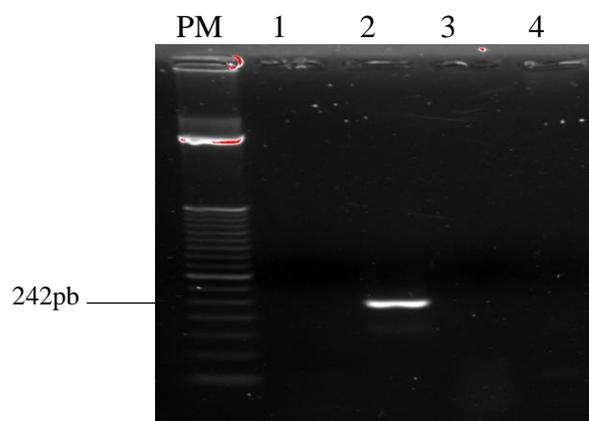


Figura 6.3. Eletroforese em gel de agarose de 2% corado com brometo de etídeo ilustrando exemplo de caso positivos para o *TLX3* (número 2), com amplicon de 242 pb. PM = peso molecular de 50 pb. Número 1 representa o CN, e casos 3 e 4 são negativos para a alteração.

### 6.3.2. Extração de DNA

Para extração de DNA pelo kit MiniBlood (Qiagen), utilizou-se células em DMSO (separadas por ficoll) armazenadas a 80°C e/ou SP e/ou MO frescos; seguiu-se o protocolo estabelecido pelo fabricante. A outra metodologia de extração de DNA utilizada foi realizada após extração de RNA utilizando o reagente comercial Trizol (Invitrogen,) de acordo com o seguinte protocolo:

Após a retirada do RNA as amostras foram centrifugadas a 15682 g por 3 minutos, para que fosse retirado o restante da fase aquosa da extração de RNA. Em seguida, adicionam-se 300 µl de etanol 100% e mistura-se por inversão. Incubou-se por 3 minutos a temperatura ambiente sempre invertendo a amostra. Centrifugou-se à 16770 g por 5 minutos à 4°C e descartou-se o sobrenadante, que é utilizado somente para a extração de proteínas. Ressuspendeu-se o precipitado com 1000 µl de solução de citrato de sódio 0,1 M em etanol 10%. Em seguida incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente após a lavagem e misturou-se por inversão periodicamente durante a incubação. Após a incubação, centrifugou-se à 16770 g por 5 min à 4°C. Após 2 lavagens com a solução de citrato de sódio, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 1000 µl de etanol 75%. Incubou-se por 15 minutos à

temperatura ambiente, misturando por inversão periodicamente, e em seguida centrifugou-se as amostras à 16770 g por 5 minutos à 4°C. Após a centrifugação, o precipitado foi secado, para que fosse retirado o máximo de etanol possível deixando os tubos abertos. Com a retirada do excesso de etanol presente nos tubos, dissolveu-se o *pellet* em H<sub>2</sub>O Milli-Q até um volume que pudesse dissolver completamente o *pellet* transparente gelatinoso, incubou-se por 6 minutos no banho seco 68 °C. Misturou-se com a pipeta após a incubação anterior, para que o precipitado fosse melhor dissolvido e centrifugou-se à 13362 g por 10 minutos para que o material insolúvel, quando houvesse, fosse removido. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo.

### 6.3.3. Detecção de mutações no gene *FLT3*

Para detecção das mutações em *FLT3* do tipo D835 utilizou-se o método de PCR simples para a amplificação do éxon 17, utilizando iniciadores previamente descritos (NAKAO *et al.*, 1996), seguida da digestão dos produtos com enzima *EcoRV* (YAMAMOTO *et al.*, 2001). Para identificação de *FLT3*-DIT foi utilizado PCR para amplificações dos éxons 11 e 12, onde localiza-se o domínio justamembrana, usando iniciadores e condições previamente descritos (NAKAO *et al.*, 1996; EMERENCIANO *et al.*, 2008). Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 3% corado com Brometo de etídio e a positividade foi identificada pela presença de banda maior que 330 pares de bases (pb) (Figura 6.4).

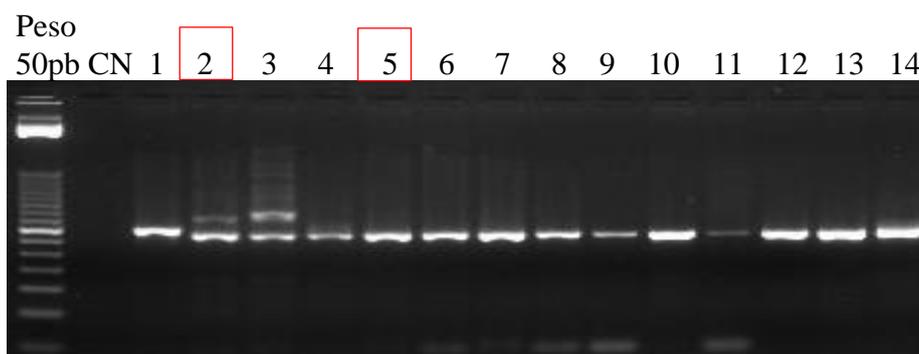


Figura 6.4: Eletroforese em gel de agarose 3% representando casos com *FLT3* mutado (duplicação *in tandem*). Números 1 (com perda do alelo selvagem), 2 e 3. CN: controle negativo. Considera-se que há duplicação *in tandem* quando o amplicon é maior que 330 pb.

### 6.3.4. Sequenciamento para detecção de mutações no gene *NOTCH1*, *IL7R*, *FBXW7*, *NRAS*, *KRAS*

Para o gene *NOTCH1* amplificamos os éxons 26, 27 e 34, sendo que estes éxons contém os domínios: HD, PEST e TAD onde se localizam as possíveis mutações. Utilizamos iniciadores descritos por Weng *et al.* (2004) e condições descritas por Mansur *et al.*, (2011). Foram necessárias 11 reações de PCR para cada caso para o completo rastreamento dessas regiões. Para o gene *FBXW7* amplificamos os éxons 9 e 10, onde se concentra a maioria das mutações e utilizamos metodologia e iniciadores previamente descritos (KOX *et al.*, 2010). Para o *IL7R* amplificamos o éxon 6 (ZENATTI *et al.*, 2011) e para o *NRAS* e *KRAS* foram amplificados a região dos códons 12 e 13 com iniciadores previamente descritos para o *KRAS* (BORNHOLDT *et al.*, 2008) e *NRAS* (LIANG *et al.*, 2006). E para identificação das mutações utilizamos o sequenciamento direto.

Os produtos de PCR do gene, foram purificados de acordo com o protocolo especificado no kit utilizado, *ilustra GFX PCR DNA and GEL Band Purification kit* (GE health care). Em gel de agarose de 1,5% foram aplicados 5 µL de cada produto resultante da purificação, e para estimar a quantidade de DNA nos produtos purificados, aplicou-se no gel 2 µL de *Low DNA Mass Ladder* (Invitogen). O gel de agarose foi corado com brometo de etídio, para verificar a presença e a quantidade de produtos efetivamente purificados.

Para reação de sequenciamento foram utilizados a quantidade de produto purificado recomendados pela Applied Biosystems que é proporcional ao tamanho do amplicon gerado no PCR. Para amplicons entre 200-500 pares de base é necessário de 3-10 ng DNA, no caso, o amplicon do *IL7R*- éxon 6, é de 278 pares de bases, estando nessa faixa.

Distribuiu-se o volume dos purificados contendo 10 ng de DNA, os respectivos primers senso e anti-senso (0,5 µL de cada primer com concentração = 10 µM) e água milli-q ou estéril (quando necessário para completar o volume) na placa de 96 poços, perfazendo um volume final 7,5 µL por poço. Para cada amostra, adicionamos 1 µL de BigDye e 1,5 µL de Tampão 5x, somando 2,5 µL da mistura para cada poço da placa; colocou-se, então a placa no termociclador com a seguinte ciclagem: 94 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos; com 40 repetições desse mesmo ciclo.

Após a reação de sequenciamento foi feita uma precipitação das amostras para retirada de dNTPs livres que podem interferir na leitura da sequência de DNA no analisador de DNA.

Centrifugou-se brevemente (spin) a placa contendo os produtos da ciclagem, adicionou-se 30 µL de isopropanol 75% em cada poço da placa. Vortexou-se a placa por 10 segundos; e depois esta foi mantida em repouso, por 15 minutos, sob abrigo da luz. Em seguida, centrifugou-se a placa por 45 minutos à 2683 g à 4 °C. Verteu-se a placa sobre papel-toalha e, através de movimentos circulares vigorosos, apoiando a placa sobre uma bancada, descartou-se o sobrenadante. Posteriormente adicionou-se 50 µL de etanol 75% em cada poço da placa e centrifugou-se por 15 minutos à 2683 g à 4 °C; descartou-se o sobrenadante usando papel-toalha, e para a completa secagem da placa, utilizou-se novamente o papel-toalha invertendo a placa nele, em seguida levou-se para uma breve centrifugação, para retirar qualquer resquício de etanol da placa, deixando chegar até 60 g e interrompeu-se a centrifugação. Colocou-se a placa no termociclador à 60 °C por 10 minutos, sob abrigo da luz.

Após o processo de precipitação, os produtos de sequenciamentos foram preparados para serem submetidos à eletroforese no sequenciador. Para o procedimento de desnaturação, utilizou-se a formamida, fator altamente desnaturante, que permite a separação da dupla-fita de DNA. Adicionou-se 10 µL de formamida em cada poço da placa seca, em seguida centrifugou-se brevemente para permitir o preenchimento correto de cada poço, posteriormente colocou-se a placa no termociclador à 95 °C por 5 minutos, sob abrigo da luz. Logo após o término do aquecimento, colocou-se a placa num recipiente com gelo, temperatura aproximada de 4 °C por 10 minutos, em seguida centrifugou-se brevemente para permitir que os produtos aderidos às paredes dos poços se concentrassem ao fundo.

As placas foram analisadas no sequenciador automático Genetic Analyser ABI 3500 (Applied Biosystems). Os reagentes usados nas reações de PCR e de precipitação estavam de acordo com o tipo de sequenciador utilizado, pertencentes ao kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador foram analisados com o auxílio do programa *Mutation Explorer Surveyor* versão (4.0.9) e *Bio Edit sequence Alignment Editor* versão 7.1 a fim de se identificar ou não a ocorrência de mutações na sequência do DNA.

Nas Figuras 6.5, 6.6, 6.7, 6.8 e 6.9 exemplos de mutações nos genes *NOTCH1*, *FBXW7*, *NRAS* e *IL7R*,

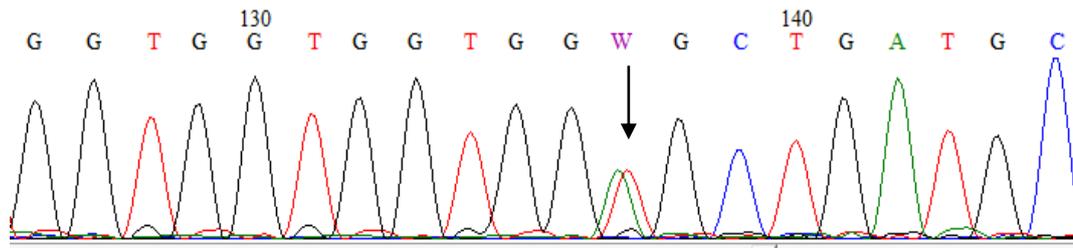


Figura 6.5. Mutação pontual em heterozigose no domínio HD, éxon 26 do *NOTCH1*. Troca no nucleotídeo 4733 do cDNA (c.4733) de uma Timina (T) por Adenina (A) (T>A), representado na figura pela letra W. Referência *GenBank* (NM\_0176717.3)

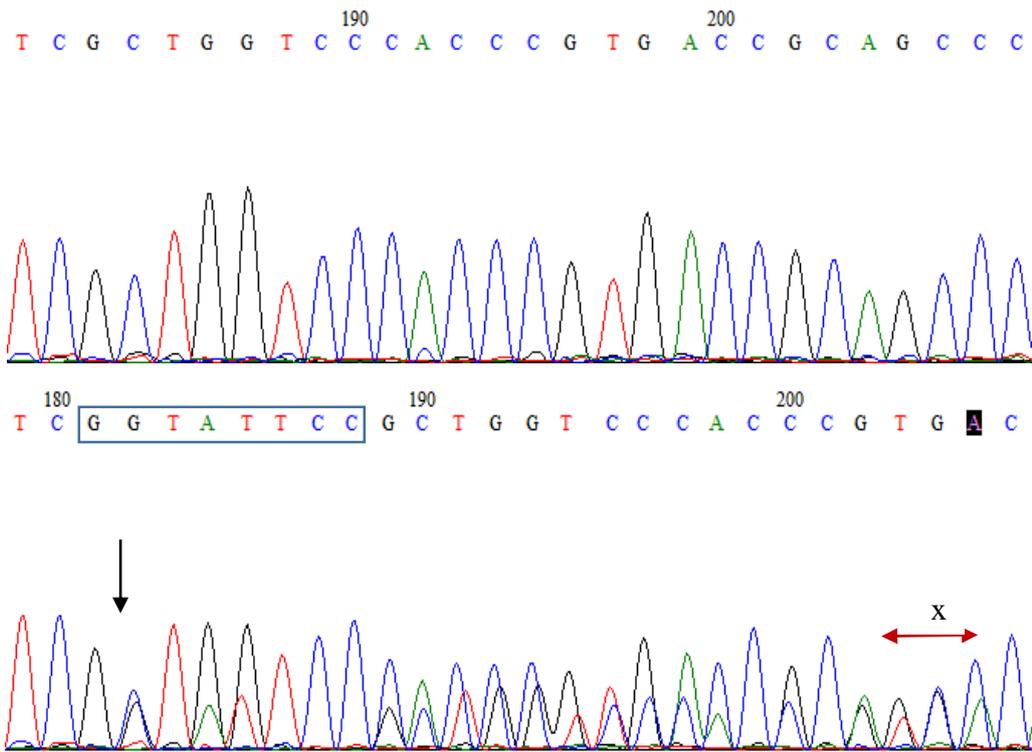


Figura 6.6. Mutação complexa (indel) em heterozigose no domínio PEST, éxon 34 do *NOTCH1*. Eletroferograma superior mostrando sequencia referência, e no inferior, inserção de GTATTCCG (insGTATTCCG) (caixa azul) entre os nucleotídeos 7413 e 7414 do cDNA (c.7413\_7414) (seta). Como resultado desta mutação o códon de parada TGA (X) foi gerado (Seta vermelha). Referência *GenBank* (NM\_0176717.3).

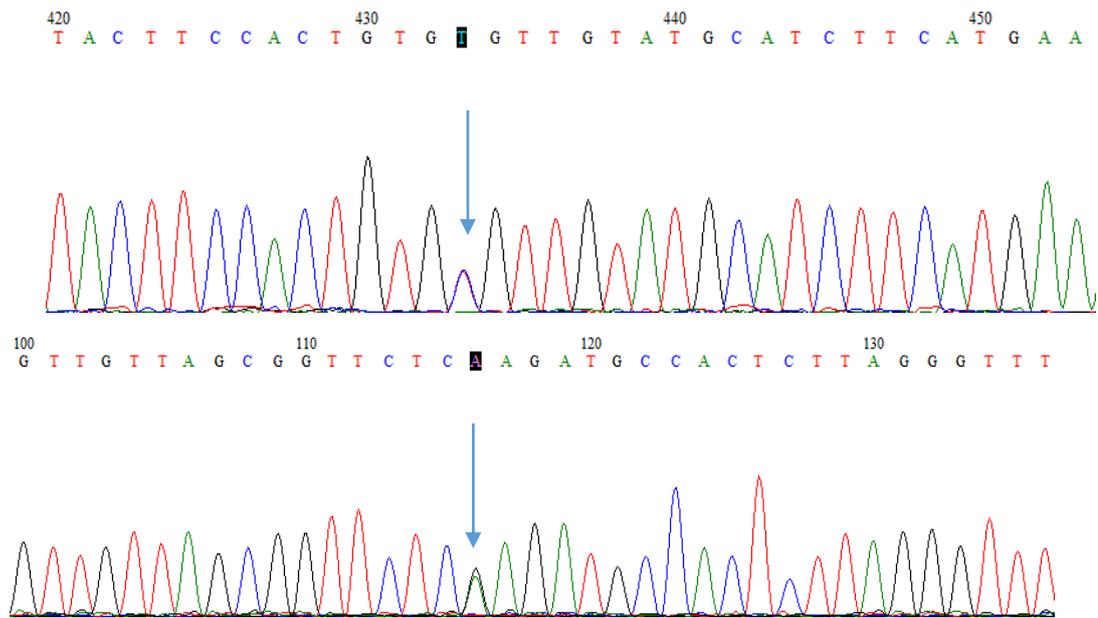


Figura 6.7. Mutação pontual em heterozigose nos éxons 9 e 10 do *FBXW7*. Eletroferograma superior mostrando mutação no nucleotídeo 1393 do cDNA (c.1393) ocorrendo a troca de uma Citosina (C) por Timina (T) (C>T) no éxon 9, alterando Arginina 465, (R) por Cisteína (C). Eletroferograma inferior mostrando mutação no nucleotídeo 1436 do cDNA (c.1436) ocorrendo a troca de Guanina (G) por Adenina (A) (G>A), no éxon 10, alterando Arginina (R) 479 por Glutamina (Q). Referência *GenBank* (NM\_001013415.1).

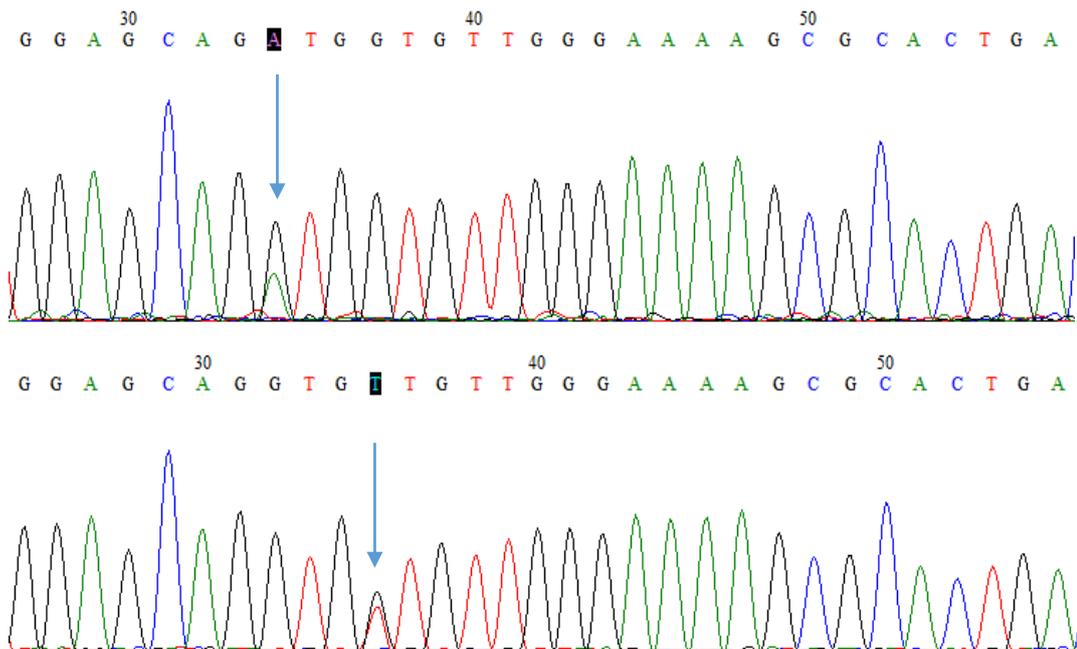


Figura 6.8. Mutação pontual em heterozigose nos códon 12 e 13 do *NRAS*. Eletroferograma superior mostrando mutação no nucleotídeo 35 do cDNA (c.35) ocorrendo a troca de uma Guanina (G) por Adenina (A) (G>A), alterando a Glicina (G) do codón 12 por ácido aspártico (D). Eletroferograma inferior mostrando mutação no nucleotídeo 38 do cDNA (c.38) ocorrendo a troca de uma Guanina (G) por Timina (T) (G>T), alterando Glicina (G) do codón 13 por Valina (D). Referência *GenBank* (NM\_002524.4).

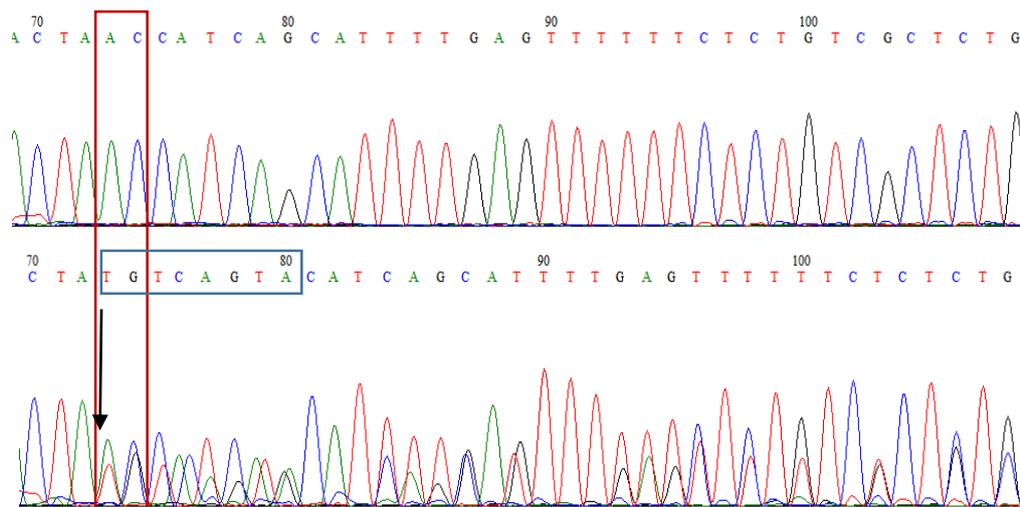


Figura 6.9. Mutação complexa (indel) em heterozigose do *IL7R* no éxon 6. Eletroferograma superior mostrando sequência referência WT, e no inferior, deleção de AC (del AC) (caixa vermelha) e inserção de TGTCAGTA (insTGTCAGTA) (caixa azul) entre os nucleotídeos 732 e 733 do cDNA (c. 732\_733) (seta). Referência *GenBank* (NG\_95671.1) (NM\_2184.3).

#### 6.4 Análises Estatísticas

Foi feita a análise exploratória e descritiva inicial dos dados, estimando-se medianas para as variáveis quantitativas e frequências absolutas e relativas para as qualitativas. As variáveis estudadas apresentaram distribuição assimétrica, assim, utilizaram-se testes não-paramétricos. Para a avaliação da distribuição das variáveis categóricas foram aplicados os testes Exato de Fisher ou Qui-Quadrado. Para a comparação de variáveis contínuas utilizou-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (comparação de dois grupos) ou *Kruskal wallis* (mais de dois grupos).

Para determinar pontos de corte, sensibilidade, especificidade e acurácia da expressão celular do CD117 e CD135 como preditoras de alterações moleculares, utilizou-se a Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

Para análises de sobrevida, em 60 meses, foi calculada a sobrevida global (SG), que se refere ao tempo desde o diagnóstico até o óbito ou último follow-up dos pacientes. E a sobrevida livre de eventos (SLE) que se refere ao tempo desde o diagnóstico até o desfecho considerado: óbito ou recaída. O tempo de *follow-up* dos pacientes que tiveram perda de seguimento foi

censurado na data do último contato identificado. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de *Kaplan-Meier* e diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de *log-rank*.

Para as análises dos dados utilizou-se o *software* SPSS (SPSS version 18.0 Inc, Chicago, IL, EUA) e *software* PRISM (PRISM, *Graphpad*, La Jolla, CA, USA). Para todos os testes foi considerado o nível mínimo de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Para comparação dos subtipos maturativos em relação às variáveis demográficas, clínicas, presença de marcadores imunofenotípicos, alterações moleculares e SLE, consideramos cada subtipo individualmente e comparamos com todos os demais subtipos juntos, como sendo um único grupo.

## **6.5 Aspectos Éticos**

Este projeto teve aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa do INCa (CEP-INCa) e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (CEP/INCA#117/12; CEP-CONEP: PB #888.277).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Caracterização Clínico-demográfica das amostras

As principais características demográficas de 189 pacientes estão descritas na Tabela 7.1. A idade variou de 13 meses a 18 anos, com mediana de 9 anos, de acordo com o diagnóstico. Houve predominância do sexo masculino, com uma proporção de 3:1 (masculino:feminino). Em relação à cor da pele, a maior frequência foi de não-branca (60%). A distribuição dos casos por regiões do Brasil, demonstrou um predomínio dos casos oriundos da Região Nordeste (54%), seguido da Região Centro-Oeste (25%). A maioria dos pacientes (52,4%) apresentaram leucometria  $\geq 100 \times 10^9/L$ . As manifestações clínicas como alargamento do mediastino e SNC comprometido estavam presentes em 40,2% e 7,4% dos casos respectivamente.

Em relação ao protocolo de tratamento 55% dos casos foram tratados de acordo com o GBTLI-99 (LLA-Alto Risco) e 42,9% pelo protocolo BFM-LLA.

Inicialmente testamos se os casos excluídos (n = 15) poderiam introduzir viés de seleção. Foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo do estudo e os casos excluídos em relação às principais variáveis clínico-laboratoriais (Tabela 7.1).

Tabela 7.1. Comparação das características demográficas dos pacientes com leucemia linfoblástica de células-T no período de 2005-2014 incluídos e excluídos no estudo.

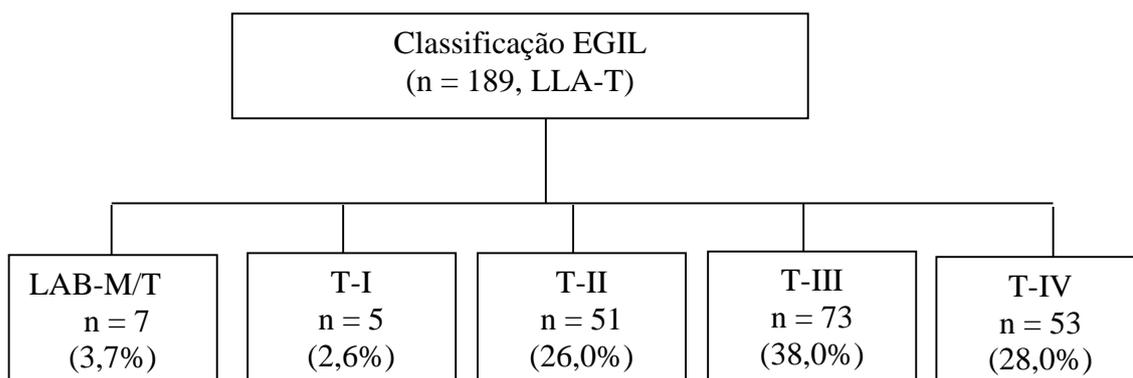
<b>Características</b>	<b>Total n (%)</b>	<b>Casos excluídos n (%)</b>	<b>Grupo do estudo n (%)</b>	<b>p-valor n (%)</b>
<b>Idade (anos)</b>				0,4
<10	111 (54,4)	10 (66,7)	101 (53,4)	
10-18	93 (45,6)	5 (33,3)	88 (46,6)	
<b>Sexo</b>				0,54
Masculino	152 (74,5)	10 (66,7)	142 (75,1)	
Feminino	52 (25,5)	5 (33,3)	47 (24,9)	
<b>Cor da pele</b>				0,76
Branca	78 (38,2)	4 (26,7)	74 (39,2)	
Não-branca	124 (60,8)	9 (60)	115 (60,8)	
SI	2 (1,0)	2 (13,3)	0	
<b>Região</b>				0,9
Nordeste	110 (53,9)	7 (46,7)	103(54,5)	
Central	51 (25)	4 (26,6)	47(24,9)	
Sudeste	41 (20,1)	4 (26,6)	37(19,6)	
Sul	2 (1,0)	0	2(1,1)	
<b>Leucometria (x10<sup>9</sup>/L)</b>				0,14
< 50	62 (30,4)	6 (40,0)	56(29,6)	
≥ 50 < 100	39 (19,1)	5 (33,3)	34(18)	
≥100	103 (50,5)	4 (26,7)	99(52,4)	
<b>Alargamento de mediastino</b>				0,08
Sim	78 (38,2)	2 (13,3)	76 (40,2)	
Não	122 (59,8)	11 (73,3)	111 (58,7)	
SI	4 (2,0)	2 (13,3)	2 (1,1)	
<b>Acometimento do Sistema nervoso central</b>				0,22
Sim	14 (6,7)	0	14 (7,4)	
Não	179 (87,7)	13(86,7)	166 (87,8)	
SI	11 (5,4)	2(13,3)	9 (4,8)	
<b>Protocolo de tratamento</b>				0,6
GBTLI-99	112 (54,9)	8 (53,3)	104 (55)	
BFM	85 (41,7)	4 (26,7)	81(42,9)	
SI	7 (3,4)	3 (20,0)	4 (2,1)	
<b>Total</b>	<b>204(100)</b>	<b>15 (7,4)</b>	<b>189(92,6)</b>	

SI- sem informação, GBTLI- Grupo Brasileiro para tratamento de leucemia da infância;  
BFM, Berlin-Frankfurt-Münster. p-valor calculado pelo teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado;

## 7.2 Caracterização dos perfis imunofenotípico e subtipos maturativos

### 7.2.1. Caracterização do perfil imunofenotípico de acordo com a classificação EGIL (1995)

Para hegemonia das futuras análises foi realizada uma revisão da coorte em relação à classificação dos subtipos de acordo com a classificação EGIL. Observamos a predominância de casos do subtipo T-III (CD1a<sup>pos</sup>) e a menor frequência de casos T-I (pró-T) (Figura 7.1).



EGIL: *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*; LAB-M/T: Leucemia aguda bifenotípica mielóide/T.

Figura 7.1: Frequência dos subtipos de acordo com a classificação EGIL.

Importante destacar que foram identificados 22 casos (11,6%) com expressão celular do TCR $\alpha\beta$  e 19 casos (10,4%) com TCR $\gamma\delta$ . Destes, 18 casos apresentarem expressão do CD1a<sup>pos</sup> (T-III). Nos casos classificados como LAB-M/T (n = 7), os marcadores de células-T e mielóides estão detalhados na Tabela 7.2. E na Figura 7.2 temos exemplo de um caso de LAB-M/T.

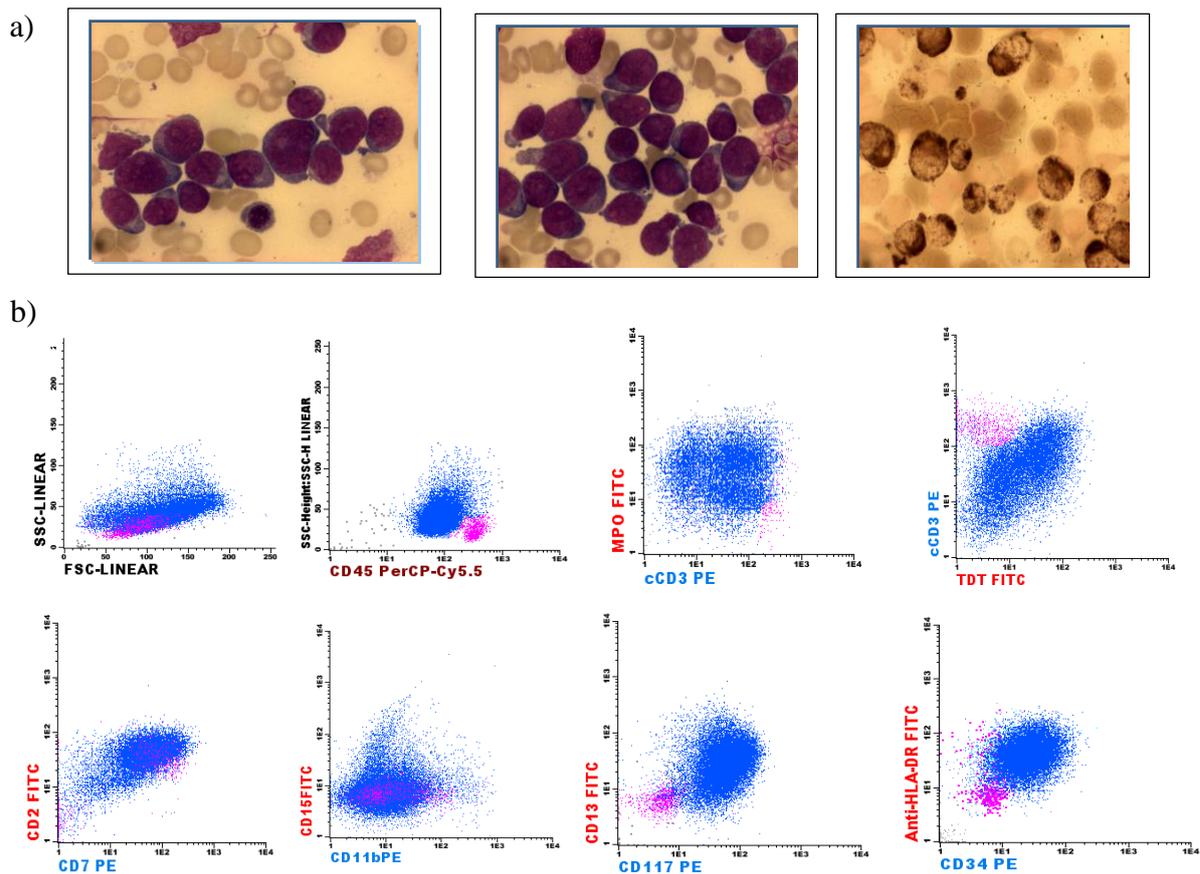


Figura 7.2. Exemplo de casos de LAB-M/T. a) Morfologia dos blastos e citoquímica positiva para *Sudan Black B*. b) *Dot plots* mostrando o perfil imunofenotípico dos blastos em azul e linfócitos em rosa. O exemplo ilustrado representa o caso 7 do Quadro 7.2.

Quadro 7.2. Marcadores celulares mielóides, de células tronco hematopoéticas e T nas Leucemias Agudas Bifenóticas de Fenótipo Mielóide T

Casos	Marcadores positivos
1	CD2, CD5, CD11b, CD13, CD33, CD34, HLA-DR
2	CD2, CD5, CD8, CD11b, CD13, CD33, CD15, HLA-DR, TdT, CD117,
3	TdT, CD117
4	CD2, CD4, CD5, CD8, CD33, TdT
5	CD1a, CD2, CD4, CD13, TdT
6	CD2, CD3m, CD4, CD5, CD8, CD11b, CD13, CD14, HLA-DR, TdT
7	CD2, CD11b, CD13, CD34, HLA-DR, TdT

Todos os casos foram positivos para o CD3 intracitoplasmático, CD7 e aMPO.

Os Caso 2 e 3 não foram testados para o CD34, e o caso 3 não foi testado para CD4.

## 7.2.2. Caracterização do perfil imunofenotípico dos casos de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras T precoces - LLA-ETP

Para identificação de leucemias com perfil de LLA-ETP, aplicamos os critérios da classificação de Coustan-Smith *et al.* (2009) e o sistema de score proposto por Inukai *et al.* (2011). Todos os casos previamente classificados como T-I preenchem critério para serem classificados como LLA-ETP, além de 6 casos classificados previamente como T-II pela classificação EGIL, que foram positivos para o CD5, porém com expressão em menos de 75% dos blastos. Identificamos assim, 11 casos classificados como ETP, que também alcançavam o valor do score  $\geq 7$  para serem classificados como LLA-ETP por Inukai *et al.* (2011). Estes casos estão identificados na Tabela 7.2 como ETP<sup>CS+IK</sup>. Obtivemos 7 casos que preenchem os critérios de Inukai *et al.* (2011), porém não preenchem os critérios de Coustan-Smith *et al.* (2009). Esses casos identificados na Tabela 7.2 como ETP<sup>IK</sup>, foram previamente classificados como T-II pela EGIL. Na tabela 7.2 podemos observar o perfil dos marcadores celulares desses casos e na Figuras 7.3 um exemplo de um caso de LLA-ETP.

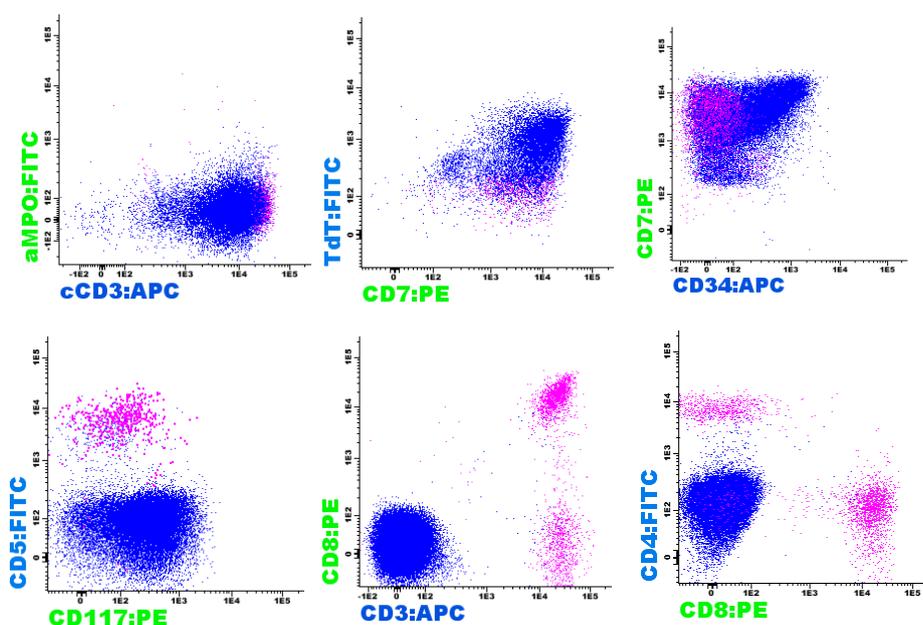


Figura 7.3. Exemplo de LLA-ETP. Blastos em azul e linfócitos em rosa. Os blastos são cCD3<sup>pos</sup>, CD7<sup>pos</sup>, TdT<sup>pos</sup>, CD34<sup>pos</sup>, CD117<sup>pos</sup> e aMPO<sup>neg</sup>, CD2<sup>neg</sup>, CD5<sup>neg</sup>, CD3<sup>neg</sup>, CD4<sup>neg</sup> e CD8<sup>neg</sup> c-citoplasma.

Tabela 7.2. Porcentagem de blastos positivos para os marcadores celulares de superfície utilizados para a classificação dos casos de LLA-ETP

Casos	Critério	Score	CD1a	CD5	CD8	CD2	CD3	CD4	CD10	CD56	CD11b	CD13	CD33	CD117	HLA-DR	CD34
1	ETP <sup>CS+IK</sup>	10	2	74	4	0	6	2	75	53	8	73	6	72	nr	98
2	ETP <sup>CS+IK</sup>	12	0	1	1	1	2	1	0	nr	0	85*	85*	93	57	31
3	ETP <sup>CS+IK</sup>	10	0	73	0	0	0	0	0	nr	nr	nr	nr	nr	nr	75
4	ETP <sup>CS+IK</sup>	11	0	10	0	0	1	1	0	0	10	51	45	53	41	58
5	ETP <sup>CS+IK</sup>	12	1	73	1	1	4	2	16	1	25	21	43	4	1	89
6	ETP <sup>CS+IK</sup>	8	3	64	2	3	0	0	0	0	51	0*	0*	11	0	1
7	ETP <sup>CS+IK</sup>	9	5	0	0	5	15	0	0	nr	3	11	27	92	0	57
8	ETP <sup>CS+IK</sup>	11	4	0	0	4	9	0	24	nr	nr	2*	2*	24	95	95
9	ETP <sup>CS+IK</sup>	9	4	54	4	4	0	0	20	nr	97	0	31	11	4	49
10	ETP <sup>CS+IK</sup>	4	0	74	0	0	0	0	32	0	nr	0	0	nr	nr	50
11	ETP <sup>CS+IK</sup>	11	2	0	0	2	1	0	7	0	51	3	37	8	16	30
12	ETP <sup>IK</sup>	8	16	58	2	63	3	0	32	1	9	0	87	nr	0	1
13	ETP <sup>IK</sup>	7	3	74	23	61	0	0	0	0	70	47*	47*	38	nr	96
14	ETP <sup>IK</sup>	9	2	74	19	2	12	18	7	69	23	89	9	20	17	80
15	ETP <sup>IK</sup>	7	1	63	32	2	2	14	4	3	32	48*	48*	26	3	72
16	ETP <sup>IK</sup>	9	5	72	5	6	1	12	3	nr	nr	nr	0	nr	nr	60
17	ETP <sup>IK</sup>	8	9	78	4	3	1	28	9	nr	nr	36*	36*	1	8	28
18	ETP <sup>IK</sup>	7	13	90	5	10	0	0	9	nr	98	0	94	7	27	80

CS: Coustan-Smith; IK:Inukai; nr: Não realizado, \*Testados no mesmo tubo. Todos os casos foram positivos para cCD3, CD7 e negativos para o aMPO.

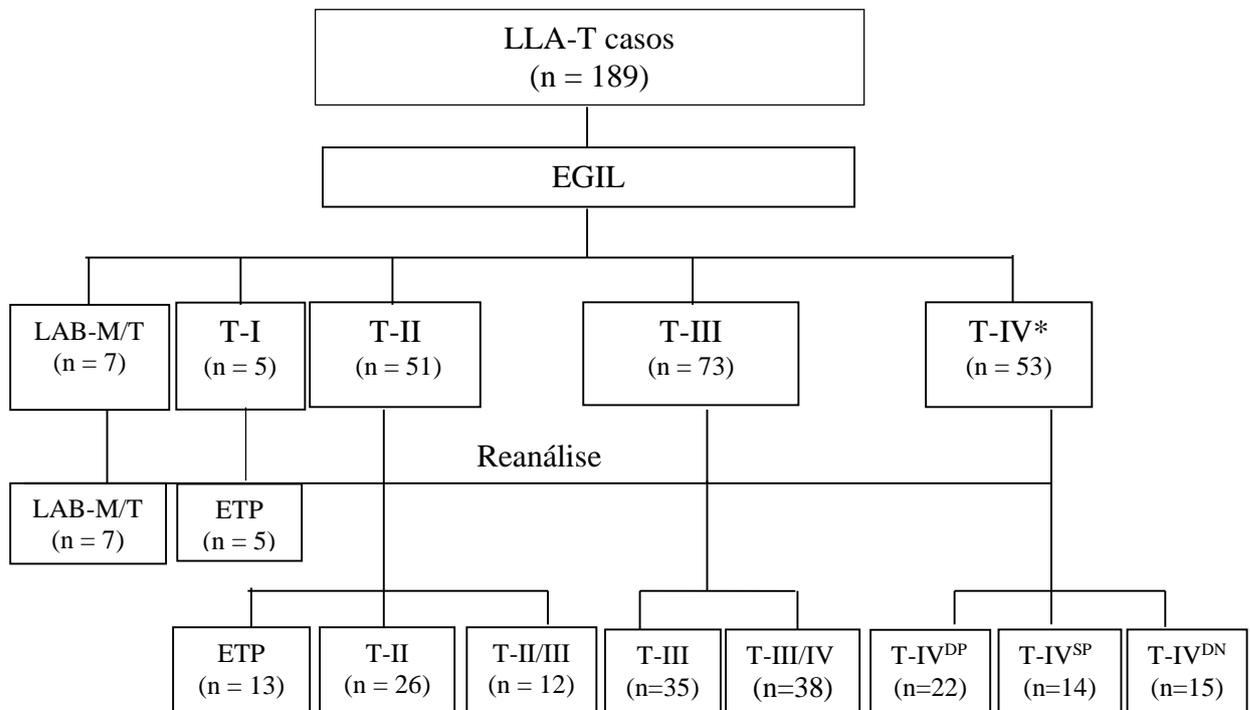
### 7.2.3. Caracterização do perfil imunofenotípico dos subtipos dos casos leucemia linfoblástica agudas de células-T

Após a identificação das LAB-M/T, LLA-ETP, para os demais casos fizemos uma análise das variações de fenótipos dentro dos principais grupos da classificação EGIL (T-II, T-III, T-IV) e os reclassificamos conforme a Figura 7.4.

Para as T-II (n = 38), após reclassificação com inclusão dos subtipos LLA-ETP, encontramos 12 casos (32%) com um fenótipo intermediário entre T-II e T-III (Figura 7.5), por apresentarem-se duplo positivos para CD4<sup>pos</sup>/CD8<sup>pos</sup> (DP) e CD1a<sup>neg</sup>. Portanto, denominamos estes casos de T-II/III.

Entre os 73 classificados como T-III (CD1a<sup>pos</sup>), encontramos 35 casos que eram mCD3<sup>neg</sup> e permaneceram no grupo T-III. Trinta e oito casos, no entanto, foram mCD3<sup>pos</sup>, sendo então chamados de grupo T-III/IV. Ainda dentro deste grupo com CD1a<sup>pos</sup> e mCD3<sup>pos</sup> (Figura 7.5), 10 casos eram TCRαβ<sup>pos</sup> e 8 casos eram TCRγδ<sup>pos</sup>. Predominância de CD4<sup>pos</sup>/CD8<sup>pos</sup> foi observada nos dois subgrupos (Tabela 7.3).

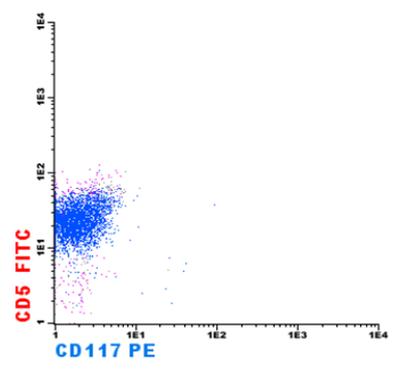
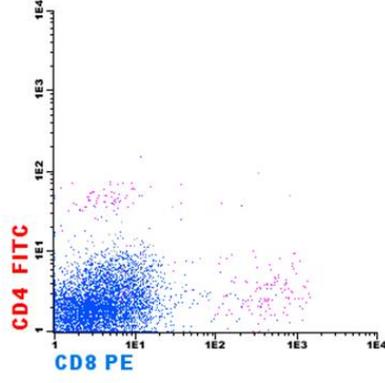
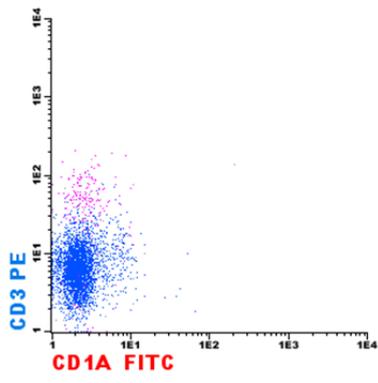
Entre os 53 casos classificados como T-IV (CD1a<sup>neg</sup> e mCD3<sup>pos</sup>), 12 casos foram positivos para TCRαβ e 10 para TCRγδ. A maioria 42,3% (n = 22) foi CD4<sup>pos</sup>/CD8<sup>pos</sup> (DP), 26,9% (n = 14) simples positivo (SP) para CD4 ou CD8, e 28,8% (n = 15) duplo negativo (DN) para esses marcadores (Figura 7.5). Um sumário com resultados dos marcadores CD2, CD5, CD4, CD8, TCRαβ e TCRγδ está descrito na Tabela 7.3.



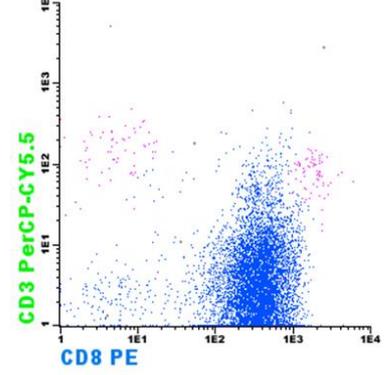
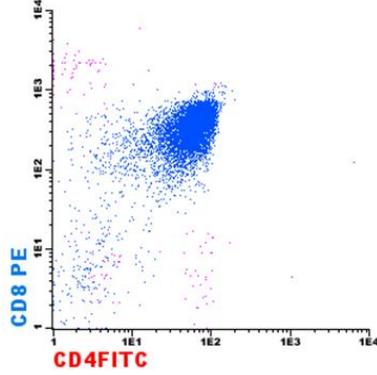
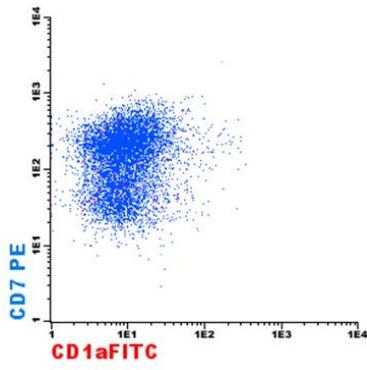
\*Dois casos classificados como T-IV, não puderam ser reclassificados em DP, SP e DN por não terem sido testados para o CD4. LABM/T: leucemia aguda bifenotípica mielóide-T; DP: duplo positivo para CD4 e CD8, SP: simples positivo para CD4 ou CD8, DN: duplo negativo para CD4 e CD8.

Figura 7.4: Fluxograma de classificação dos subtipos maturativos segundo classificação EGIL e reclassificação.

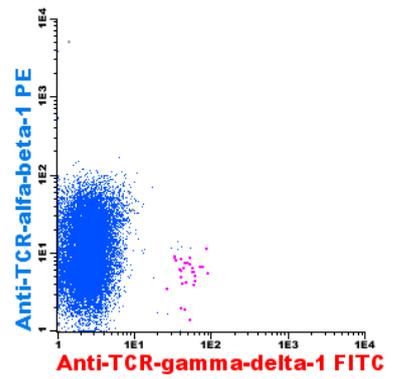
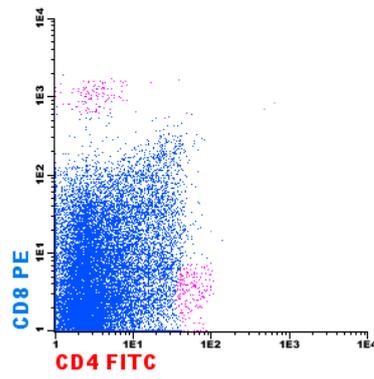
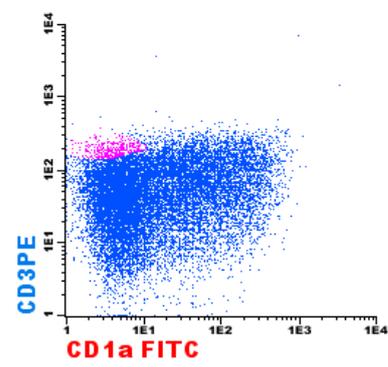
a) **T-II**



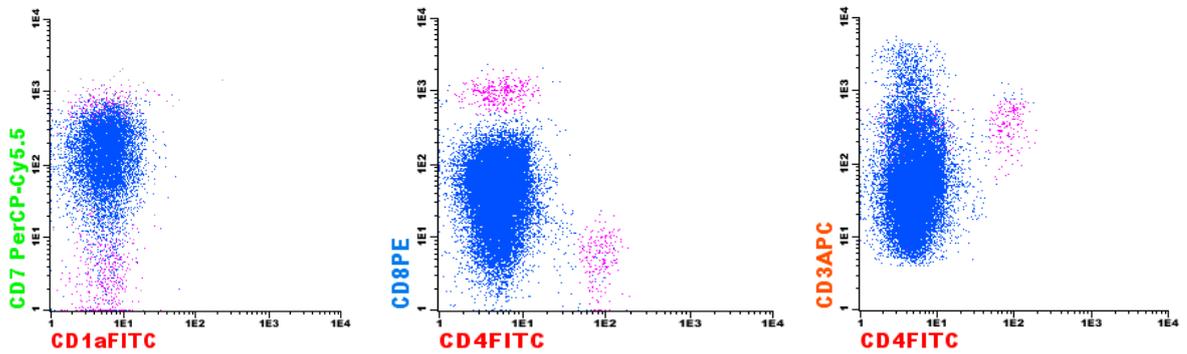
b) **T-II/III**



c) **T-III/IV-TCR $\alpha\beta$ <sup>pos</sup>**



d) T-IVSP



e) T-IVDN- TCR $\gamma\delta$ <sup>pos</sup>

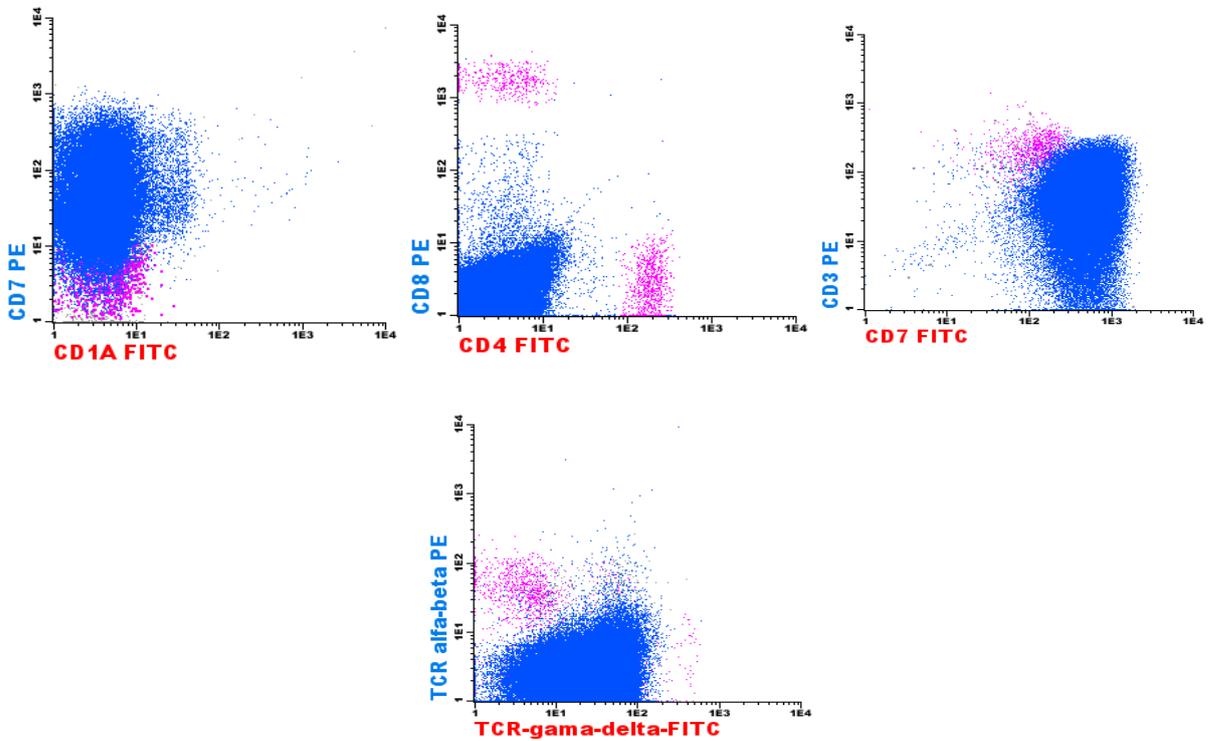


Figura 7.5: Exemplos de subtipos maturativos de LLA-T. Blastos em azul e linfócitos em rosa. a) Subtipo T-II, mostrando blastos mCD3<sup>neg</sup>, CD1a<sup>neg</sup>, CD5<sup>pos</sup>, CD8<sup>neg</sup>, CD4<sup>neg</sup> b) Subtipo T-II/III com blastos CD1a<sup>neg</sup>, mCD3<sup>neg</sup>, CD8<sup>pos</sup>, CD4<sup>pos</sup> c) Subtipo T-III/IV, com blastos mCD3<sup>pos</sup>, CD1a<sup>pos</sup>, CD4<sup>pos</sup>, CD8<sup>pos</sup>, TCR $\alpha\beta$ <sup>pos</sup>, TCR $\gamma\delta$ <sup>neg</sup> d) Subtipo T-IVSP, com blastos CD1a<sup>neg</sup>, CD8<sup>pos</sup>, CD4<sup>neg</sup>, mCD3<sup>pos</sup> e) Subtipo T-IVDN, com blastos CD7<sup>pos</sup>, CD1a<sup>neg</sup>, mCD3<sup>pos</sup>, CD4<sup>neg</sup>, CD8<sup>neg</sup>, TCR $\gamma\delta$ <sup>pos</sup>, TCR $\alpha\beta$ <sup>neg</sup>.

Tabela 7.3. Frequência de expressão celular dos marcadores de diferenciação de células-T nos subtipos pós-reclassificação

Marcadores	Total	LLA-T						
		II	II/III	III	III/IV	IV <sup>DP</sup>	IV <sup>SP</sup>	IV <sup>DN</sup>
		CD1a <sup>neg</sup> /CD3m <sup>neg</sup>		CD1a <sup>pos</sup> /CD3m <sup>neg</sup>	CD1a <sup>pos</sup> /CD3m <sup>pos</sup>		CD1a <sup>neg</sup> /CD3m <sup>pos</sup>	
CD2 <sup>neg</sup> /CD5 <sup>neg</sup>	5/148 (3,4)	1/22(4,5)	1/11(9,1)	0/33(0)	1/33(3,0)	1/21(4,5)	1/13(7,7)	0/15(0)
CD2 <sup>pos</sup> /CD5 <sup>neg</sup>	3/148 (2,0)	0/22(0)	0/11(0)	1/33(3,0)	0/33(0)	1/21(4,5)	1/13 (7,7)	0/15(0)
CD2 <sup>neg</sup> /CD5 <sup>pos</sup>	24/148 (16,2)	6/22(27,3)	1/11(9,1)	2/33 (6,1)	4/33(12,1)	1/21(4,5)	2/13(15,4)	8/15(53,3)
CD2 <sup>pos</sup> /CD5 <sup>pos</sup>	116/148 (78,4)	15/22(68,2)	9/11(81,8)	30/33(90,9)	28/33(84,8)	18/21(85,7)	9/13(69,2)	7/15(46,7)
CD4 <sup>neg</sup> /CD8 <sup>neg</sup>	26/152 (17,1)	11/25(44,0)	na	0/32(0)	0/35(0)	na	na	15/15(100)
CD4 <sup>pos</sup> /CD8 <sup>neg</sup>	6/152 (5,0)	0/25(0)	na	0/32(0)	1/35(2,9)	na	5/14(35,7)	na
CD4 <sup>neg</sup> /CD8 <sup>pos</sup>	28/152 (18,4)	14/25(56,0)	na	0/32(0)	5/35(14,3)	na	9/14(64,3)	na
CD4 <sup>pos</sup> /CD8 <sup>pos</sup>	93/152 (61,2)	0/25(0)	12/12(100)	32/32(100)	29/35(82,8)	22/22(100)	na	na
TCR $\alpha\beta$ <sup>pos</sup>	22/72 (30,5)	na	na	na	10/33(30,3)	6/15(40,0)	3/9(33,3)	2/13(15,4)
TCR $\gamma\delta$ <sup>pos</sup>	18/72 (25,0)	na	na	na	8/33(24,2)	3/15(20,0)	3/9(33,3)	4/13(30,8)
<b>Total</b>	<b>n = 162</b>	<b>n = 26</b>	<b>n = 12</b>	<b>n = 35</b>	<b>n = 38</b>	<b>n = 22</b>	<b>n = 14</b>	<b>n = 15</b>

Número de casos positivos/Total de casos testados (%); na: não se aplica, m: membrana

CD2 não foi testado em 10 casos: 4 T-II, 1T-II/III, 4 T-III/IV, 1 T-III; CD5 em 3 casos: T-III/IV, 1 caso T-IVSP; CD4 em 10 casos, 3 casos T- III, 3 casos T-III/IV, 1 casos T-II; Dois T-IV, não foram ser reclassificados em DP, SP e DN por não terem sido testados para o CD4.

#### 7.2.4 . Características demográficas e clínicas dos subtipos pós-reclassificação

A avaliação das características demográficas e clínicas, de acordo com os subtipos pós-reclassificação, pode ser vista na Tabela 7.4. Não foram observadas diferenças em relação à idade quando categorizadas em < 10 e ≥ 10 anos e nem quando comparadas as medianas (Figura 7.6). Quando comparamos a leucometria categorizada, observamos que 50% dos casos de LLA-ETP possuíam leucometria < 50 x 10<sup>9</sup>/L e 50% ≥ 100 x 10<sup>9</sup>/L ( $p = 0,04$ ), e possuíam mediana 84,6 x 10<sup>9</sup>/L (Figura 7.6). A maior mediana de leucometria observada foi do subtipo T-II/III, neste subtipo a maioria dos casos (66%) possuíam leucometria ≥ 100 x 10<sup>9</sup>/L. Em relação ao sexo, observamos que os casos como LAB-M/T, LLA-ETP e T-II/III obtiveram a proporção de sexo masculino para o feminino de 2:1 a 3:1. Entretanto, no T-IV<sup>DN</sup> esta proporção diminui para próximo de 1:1 com diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,042$ ). Observou-se também uma maior proporção do sexo masculino para o feminino nos subtipos T-III (4:1), T-III/IV (4,4:1), T-IV<sup>DP</sup> (6,3:1) e T-IV<sup>SP</sup> (3,7:1).

Tabela 7.4: Características clínicas e demográficas dos subtipos pós-reclassificação

Subtipo	Total	Idade <sup>a</sup>	p	SEXO M/F	p	Leucometria <sup>b</sup>	p	Mediastino Sim/NT	p
LAB <sup>MT</sup>	7	5/2	0,45	5/2	1,0	3/2/2	0,43	3/7 (42,9)	1,0
ETP	11	6/12	0,08	12/6	0,4	9/0/9	<b>0,04</b>	4/11 (36,4)	1,0
T-II	26	13/13	0,83	17/9	0,23	9/6/11	0,53	9/26 (34,6)	0,53
T-II/III	12	6/6	1,0	9/3	1,0	2/2/8	0,54	7/12 (58,3)	0,23
T-III	35	18/17	0,85	28/7	0,52	10/5/20	0,76	14/35 (40)	1,0
T-III/IV	38	25/13	0,1	31/7	0,4	8/11/19	0,11	16/37 (43,2)	0,71
T-IV <sup>DP</sup>	22	10/12	0,5	19/3	0,3	3/5/14	0,22	7/21 (33,3)	0,64
T-IV <sup>SP</sup>	14	8/6	1,0	11/3	1,0	4/3/7	0,94	5/14 (35,7)	0,78
T-IV <sup>DN</sup>	15	8/7	1,0	8/7	<b>0,042</b>	6/0/9	0,16	6/15 (40)	1,0
<b>Total</b>	<b>187</b>	<b>99/88</b>		<b>140/47</b>		<b>54/34/99</b>		<b>75/185(40,5)</b>	

<sup>a</sup> < 10 anos/ ≥ 10 anos; <sup>b</sup> <50/ ≥50<100 / ≥100 x 10<sup>9</sup>/L

p: p-valor calculado pelo teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado. P - valor foi calculado comparando cada subtipos individualmente *versus* todos os demais juntos de acordo com cada variável. NT: número total.

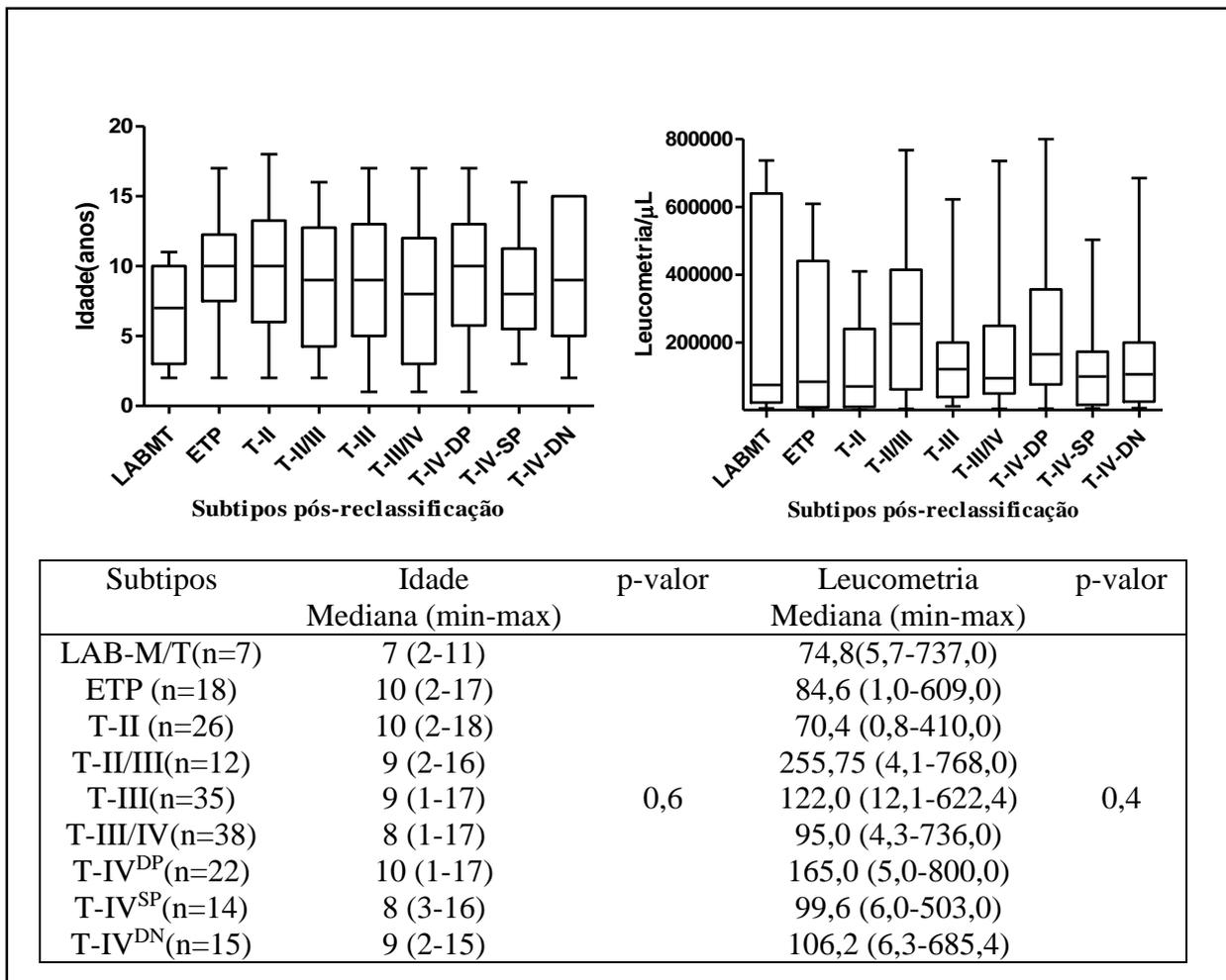


Figura.7.6: Comparação da mediana da idade e leucometria x 10<sup>9</sup>/L de acordo com os subtipos maturativos pós-reclassificação. Min: mínimo; max: máximo. As barras horizontais nos *Box plots* representam mediana, valores mínimo e máximo; p-valor calculado pelo teste de *Kruskal Wallis*.

### 7.2.5. Avaliação de marcadores não específicos de linhagem T em LLA-T

A identificação de CD34, CD117, HLA-DR, CD10, CD11b, CD16 e CD56 como expressão celular dos marcadores de células tronco, células precursoras, mielóides e NK nos subtipos maturativos pós-reclassificação são apresentados na Tabela 7.5.

Os marcadores de células tronco CD34 e HLA-DR foram positivos em 34,3% (61/178) e 15,6% (24/154), respectivamente, do total de casos. Entre as LLA-ETP 83,3% (15/18) foram CD34<sup>pos</sup> ( $p < 0,001$ ), por outro lado, o subtipo T-II/III foi associado à ausência de casos positivos para o CD34 ( $p = 0,02$ ). HLA-DR<sup>pos</sup> foi associado ao subtipo LAB-M/T e T-IV<sup>SP</sup> em que 57,1% (4/7) ( $p = 0,02$ ) e 45,5% (5/11) ( $p = 0,01$ ) dos casos, respectivamente, foram positivos para esse marcador.

CD13 ou CD33, CD117 e CD11b foram diferencialmente mais presentes em LAB-M/T e ETP. E ainda o CD13 ou CD33 no subtipo T-II, em contraste o subtipo T-III/IV foi associado a menor frequência de CD13<sup>pos</sup> ou CD33<sup>pos</sup> (3/31, 8,8%,  $p = 0,02$ ). Nos subtipos T-III e T-III/IV o CD117 foi predominante negativo ( $p = 0,04$  e  $p = 0,01$ ), respectivamente. O subtipo T-III foi o que apresentou menor frequência do CD11b, com apenas 4,2% (1/24) dos casos positivos ( $p = 0,02$ ). O CD10 foi positivo em 68 pacientes (38,2%) do total dos casos testados e em 21/37 (56,8%) dos casos com subtipo T-III/IV ( $p = 0,01$ ). Na Figura 7.7 podemos observar a distribuição dos marcadores positivos de acordo com os subtipos.

Tabela 7.5. Frequência dos marcadores celulares mielóides, de células tronco, células NK e CD10 nos subtipos maturativos pós-reclassificação

Subtipo	CD34 +/NT	<i>p</i>	HLA-DR +/NT	<i>p</i>	CD13/33 +/NT	<i>p</i>	CD117 +/NT	<i>p</i>	CD11b +/NT	<i>p</i>	CD10 +/NT	<i>p</i>	CD16 +/NT	<i>p</i>	CD56 +/NT	<i>p</i>
LABMT (n=7)	2/5 (40)	1,0	4/7 (57,1)	<b>0,01</b>	6/7 (85,7)	<b>0,03</b>	3/6 (50)	0,05	4/7 (57,1)	<b>0,03</b>	1/6 (16,7)	0,41	0/3 (0)	1,0	1/5 (20)	1,0
ETP (n=18)	15/18 (83,3)	<b>&lt;0,001</b>	4/13 (30,8)	0,12	12/16 (75)	<b>&lt;0,001</b>	8/14 (57,1)	<b>&lt;0,001</b>	8/13 (61,5)	<b>0,001</b>	5/18 (27,8)	0,5	0/8 (0)	1,0	2/8 (25)	0,6
T-II (n=26)	11/26 (42,3)	0,4	1/22 (4,5)	0,2	13/24 (54,2)	<b>0,02</b>	4/21 (19)	0,74	2/9 (22,2)	1,0	7/25 (28)	0,4	1/12 (8,3)	0,5	2/12 (16,7)	1,0
T-II/III (n=12)	0/11 (0)	<b>0,02</b>	3/10 (30)	0,2	3/12 (25)	1,0	1/9 (11,1)	1,0	0/9 (0)	0,2	4/12 (33,3)	1,0	0/7 (0)	1,0	1/8 (12,5)	1,0
T-III (n=35)	7/32 (21,9)	0,2	2/28 (7,1)	0,3	6/31 (19,4)	0,2	0/19 (0)	<b>0,04</b>	1/24 (4,2)	<b>0,02</b>	17/32 (53,1)	0,06	0/19 (0)	0,6	1/21 (4,8)	0,2
T-III/IV (n=38)	11/36 (30,6)	0,6	1/28 (3,4)	0,05	3/31 (8,8)	<b>0,002</b>	0/27 (0)	<b>0,01</b>	2/22 (9,1)	0,24	21/37 (56,8)	<b>0,01</b>	1/16 (6,2)	1,0	5/15 (33,3)	0,06
T-IV <sup>DP</sup> (n= 22)	5/20 (25)	0,6	1/19 (5,3)	0,3	4/20 (20)	0,32	0/7 (0)	0,6	3/15 (20)	1,0	8/19 (42,1)	0,7	2/15 (13,3)	0,2	1/15 (6,7)	0,5
T-IV <sup>SP</sup> (n=14)	4/13 (30,8)	1,0	5/11 (45,5)	<b>0,02</b>	3/12 (25)	1,0	1/10 (10)	1,0	2/7 (28,6)	0,6	2/13 (15,4)	0,14	1/8 (12,5)	0,4	1/7 (14,3)	1,0
T-IV <sup>DN</sup> (n=15)	6/15 (40,0)	0,8	3/13 (23)	0,43	1/10 (10)	0,3	3/11 (27,3)	0,4	2/8 (25)	0,7	3/14 (21,4)	0,3	0/5 (0)	1,0	2/7 (28,6)	0,31
<b>Total</b>	<b>61/117</b> <b>(34,3)</b>		<b>24/130</b> <b>(15,6)</b>		<b>51/116</b> <b>(30,5)</b>		<b>20/105</b> <b>(19)</b>		<b>24/92</b> <b>(20,7)</b>		<b>68/110</b> <b>(38,2)</b>		<b>5/95</b> <b>(5,3)</b>		<b>16/100</b> <b>(16)</b>	

+ : número de casos positivos para o marcador; NT: número total de casos testados para o marcador; (%) de casos positivos de acordo com cada subtipo; p: p-valor calculado pelo teste Exato de *Fisher* ou Qui-quadrado. p - valor foi calculado comparando cada subtipo individualmente *versus* todos os demais juntos para cada marcador.

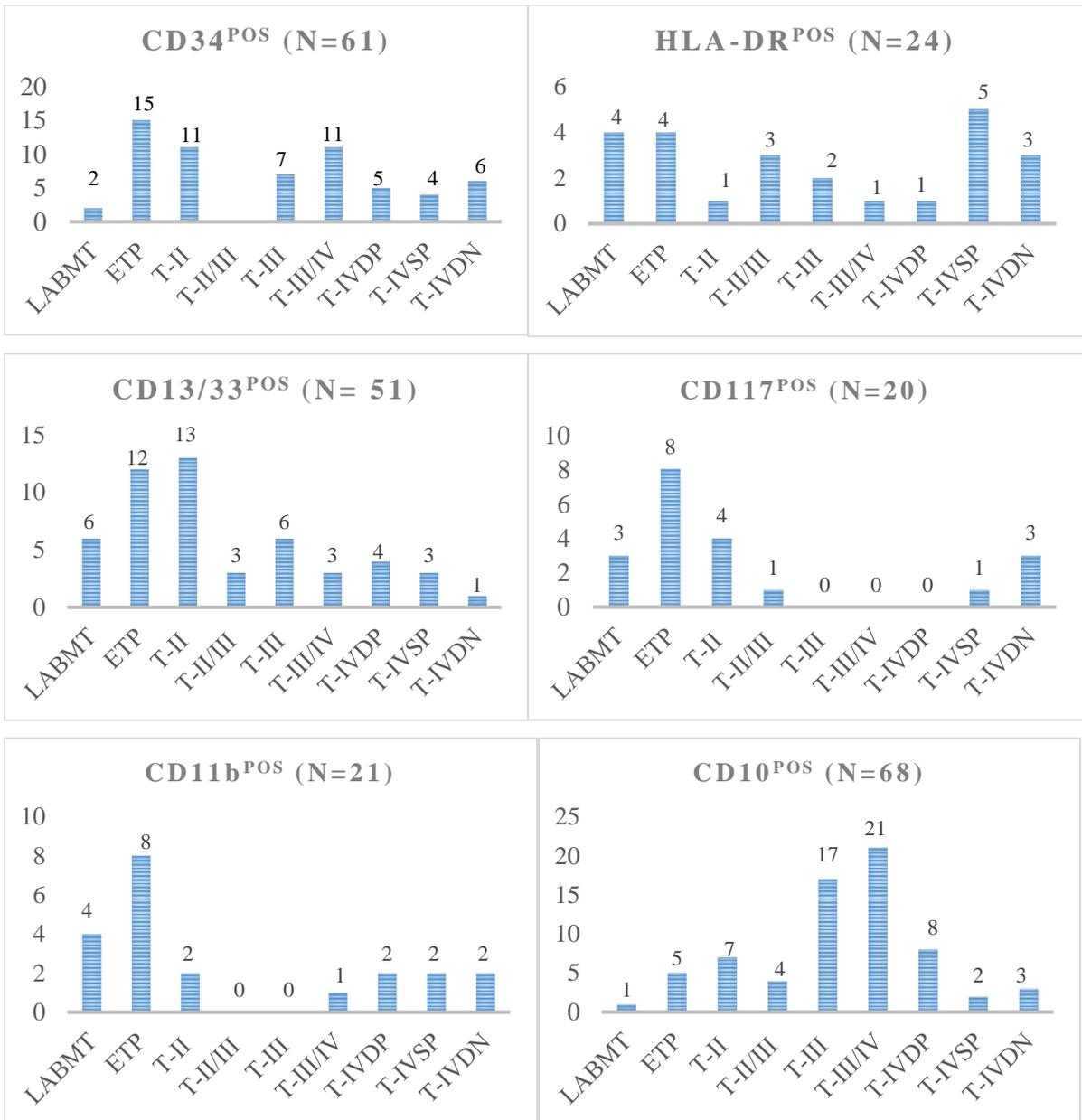
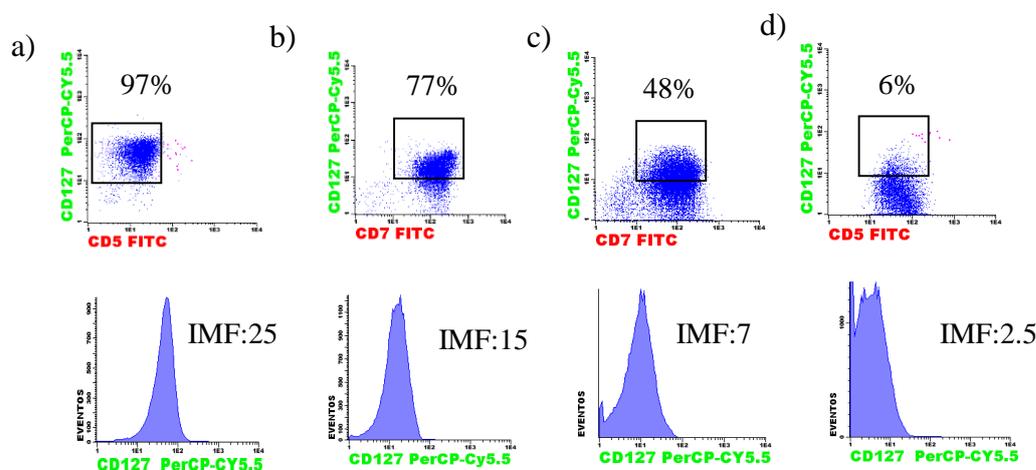


Figura 7.7: Distribuição dos casos positivos para CD34, HLA-DR, CD13/33, CD117, CD11b e CD10 de acordo com os subtipos maturativos.

## 7.2.6 Análises das expressões celulares de CD127, CD135 e CD117 em LLA-T

A expressão celular da cadeia  $\alpha$  do receptor de interleucina 7 - IL7R $\alpha$  (CD127) estudada por CMF foi realizada em 94 casos de LLA-T. A mediana da porcentagem de CD127<sup>POS</sup> foi de 45%, com valor mínimo de 0 e máximo de 97%. Para a IMF a mediana foi de 6,1 com valor mínimo de 0,2 e máximo de 25,3; a IMF no 25 percentil foi de 4,0 e no 75 percentil de 10,9. Quando utilizamos o ponto de corte de 20% para determinar a positividade do CD127, 73/94 (78%) dos casos foram considerados CD127<sup>POS</sup>. Na Figura 7.8 demonstramos exemplos de casos com CD127 avaliados pela CFM. Não observamos diferença estatisticamente significativa em relação as características demográficas e clínicas dos pacientes com LLA-T de acordo com o status do CD127 em termos de IMF e porcentagem de células positivas (Tabela 7.6).

Avaliamos também a expressão do CD127 em termos de porcentagem de células positivas e IMF nos subtipos maturativos. Os casos com LAB-M/T foram excluídos da análise. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os subtipos, embora tenha sido observado que os subtipos T-IV<sup>DP</sup> e T-IV<sup>DN</sup> possuem maior mediana, tanto para IMF e porcentagem de células positivas (Figura 7.9).



*Dot plot* na linha superior demonstra a porcentagem de células positivas e histogramas na linha inferior com valor da Intensidade mediana de fluorescência (IMF) a) e b) expressão alta do CD127, c) expressão intermediária e d) expressão baixa.

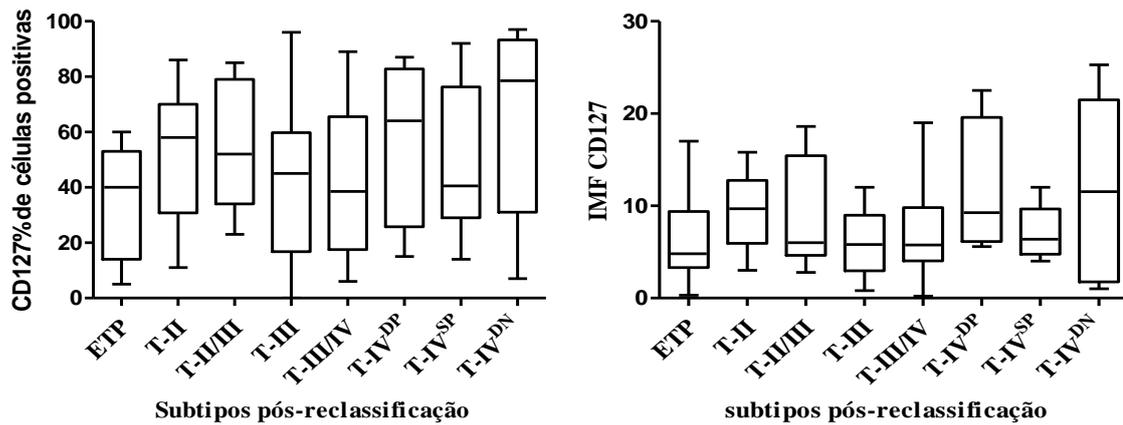
Figura 7.8. Exemplos de expressão celular do CD127 em blastos de LLA-T.

Tabela 7.6. Características demográficas e clínicas de acordo com o status do CD127 em termos de intensidade mediana de fluorescência (IMF) e porcentagem de células positivas.

	CD127 (IMF)		<i>p</i> valor	CD127 (%)		<i>p</i> valor
	baixo	interm/alto		positivo	negativo	
<b>Idade</b>						
< 10 anos	24(51,1)	26 (55,3)	0,8	41(56,2)	9(42,9)	0,3
10-18 anos	23(48,9)	21(44,7)		32(43,8)	12(57,1)	
<b>Sexo</b>						
Masculino	40 (85,1)	32 (68,1)	0,09	17(23,3)	5(23,8)	1,0
Feminino	7 (14,9)	15 (31,9)		56(76,7)	16(76,2)	
<b>Cor da Pele</b>						
Branca	17 (36,2)	17 (36,2)	1,0	25(34,2)	9(42,9)	0,5
Não-branca	30 (63,8)	30 (63,8)		48(65,8)	12(57,1)	
<b>Leucometria (x10<sup>9</sup>/L)</b>						
< 50	11(23,4)	15(31,9)	0,6	22(30,1)	4(19,0)	0,53
≥ 50 <100	7(14,9)	8(17,0)		12(16,4)	3(14,3)	
≥ 100	29(61,7)	24(51,1)		39(53,4)	14(66,7)	
<b>Alargamento de mediastino</b>						
Sim	16(34,8)	20(43,5)	0,4	30(41,7)	6(30,0)	0,44
Não	30(65,2)	26(56,5)		42(58,3)	14(70,0)	
<b>Comprometimento de Sistema nervoso central</b>						
Sim	6(13,0)	1(2,2)	0,1	6(8,3)	1(5,3)	1,0
Não	40(87,0)	44(97,8)		66(91,7)	18(94,7)	
<b>Total</b>	<b>47(100)</b>	<b>47(100)</b>		<b>73(100)</b>	<b>21(100)</b>	

p-valor calculado pelo teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado. Em três casos não tivemos informação do sistema nervoso central e em dois casos da presença de alargamento de mediastino.

IMF: intensidade média de fluorescência; Interm: intermediário.



Subtipos	% de células positivas Mediana (min-max)	p-valor	IMF Mediana (min-max)	p-valor
ETP (n = 13)	40 (5-60)	0,3	4,8(0,3-17)	0,3
T-II (n = 12)	58,0 (11-86)		9,7(3,0-15,8)	
T-II/III (n = 9)	52,0 (23-85)		6,0(2,8-18,6)	
T-III (n = 18)	45,0 (0-96)		5,8(0,8-12)	
T-III/IV (n = 24)	38,5 (6-89)		5,8(0,2-19)	
T-IV <sup>DP</sup> (n = 4)	64,0 (15-87)		9,2(5,6-22,5)	
T-IV <sup>SP</sup> (n = 6)	40,5 (14-92)		6,4(4,0-12)	
T-IV <sup>DN</sup> (n = 6)	78,5(7-97)		11,5(1,0-25,3)	

Figura.7.9: Expressão celular do CD127 de acordo com os subtipos maturativos pós-reclassificação. %: porcentagem de células positivas; IMF: intensidade mediana de fluorescência (IMF); mín: mínimo; máx: máximo. As barras horizontais nos *Box plots* representam mediana, valores mínimo e máximo; p-valor calculado pelo teste de *Kruskall Wallis*.

A avaliação da expressão celular do receptor de fator células tronco c-KIT (CD117) foi realizada em 112 amostras e para o FLT3 (CD135) foi realizada em 96 casos. A mediana da porcentagem de blastos para o CD117<sup>POS</sup> foi de 4% (0-95%) e para a IMF foi de 1,8 (0,3 - 82). Para o CD135<sup>POS</sup> a mediana foi de 2,3% (0-95%) e para a IMF foi de 1,6 (0,5 - 22,5). Observamos que CD117 apresentou maior mediana de porcentagem de células positivas nos casos de LAB-M/T e ETP ( $p = 0,004$ ), entretanto a diferença em relação a IMF não alcançou significância ( $p = 0,09$ ) (Figura 7.10). Nas análises do CD135 não foram observadas diferenças significantes (Figura 7.11). Os casos de LABM/T foram excluídos, devido apenas 3 casos terem sido testados para expressão celular do CD135.

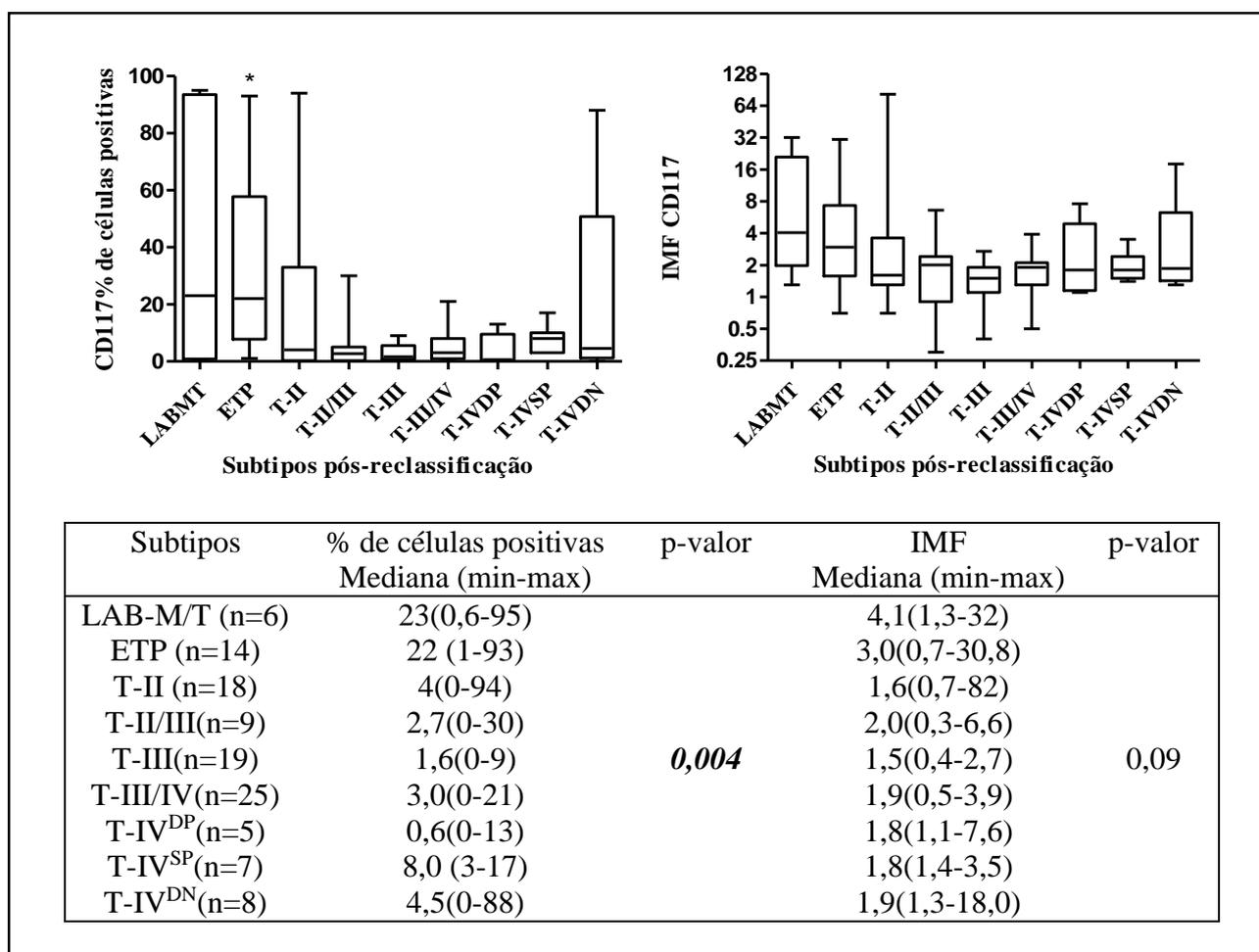


Figura.7.10: Diferenças da expressão celular do CD117 de acordo com os subtipos maturativos pós-reclassificação. %: porcentagem de células positivas; IMF: intensidade mediana de fluorescência (IMF); mín: mínimo; máx: máximo. As barras horizontais nos *Box plots* representam mediana, valores mínimo e máximo; p-valor calculado pelo teste de *Kruskall Wallis*.

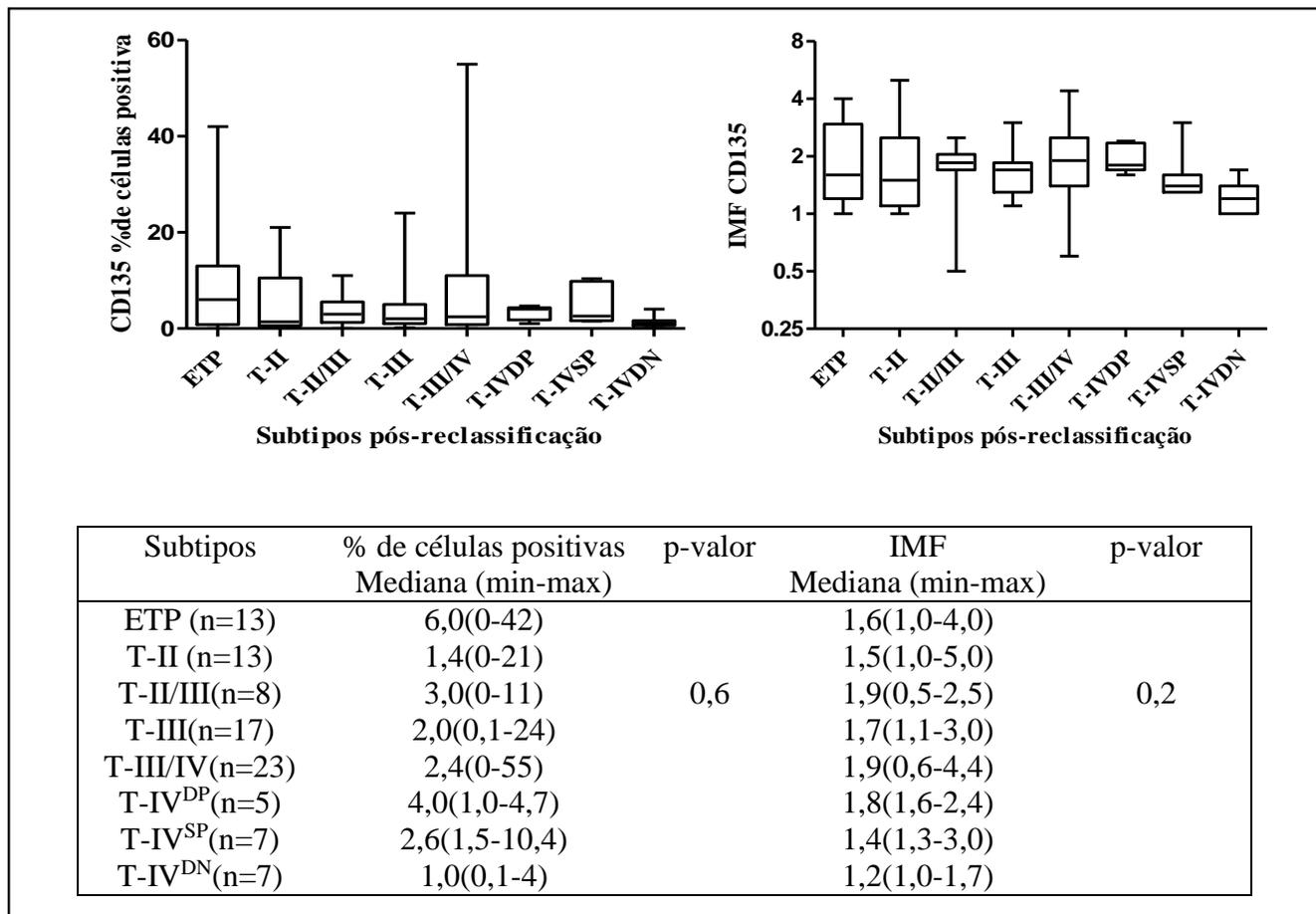


Figura.7.11: Diferenças da expressão celular do CD135 de acordo com os subtipos maturativos pós-reclassificação. %: porcentagem de células positivas; IMF: intensidade mediana de fluorescência (IMF); mín: mínimo; máx: máximo. As barras horizontais nos *Box plots* representam mediana, valores mínimo e máximo; p-valor calculado pelo teste de *Kruskall Wallis*.

### 7.3. Avaliação das alterações moleculares

#### 7.3.1. Avaliação das alterações moleculares *TLX3*, *STIL-TALI*, *NOTCH1*, *IL7R*, *FBXW7* e *RAS*

Nesta série de casos de LLA-T, 148 casos foram avaliados para a presença do *STIL-TALI* e 161 casos para a expressão ectópica do *TLX3*. A frequência do *STIL-TALI*<sup>pos</sup> foi de 23,6% (n = 35) e *TLX3*<sup>pos</sup> de 11,8% (n = 19). As frequências para as mutações foram: *NOTCH1*<sup>mut</sup> 43,7% (73/167), *FBXW7*<sup>mut</sup> 18% (30/166), *IL7R*<sup>mut</sup> 7,2% (12/167), *FLT3*<sup>mut</sup> 5,5% (9/164) e *N-KRAS*<sup>mut</sup> 9% (14/155). Não observamos diferenças entre as características clínico-demográficas comparadas entre os casos com e sem alterações moleculares. Exceto para o *N-KRAS*<sup>mut</sup> em relação a idade, onde 85,7% dos casos com mutação eram menores que 10 anos ( $p = 0,023$ ). Na Tabela 7.7 podemos observar um sumário das alterações moleculares de acordo com as variáveis clínico-demográficas.

Em relação as mutações do *NOTCH1* exclusivas no domínio HD ocorreram em 54,8% dos casos (n = 40) e no domínio PEST/TAD em 27,4% dos casos (n = 20) e 17,8% (n = 13) em ambos os domínios. Além disso identificamos que 46,6% (n = 34) dos casos mutados apresentavam mutações pontuais (troca simples de uma base) e 53,4% (n = 39) mutação complexas (inserção e/ou deleção). As mutações no *IL7R* foram todas do tipo complexas (com inserções e deleções). A descrição completa de todas as mutações, resultados na proteína e os polimorfismos encontrados, estão em anexo 5 e 6.

A análise de mutações no gene *FBXW7*, em que 40% (n = 12) foram no éxon 9 e 60% (n = 18) no éxon 10. Todas as mutações foram pontuais com troca simples de base e ocorreram nas Argininas 465, 479 e 505. As mutações em *NRAS* ocorreram em 5,8% (n = 11) dos casos e *KRAS* em apenas 1,6% (n = 3).

Tabela 7.7. Sumário das características demográficas, clínicas e subtipos de acordo com as alterações moleculares.

	<i>STIL-TALI</i> <sup>pos</sup> n = 35/ <i>p</i> -valor		<i>TLX3</i> <sup>pos</sup> n = 19/ <i>p</i> -valor		<i>NOTCH1</i> <sup>mut</sup> n = 73/ <i>p</i> -valor		<i>FBXW7</i> <sup>mut</sup> n = 30/ <i>p</i> -valor		<i>FLT3</i> <sup>mut</sup> n = 9/ <i>p</i> -valor		<i>IL7R</i> <sup>mut</sup> n = 12/ <i>p</i> -valor		<i>N-KRAS</i> <sup>mut</sup> n = 14/ <i>p</i> -valor	
<b>Idade (anos)</b>														
< 10	16(45,7)	0,3	10(52,6)	1,0	40(54,8)	1,0	14(46,7)	0,2	4(44,4)	0,73	6(50)	0,7	12(85,7)	<b>0,02</b>
10-18	19(54,3)		9(47,4)		33(45,2)		16(53,3)		5(55,6)		6(50)		2(14,3)	
<b>Sexo</b>														
Masculino	25(71,4)	0,7	16(84,2)	0,4	56(76,7)	0,6	24(80,0)	0,6	6(66,7)	0,7	9(25,0)	1,0	5(35,7)	0,2
Feminino	10(28,6)		3(15,8)		17(23,3)		6(20,0)		3(33,3)		3(75)		9(64,3)	
<b>Cor da Pele</b>														
Branca	15(42,9)	1,0	6(31,6)	0,5	32(43,8)	0,3	15(50,0)	0,2	2(22,2)	0,32	3(25)	0,4	5(35,7)	1,0
Não-branca	20(57,1)		13(68,4)		41(56,2)		15(50,0)		7(77,8)		9(75)		9(64,3)	
<b>Leucometria (x10<sup>9</sup>/L)</b>														
< 50	10(27,8)		4(21,1)		18(24,7)		12(40,0)		5(55,6)		4(33,3)		6(42,9)	
≥ 50 <100	7(19,4)	1,0	6(31,6)	0,3	16(21,9)	0,2	5(16,7)	0,4	0	0,13	2(16,7)	1,0	2(14,3)	0,6
≥ 100	19(52,9)		9(47,4)		39(53,4)		13(43,3)		4(44,4)		6(50)		6(42,9)	
<b>Alargamento de Mediastino</b>														
Sim	13(38,2)	0,8	8(44,4)	0,8	30(41,7)	0,8	14(46,7)	0,7	5(55,6)	0,5	5(45,5)	1,0	7(50)	0,6
Não	21(61,8)		10(55,6)		42(58,3)		16(53,3)		4(44,4)		6(54,5)		7(50)	
<b>Comprometimento do SNC</b>														
Sim	3(8,8)	0,70	2(11,1)	0,6	8(11,6)	0,2	1(3,3)	0,5	0	1,0	2(18,2)	0,23	0	0,6
Não	31(91,2)		16(88,9)		61(88,4)		29(96,7)		9(100)		9(81,8)		14(100)	

*p*-valor calculado pelo teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado. Em nove casos não tivemos informação do comprometimento do sistema nervoso central e em dois casos da presença de alargamento de mediastino.

### 7.3.2. Análise de associações entre as alterações moleculares.

A análise de associação entre as alterações moleculares demonstrou associação estatisticamente significativa em relação ao *NOTCH1* e *IL7R* ( $p = 0,01$ ), em que 83% dos casos com mutação no *IL7R* também apresentavam mutação em *NOTCH1*, assim como 45,5% dos casos *IL7R<sup>mut</sup>* eram *TLX3<sup>pos</sup>* ( $p = 0,01$ ) (Tabela 7.8).

Foi observado ainda associação entre *N-KRAS<sup>mut</sup>* e *FBXW7<sup>mut</sup>* ( $p = 0,03$ ), onde 46,2% dos casos com *N-KRAS<sup>mut</sup>*, apresentavam mutações no *FBXW7*. Observou-se ainda que não foram encontradas alterações concomitantes entre *IL7R* e *FLT3*, *STIL-TAL1* e *TLX3*, *FLT3* e *RAS* e ainda entre *IL7R* e *N-KRAS*. Mutações em *NOTCH1* e *FLT3* foram quase mutuamente excludentes ( $p = 0,04$ ) com apenas um paciente possuindo mutação nesses dois genes. Quarenta e seis por cento dos casos com mutação em *N-KRAS* também apresentaram mutação em *NOTCH1* (Tabela 7.8).

Tabela 7.8. Análise de associações entre as alterações moleculares.

Alterações Moleculares	<i>NOTCH1</i> Mut/wt (%)	<i>p</i>	<i>FBXW7</i> Mut/wt (%)	<i>p</i>	<i>IL7R</i> Mut/wt (%)	<i>p</i>	<i>FLT3</i> Mut/wt (%)	<i>p</i>	<i>RAS</i> Mut/wt (%)	<i>p</i>	<i>STIL-TAL1</i> (+)/(-) (%)	<i>p</i>	<i>TLX3</i> (+)/(-) (%)	<i>p</i>
<i>NOTCH1</i> <sup>mutado</sup>	-		13/60(17,8)		-		-		6/62(1,0)		12/46(20,7)		8/57(12,3)	
<i>NOTCH1</i> <sup>WT</sup>	-	-	17/74(18,7)	1,0	-	-	-	-	7/78(8,2)	1,0	20/56(26,3)	0,54	8/72(10)	0,8
<i>FBXW7</i> <sup>mutado</sup>	13/17(43,3)		-		2/28(6,7)		1/28(3,4)		-		6/19(24)		4/22(15,4)	
<i>FBXW7</i> <sup>WT</sup>	60/74(44,8)	1,0	-	-	10/124(7,5)	1,0	8/123(6,1)	1,0	-	-	24/83(22,4)	1,0	13/104(11,1)	0,51
<i>IL7R</i> <sup>mutado</sup>	10/2 (83,3)		2/10 (16,7)		-		0/12		0/12		2/9 (18,2)		5/6(45,5)	
<i>IL7R</i> <sup>WT</sup>	62/88(41,3)	<b>0,01</b>	28/124(18,4)	1,0	-	-	9/141(6,0)	1,0	14/128(9,9)	0,6	29/93(23,8)	1,0	13/119(9,8)	<b>0,01</b>
<i>FLT3</i> <sup>mutado</sup>	1/8 (11,1)		1/8(11,1)		0/9		-		0/9		0/6		1/5(16,7)	
<i>FLT3</i> <sup>WT</sup>	70/81(46,4)	<b>0,04</b>	28/123(18,5)	1,0	12/141(7,8)	1,0	-	-	13/130(9,1)	1,0	32/92(25,8)	0,34	16/118(11,9)	0,6
<i>RAS</i> <sup>mutado</sup>	6/7(46,2)		6/8(42,9)		0/14		0/13		-		1/11(8,3)		2/10(16,7)	
<i>RAS</i> <sup>WT</sup>	62/78(44,3)	1,0	23/117(16,4)	<b>0,03</b>	12/128(8,6)	0,63	9/130(6,5)	1,0	-	-	28/82(25,5)	0,3	14/106(11,7)	0,6
<b>Total</b>	<b>73/94(43,7)</b>		<b>30/136(18,1)</b>		<b>12/155(7,2)</b>		<b>9/155(5,5)</b>		<b>14/141(9,0)</b>		<b>36/112(24,3)</b>		<b>19/142(11,8)</b>	

p: p-valor calculado pelo teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Mut: mutado; wt: wilde-type (selvagem)

#### 7.4. Associação entre os subtipos maturativos pós-reclassificação e alterações moleculares

As associações entre os subtipos maturativos e as alterações moleculares podem ser vistas na Tabela 7.9.

Para os casos de LAB-M/T, seis casos foram rastreados quanto mutações nos genes *NOTCH1*, *FBXW7*, *IL7R*, *FLT3*, *N-KRAS* e 3 casos para o rearranjo cromossômico *STIL-TALI* e 4 para *TLX3*. Neste subtipo foram detectadas *NOTCH1<sup>mut</sup>* (2/6), *FLT3<sup>mut</sup>* (1/6), *N-KRAS<sup>mut</sup>* (1/6) e *TLX3<sup>pos</sup>* (1/4).

No subgrupo das LLA-ETP identificamos 38,9% (7/18) de casos com *NOTCH1<sup>mut</sup>*, 16,7% (3/18) *FBXW7<sup>mut</sup>*, 11,8% (2/17) *N-KRAS<sup>mut</sup>*, nenhuma dessas alterações foi associada ao subtipo ETP. Entretanto, 29,4% (5/17) dos casos tinham *FLT3<sup>mut</sup>* ( $p < 0,001$ ). Neste subtipo não encontramos casos com alterações nos genes *IL7R* e presença do *TLX3*.

Em relação aos demais subtipos as maiores diferenças encontradas foram no subtipo T-II/III onde observamos que 73% dos casos foram *NOTCH1<sup>mut</sup>* ( $p = 0,06$ ) e 27,3% *IL7R<sup>mut</sup>* ( $p = 0,034$ ).

Os subtipos T-III e T-III/IV apresentaram-se semelhantes nas frequências da maioria das alterações, entretanto observa-se uma maior frequência de *IL7R<sup>mut</sup>* 15% (5/33) para o subtipo T-III/IV ( $p = 0,06$ ), enquanto o subtipo T-III apresenta apenas 3,2% (1/31) *IL7R<sup>mut</sup>*. Foram observados também *FLT3<sup>mut</sup>* nesses dois subtipos. *TLX3<sup>pos</sup>* foi mais frequente no subtipo T-III/IV com 17,1% (6/35) dos casos positivos para esse rearranjo, enquanto o subtipo T-III apresentou apenas 6,7% (2/30) dos casos com essa alteração.

Nos subtipos T-IV, a frequência *NOTCH1<sup>mut</sup>* foi semelhante entre os subtipos T-IV<sup>DP</sup> (26%) e T-IV<sup>DN</sup> (23%), entretanto o subtipo T-IV<sup>SP</sup> apresentou-se com frequência de 41,7%. Da mesma forma, o subtipo T-IV<sup>SP</sup> apresentou maior frequência de *FBXW7<sup>mut</sup>* (25%) e os subtipos T-IV<sup>DP</sup> (5,6%) e T-IV<sup>DN</sup> (8,3%) menores frequências. *N-KRAS<sup>mut</sup>* foram encontradas em 25% (3/12) dos casos T-IV<sup>DN</sup>. A frequência de *STIL-TALI<sup>pos</sup>* foi elevada no subtipo T-IV<sup>SP</sup>, em que 50% (5/10) dos casos apresentavam essa alteração ( $p = 0,04$ ) e uma menor frequência no subtipo T-IV<sup>DN</sup> 14,3% (2/13). Na Figura 7.12 podemos observar a frequência dos casos com alterações moleculares de acordo com cada subtipo.

A análise das alterações moleculares de acordo com o tipo de expressão celular do TCR, demonstrou que não foram identificadas mutações no *IL7R* em casos com expressão celular do TCR $\alpha\beta$ , entretanto 3 de 12 casos mutados para o *IL7R* foram positivos para o TCR $\gamma\delta$ . Da mesma

forma 2 de 9 casos mutados para o *FLT3* foram positivos para o TCR $\gamma\delta$ . Além dessas alterações a presença de *STIL-TALI* foi frequente em casos positivos para TCR $\alpha\beta$  (42,1%) e ausente em casos positivos para TCR $\gamma\delta$ . Já a presença da *TLX3* foi frequente nos casos positivos para TCR $\gamma\delta$  (44%) e ausente nos casos positivos para TCR $\alpha\beta$  (Tabela 7.10).

Tabela 7.9. Associação das alterações moleculares de acordo com os subtipos maturativos pós-reclassificação.

	<i>NOTCH1</i> Mut/NT (%)	<i>p</i>	<i>FBXW7</i> Mut/NT (%)	<i>p</i>	<i>IL7R</i> Mut/NT (%)	<i>p</i>	<i>FLT3</i> Mut/NT (%)	<i>p</i>	<i>NKRAS</i> Mut/NT (%)	<i>p</i>	<i>STIL-TALI</i> pos/NT (%)	<i>p</i>	<i>TLX3</i> pos/NT (%)	<i>p</i>
<b>LAB<sup>MT</sup></b> (n=7)	2/6 (33,3)	0,7	0/6	0,6	0/6(0)	1,0	1/6(16,7)	0,3	1/6(16,7)	0,4	0/3(0)	1,0	1/4(25)	0,4
<b>ETP</b> (n= 18)	7/18(38,9)	0,8	3/18(16,7)	1,0	0/18(0)	0,4	5/17(29,4)	<b>&lt;0,01</b>	2/17(11,8)	0,7	3/15(20)	1,0	1/14(7,1)	1,0
<b>T-II</b> (n=26)	9/23(39,0)	0,7	5/25(20)	0,8	1/25(4)	1,0	0/24(0)	0,4	3/23(13)	0,4	3/20(15)	0,4	1/19(5,3)	0,7
<b>T-II/III</b> (n=12)	8/11 (73,0)	0,06	3/11(27,3)	0,42	3/11(27,3)	<b>0,03</b>	0/11(0)	1,0	2/10(20)	0,2	2/8(25)	1,0	2/9(22,2)	0,3
<b>T-III</b> (n=35)	16/31 (52,0)	0,42	7/30(23,3)	0,44	1/31(3,2)	0,7	1/30(3,3)	1,0	2/27(7,4)	1,0	6/25(24)	1,0	2/30(6,7)	0,53
<b>T-III/IV</b> (n = 38)	17/32(53,1)	0,23	7/32 (21,9)	0,6	5/33(15,2)	0,06	2/33(6,1)	1,0	0/31(0)	0,0 7	8/34(23,5)	1,0	6/35(17,1)	0,4
<b>T-IV<sup>DP</sup></b> (n=22)	5/19(26,3)	0,14	1/18 (5,6)	0,2	1/18(5,6)	1,0	0/20(0)	0,6	0/16(0)	0,4	6/18(33,3)	0,4	2/19 (10,5)	1,0
<b>T-IV<sup>SP</sup></b> (n=14)	5/12(41,7)	1,0	3/12(25,0)	0,5	0/11(0)	1,0	0/10(0)	1,0	1/11(9,1)	1,0	5/ 10(50)	<b>0,04</b>	1/14(7,1)	1,0
<b>T-IV<sup>DN</sup></b> (n=15)	3/13(23,1)	0,2	1/12(8,3)	0,6	1/12(8,3)	1,0	0/11(0)	1,0	3/12(25)	0,0 8	2/13(14,3)	0,73	3/15(20,0)	0,4
<b>Total</b>	<b>72/165(43,6)</b>		<b>30/164(18,3)</b>		<b>12/165(7,3)</b>		<b>9/162(5,5)</b>		<b>14/153(9,2)</b>		<b>35/146(24)</b>		<b>19/159(11,9)</b>	

Mut: mutado; pos: positivo; (%) de casos com alteração, NT: número total de casos rastreados para a alteração molecular; p: p-valor calculado pelo teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado. O teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher foi realizado comparando cada subtipo com os demais juntos.

Tabela 7.10: Alterações moleculares de acordo com o tipo de expressão celular do TCR

	<b>Mutado/NT (%)</b>	<b>TCR<math>\alpha\beta</math><sup>pos</sup>/NT</b>	<b>p-valor</b>	<b>TCR<math>\gamma\delta</math><sup>pos</sup>/NT</b>	<b>p-valor</b>
<i>NOTCH1</i>	73/167(43,7)	7/18 (38,9)	0,62	7/16 (43,8)	1,0
<i>FBXW7</i>	30/166(18,1)	1/18(5,6)	0,2	4/16 (25)	0,5
<i>IL7R</i>	12/167 (7,2)	0/18(0)	0,4	3/16 (18,8)	0,09
<i>FLT3</i>	9/164 (5,5)	0/18(0)	0,6	2/16 (12,5)	0,25
<i>N-KRAS</i>	14/155(9,0)	0/16(0)	0,4	1/14(6,7)	1,0
<i>STIL-TALI<sup>pos</sup></i>	35/148 (23,6)	8/10 (80,0)	<b>0,02</b>	0/16(0)	<b>0,02</b>
<i>TLX3<sup>pos</sup></i>	19/161 (11,8)	0/20(0)	0,08	8/18 (44,4)	<b>&lt;0,001</b>

(%) de casos com alteração, NT: número total de casos rastreados para a alteração molecular ou testados para TCR; Pos: positivo; p: p-valor calculado pelo teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado. O teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher foi realizado comparando casos positivos para TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  com os demais casos.

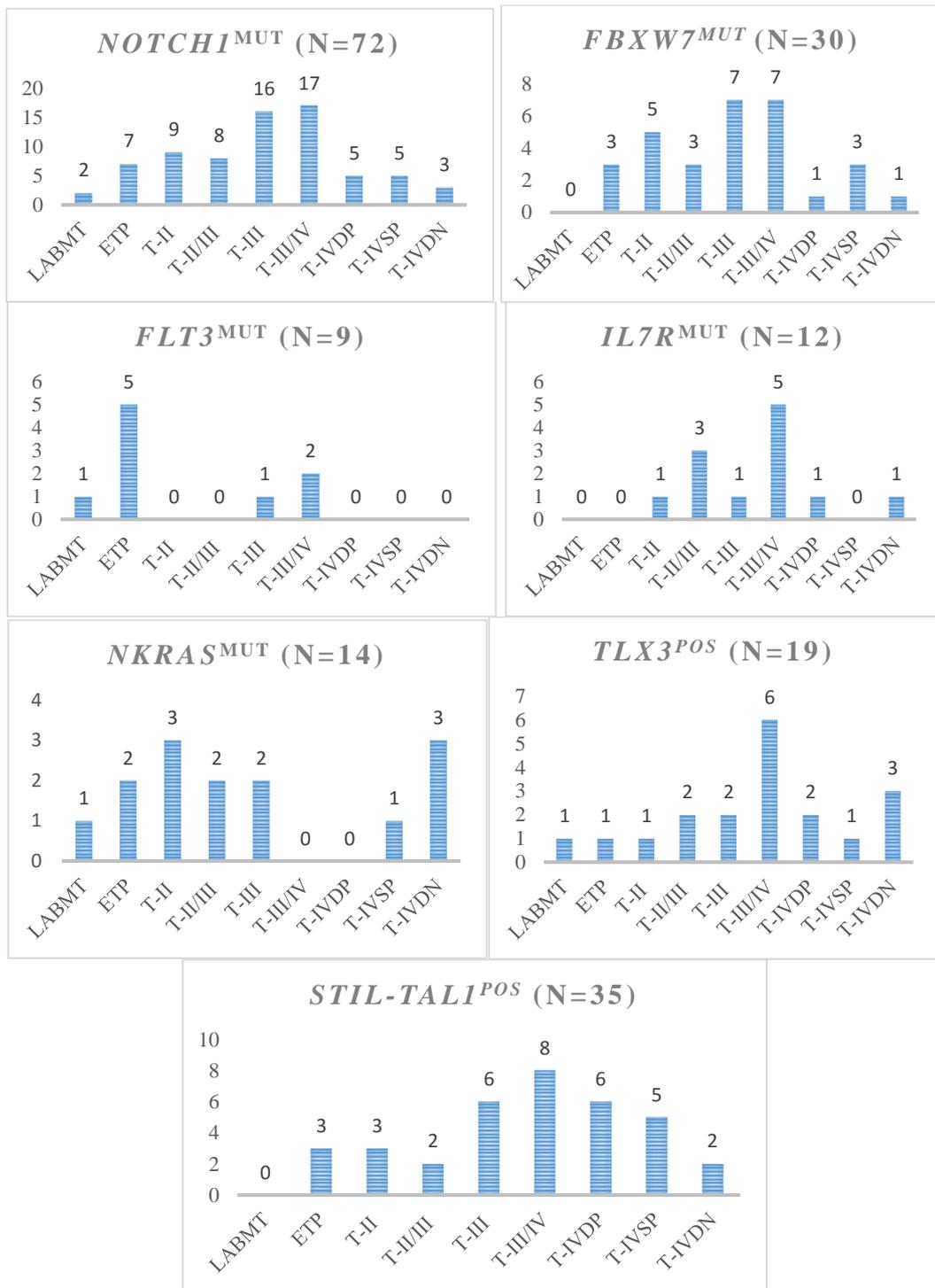


Figura 7.12: Frequências dos casos com alterações moleculares de acordo com cada subtipo pós-reclassificação.

## 7.5. Avaliação da expressão do CD127 de acordo com status das alterações moleculares

A expressão do CD127 em membrana celular foi avaliada em relação ao status das alterações genômicas avaliadas nesse estudo. As principais diferenças foram em relação a porcentagem de células positivas para o CD127 (CD127<sup>pos</sup>) para os casos com *IL7R<sup>mut</sup>* que apresentaram mediana maior 62% (25-87) do que os casos *IL7R<sup>WT</sup>* 42,5% (0-97) ( $p = 0,02$ ), representados na Figura 7.13. Embora a IMF tenha sido maior também nos casos com *IL7R<sup>mut</sup>*, mediana de 8,5 (3,5-22,5) *versus* 6,1 (0,2-25,3) dos casos *IL7R<sup>WT</sup>*, não se obteve diferença significativa ( $p = 0,1$ ). Entre os 10 casos com *IL7R<sup>mut</sup>* e testados para o CD127, 4 casos tiveram CD127 com expressão baixa, 2 casos expressão intermediária e quatro casos expressão alta pela CFM.

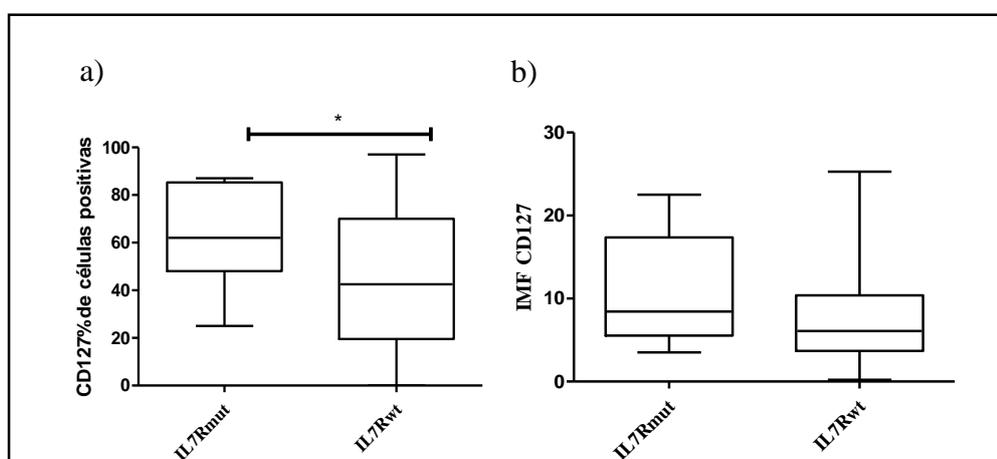


Figura 7.13: Expressão do CD127 em membrana celular de acordo com status do *IL7R*. a) Perfil de expressão do CD127 em relação a porcentagem de células positivas e sua comparação entre casos com *IL7R<sup>mut</sup>* *versus* *IL7R<sup>WT</sup>*, \* $p = 0,023$ . b) Perfil de expressão do CD127 em relação a intensidade mediana de fluorescência (IMF) e sua comparação entre casos com *IL7R<sup>mut</sup>* *versus* *IL7R<sup>WT</sup>*. As barras horizontais nos *Box plots* representam mediana, valores mínimo e máximo; p-valor calculado pelo teste de *Mann-Whitney*.

Ainda no contexto das avaliações da expressão do CD127, outra diferença encontrada foi em relação a IMF, em que casos *N-KRAS<sup>mut</sup>* apresentaram maior mediana, 10 (6,8-20,2), do que nos casos *N-KRAS<sup>wt</sup>* 6,1 (0,2-25,3) ( $p = 0,02$ ) (Figura 7.14). De 7 casos *N-KRAS<sup>mut</sup>* testados para o CD127, 4 casos tiveram CD127 com expressão intermediária e 3 casos expressões alta. A mediana da porcentagem de células CD127<sup>pos</sup> foi de 52% (34-92) para os casos *N-KRAS<sup>mut</sup>*,

e para os casos  $N-KRAS^{wt}$  foi de 44% (0-97), não sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,1$ ).

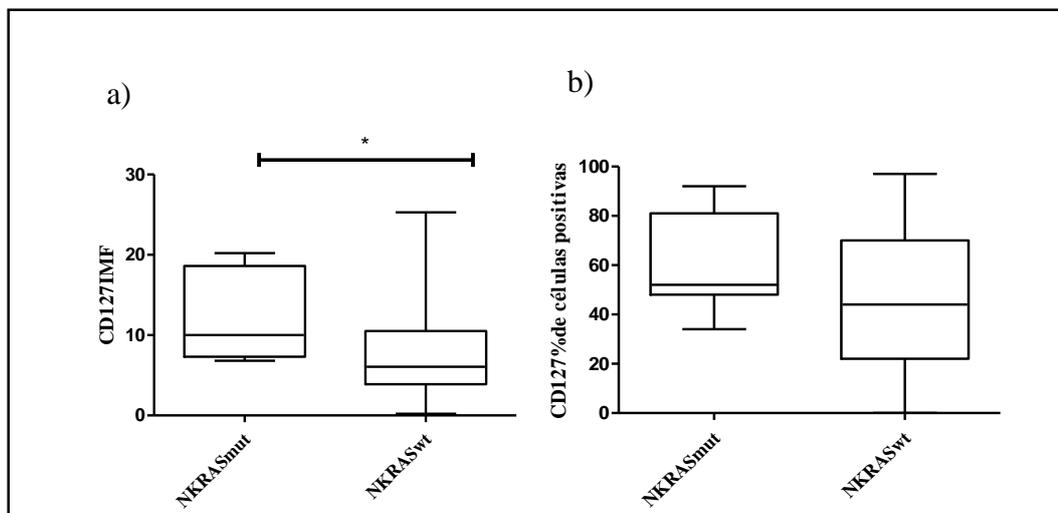
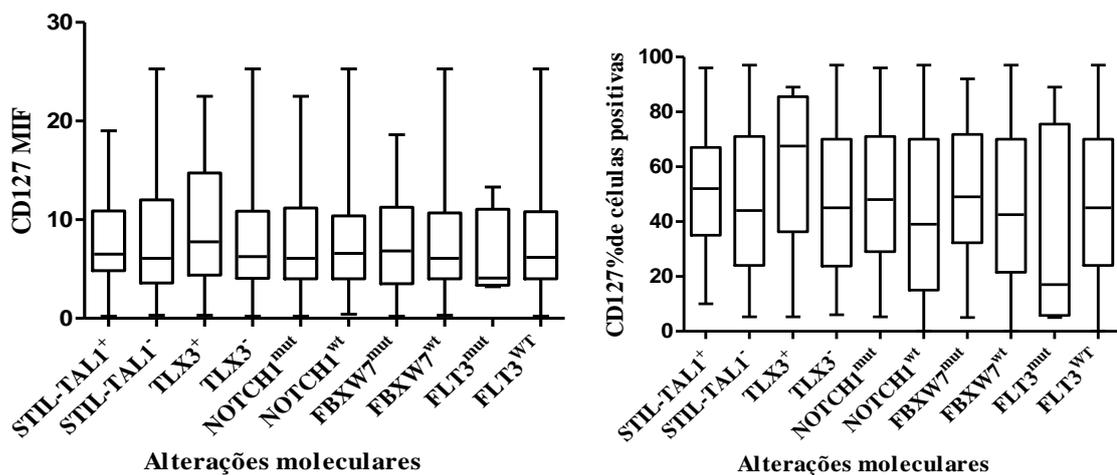


Figura 7.14. Expressão do CD127 em membrana celular de acordo com status do  $N-KRAS$ . a) Perfil de expressão do CD127 em relação a intensidade mediana de fluorescência (IMF) e sua comparação entre casos com  $N-KRAS^{mut}$  versus  $N-KRAS^{wt}$  b) Perfil de expressão do CD127 em relação a porcentagem de células positivas e sua comparação entre casos com  $N-KRAS^{mut}$  versus  $N-KRAS^{wt}$ . \* $p = 0,02$ . As barras horizontais nos *Box plots* representam mediana, valores mínimo e máximo; p-valor calculado pelo teste de *Mann-Whitney*.

A Figura 7.15 demonstra o perfil de expressão celular do CD127 de acordo com status das demais alterações moleculares ( $STIL-TAL1$ ,  $TLX3$ ,  $NOTCH1$ ,  $FBXW7$  e  $FLT3$ ). Não foram observadas diferenças entre expressão celular do CD127 com status dos genes.



Alteração	CD127IMF Mediana (mín-máx)	p-valor	CD127% Mediana (mín-máx)	p-valor
<i>STIL-TALI</i> <sup>pos</sup>	6,5(0,2-19)	0,51	52(10-96)	0,62
<i>STIL-TALI</i> <sup>neg</sup>	6,1(0,3-25,3)		44(5,3-97)	
<i>TLX3</i> <sup>pos</sup>	7,8 (0,3-22,5)	0,6	67,5(5,3-89)	0,12
<i>TLX3</i> <sup>neg</sup>	6,3(0,2-25,3)		45,0 (6-97)	
<i>NOTCH1</i> <sup>mut</sup>	6,1(0,2-22,5)	0,71	48(5,3-96)	0,15
<i>NOTCH1</i> <sup>wt</sup>	6,6(0,4-25,3)		39(0,0-97)	
<i>FBXW7</i> <sup>mut</sup>	6,9(0,2-18,6)	0,9	49(5-92)	0,43
<i>FBXW7</i> <sup>wt</sup>	6,1(0,3-25,3)		42,5(0-97)	
<i>FLT3</i> <sup>mut</sup>	4,1(6,0-13,3)	0,4	17(5,0-89)	0,24
<i>FLT3</i> <sup>wt</sup>	6,2(0,2-25,3)		45 (0-97)	

Figura 7.15. Expressão do CD127 em membrana celular de acordo com status de outras alterações moleculares observadas em LLA-T em relação intensidade mediana de fluorescência (IMF) e porcentagem de células positivas (%); mín: mínimo; máx: máximo. As barras horizontais nos *Box plots* representam mediana, valores mínimo e máximo; p-valor calculado pelo teste de *Mann-Whitney*.

## 7.6. Avaliação da expressão do CD117 e CD135 de acordo com status das alterações moleculares

A expressão celular do CD117 e CD135 foi avaliada em relação ao status das alterações moleculares. As principais diferenças foram em relação a expressão celular do CD117 de acordo com o status do *IL7R* e *FLT3*. E do CD135 de acordo com o status do *FLT3* e presença da alteração *TLX3*. Observamos uma associação da expressão celular alta do CD135 e expressão intermediária/alta do CD117 a *FLT3<sup>mut</sup>* ( $p < 0,01$ ) e a baixa expressão celular do CD117 ao *IL7R<sup>mut</sup>* ( $p = 0,02$ ). Estes resultados geraram a publicação em anexo.

Nas Figuras 7.16 e 7.17 o perfil de expressão celular do CD117 e CD135 de acordo com status do *NOTCH1*, *FBXW7* e *N-KRAS*.

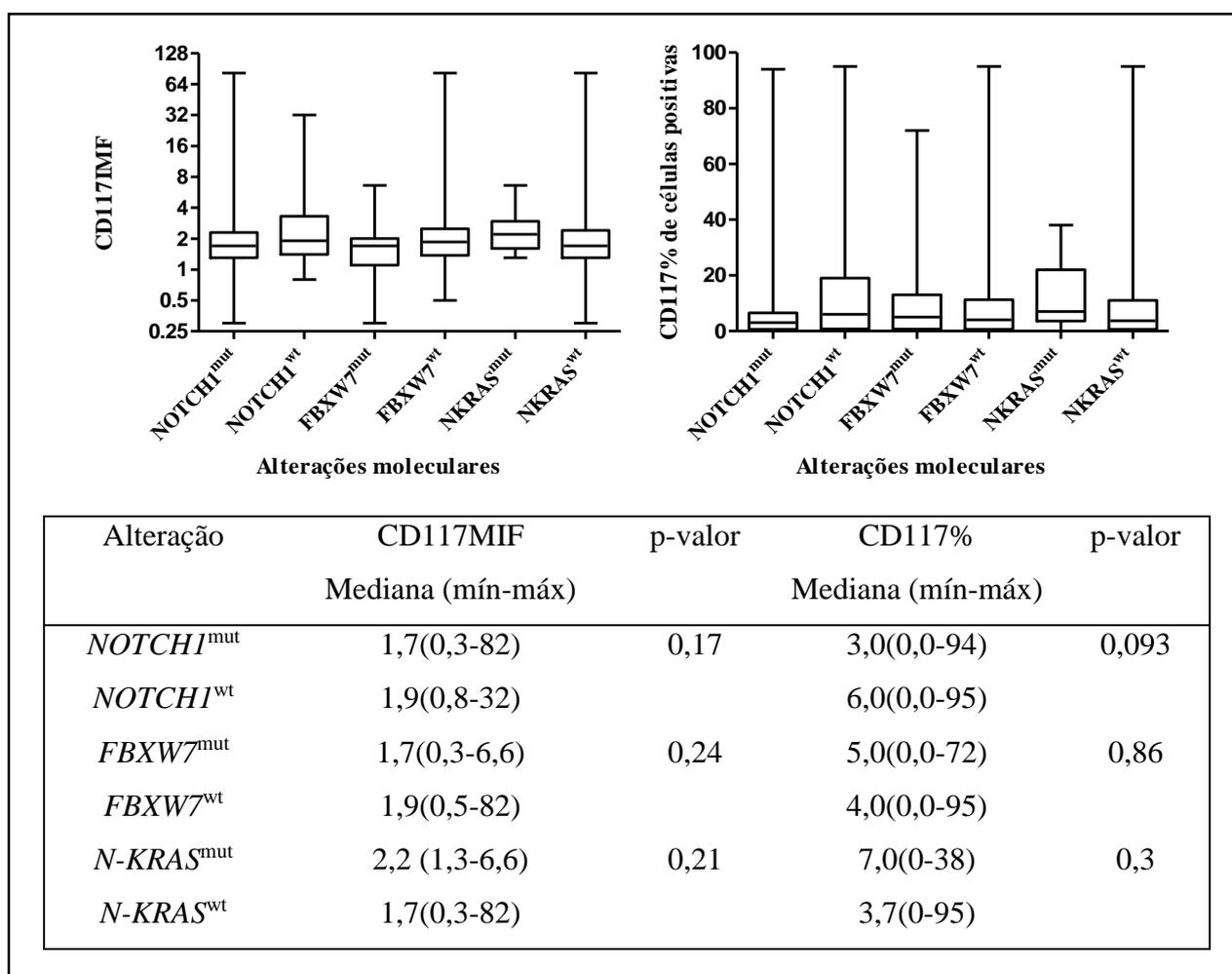


Figura 7.16. Expressão do CD117 em membrana celular de acordo com status de outras alterações moleculares em relação a intensidade mediana de fluorescência (IMF) e porcentagem de células positivas (%). mín: mínimo; máx: máximo. As barras horizontais nos *Box plots*

representam mediana, valores mínimo e máximo; p-valor calculado pelo teste de *Mann-Whitney*.

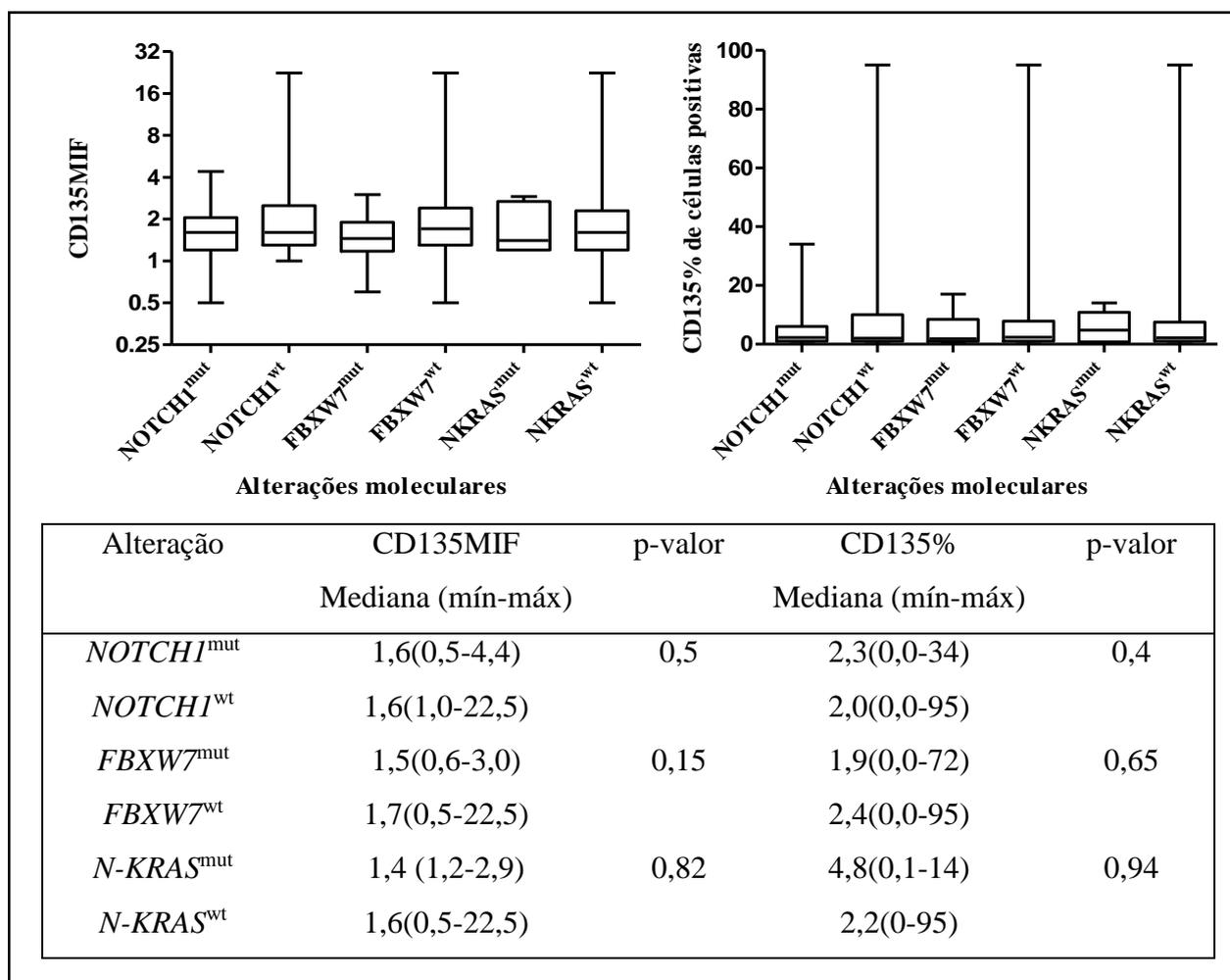


Figura 7.17. Expressão do CD135 em membrana celular acordo com status de outras alterações moleculares em relação a intensidade mediana de fluorescência (IMF) e porcentagem de células positivas (%). mín: mínimo; máx: máximo. As barras horizontais nos *Box plots* representam mediana, valores mínimo e máximo; p-valor calculado pelo teste de *Mann-Whitney*.

## 7.7. Análise de sobrevida

As análises de SG e SLE calculadas em 60 meses da coorte total foram semelhantes entre si: SG 41,7% (IC95%: 37,9-45,4) e SLE 40,3% (IC95%: 36,5-44,1). A mediana de seguimento foi de 29 meses e a média de 31 meses, e as curvas de Kaplan Meier (Figura 7.18) demonstram que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na SG e SLE de acordo com o protocolo de tratamento utilizado. Os pacientes tratados pelo GBTLI-LLA-99 tiveram SG de 42,9% (IC95%: 38-48) e SLE de 40,7% (IC95%: 35,6-45,9). Para os pacientes tratados pelo BFM a SG foi de 40,1 (IC95%: 34,3-46,1) e SLE de 39,1 (IC95%: 33-45) (Figuras 7.18, c e d)

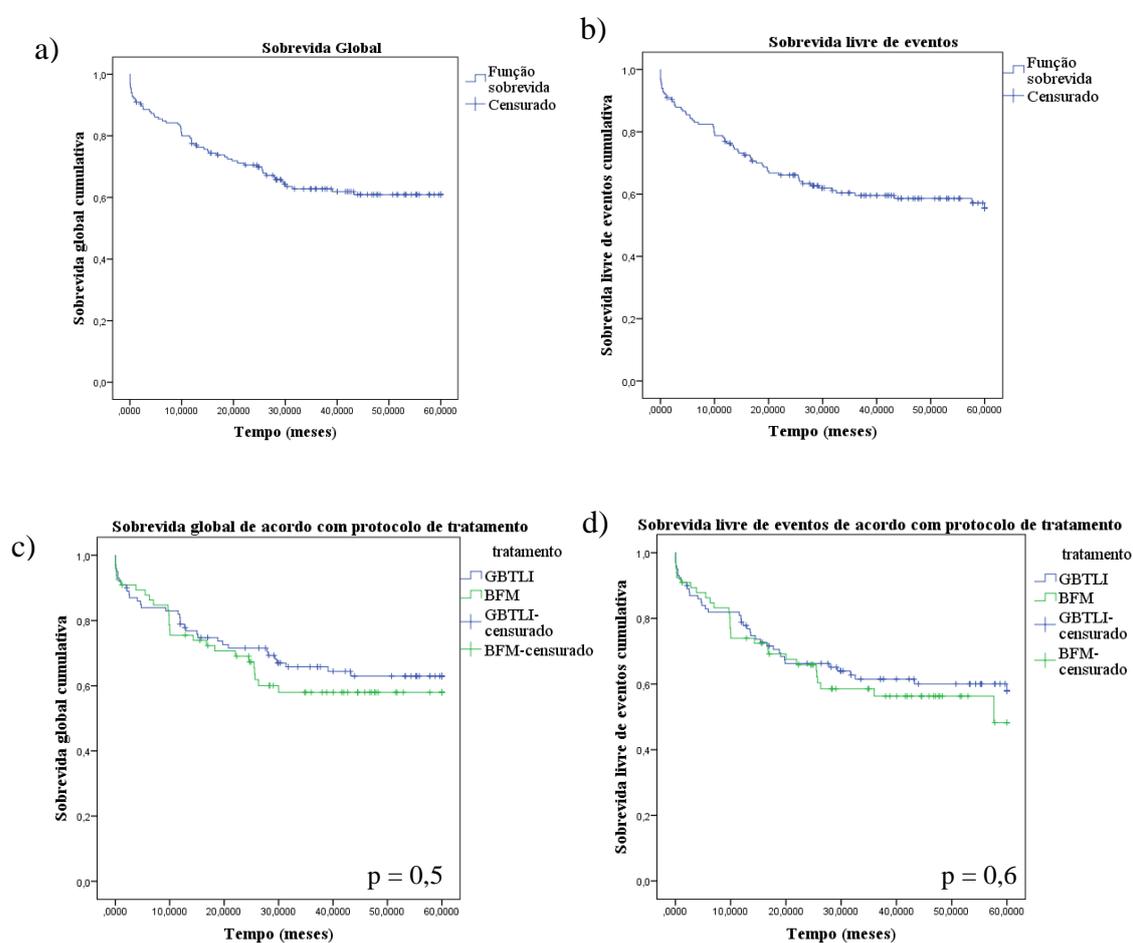


Figura 7.18. Curva de *Kaplan Meier* para a SG, SLE da coorte total e de acordo com os protocolos de tratamento. *P*-valor calculado pelo teste de *log-rank*.

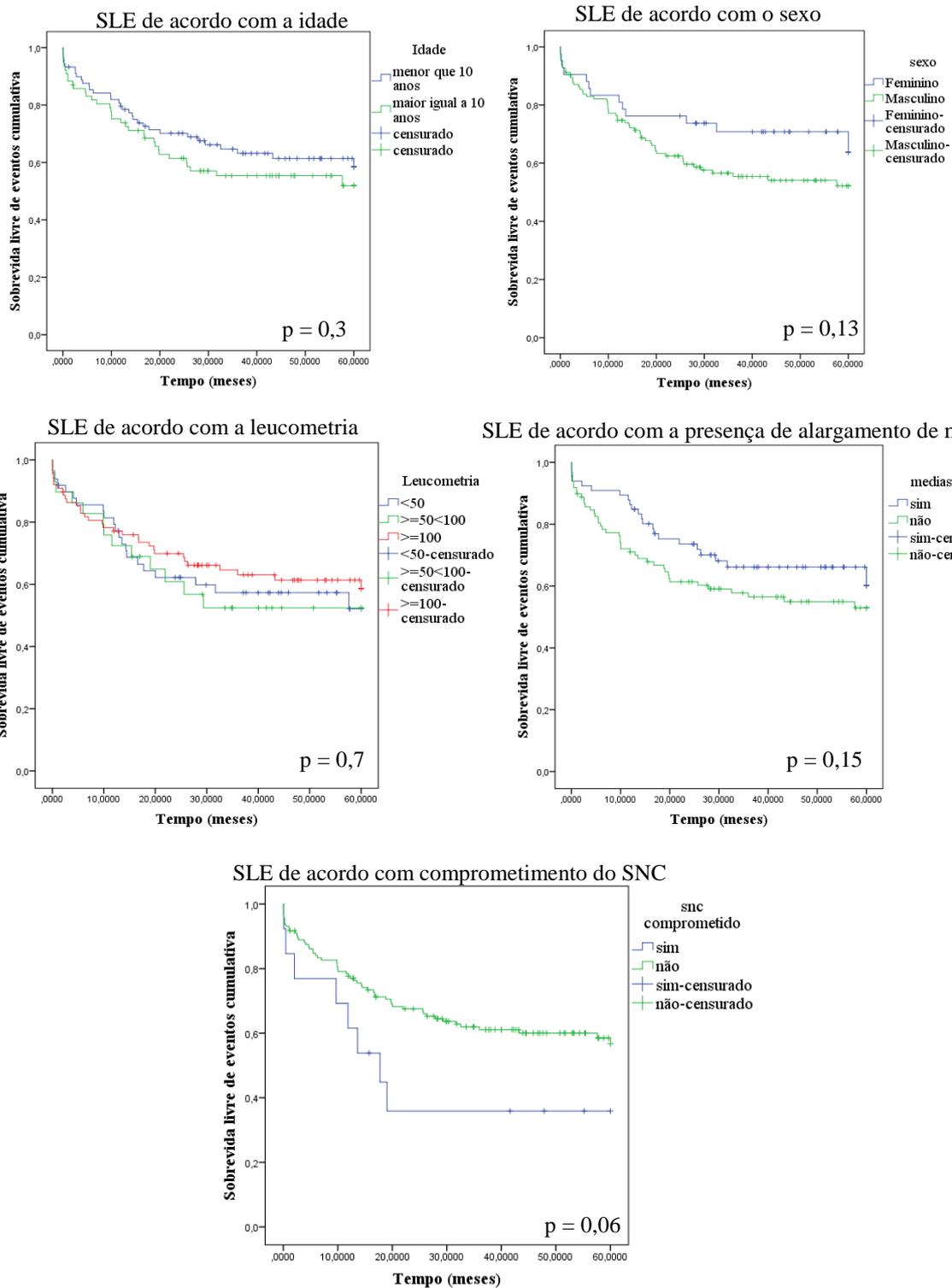
### 7.7.1. Análise da sobrevida livre de eventos de acordo com as variáveis clínicas e demográficas

Nas análises das variáveis clínicas e demográficas e SLE não encontramos diferenças significantes (Tabela 7.11). No entanto, observamos que o sexo masculino tem resultados mais desfavoráveis (38%) que o sexo feminino (45,5%) ( $p = 0,13$ ). Nas curvas de SLE além do sexo masculino, o comprometimento do SNC tem menor SLE 27,7% *versus* 41,1% ( $p = 0,07$ ) (Figura 7.19).

Tabela 7.11. Sobrevida livre de eventos em 60 meses das variáveis clínicas e demográficas.

Variáveis	NE/NT	SLE% (IC95%)	<i>p</i> -valor
<b>Idade (anos)</b>			0,32
<10	33/89	42,1 (36,9-47,2)	
10-18	34/77	38,1 (32,4-43,8)	
<b>Sexo</b>			0,13
Masculino	54/124	38,3 (33,9-42,8)	
Feminino	13/42	45,5 (38,1-52,8)	
<b>Cor da pele</b>			0,70
Branca	24/65	41,3 (35,1-47,4)	
Não-branca	43/101	39,7 (34,9-44,6)	
<b>Leucometria (x10<sup>9</sup>/L)</b>			0,71
< 50	21/49	39,5 (32,5-46,4)	
≥ 50 < 100	13/29	37,4 (28,2-46,6)	
≥100	33/88	41,7 (36,4-46,9)	
<b>Alargamento de mediastino</b>			0,15
Sim	22/66	44,6 (38,9-50,2)	
Não	43/98	38,0(32,9-43,1)	
<b>Sistema nervoso central</b>			0,06
Sim	8/13	27,7 (13,9-41,6)	
Não	57/145	41,1 (37-45,1)	

SLE%: sobrevida livre de eventos, IC95%: Intervalo de confiança de 95%. *p* valor calculado pelo teste de *log-rank*. NE: número de eventos; NT: Número total



SLE: sobrevivida livre de eventos; SNC: sistema nervoso central

Figura 7.19. Curva de Kaplan Meier para a SLE em 60 meses da coorte de acordo com variáveis clínicas e demográficas. p valor calculado pelo teste de *log-rank*.

### 7.7.2. Análise da sobrevida livre de eventos de acordo com o subtipo celular da LLA-T

Inicialmente foram feitas as análises da SLE dos subtipos de acordo com os critérios da classificação EGIL. O subtipo LAB-M/T (33,9 %) e T-IV (35,5%) foram o que apresentaram menores SLE comparado aos demais subtipos, entretanto sem valor estatisticamente significativo (Tabela 7.12). Na Figura 7.20 podemos observar as curvas de sobrevida de cada subtipo comparado com os demais.

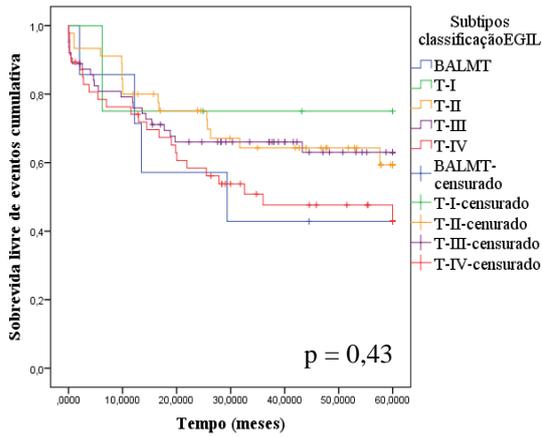
Tabela 7.12. Análise de sobrevida livre de eventos dos subtipos maturativos de acordo com a classificação EGIL

Subtipo	NE/NT	SLE% (IC95%)	NE/NT	SLE% dos demais subtipos (IC95%)	<i>p</i> -valor
LAB <sup>MT</sup>	4/7	33,9 (16,2-51,5)	63/159	40,6 (36,4-44,4)	0,47
T-I	1/4	46,6 (23,8-69,4)	66/162	40,1 (36,3-44,0)	0,6
T-II	16/45	43,5 (36,7-50,3)	51/121	38,9 (34,4-43,6)	0,37
T-III	22/63	41,7 (35,4-47,9)	45/103	39,3 (34,5-44,1)	0,41
T-IV	24/47	35,5 (28,1-43,0)	43/119	42,2 (37,7-46,5)	0,1

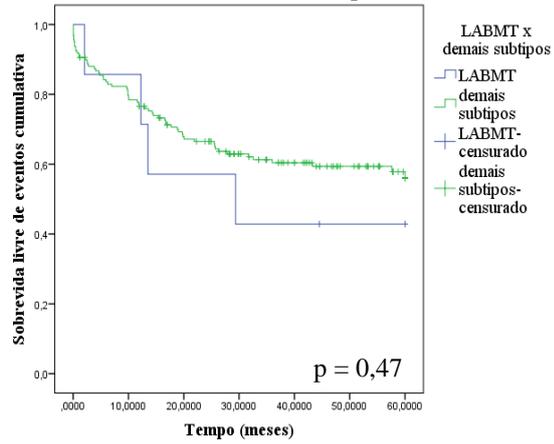
SLE%: sobrevida livre de eventos, IC95%: Intervalo de confiança de 95%; NE: número de eventos; NT: número total. P-valor calculado pelo teste de *log-rank*.

No entanto, ao avaliarmos a SLE nos subtipos pós-reclassificação, observamos que o subtipo ETP (37,1%) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado aos demais subtipos (40,5%) ( $p = 0,41$ ) (Figura 7.21, a). Observamos ainda que o subtipo T-II apresentou a maior SLE (51,2%) ( $p = 0,027$ ) (Figura 7.21, b) e que o subtipo T-II/III apresentou SLE de 36,9%. Os subtipos T-III e T-III/IV tiveram SLE de 44,6% e 38,9%, mas sem diferença significativa quando comparados aos demais subtipos (Figura 7.22 a, b). Os subtipos T-IVSP e DN foram os que apresentaram menor SLE (31%) (Figura 7.22 c, d).

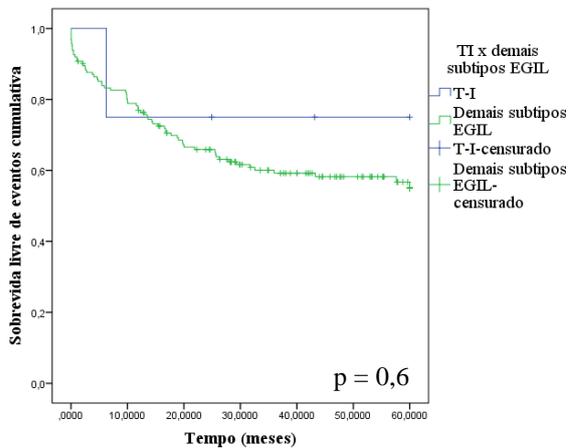
SLE dos subtipos da classificação EGIL



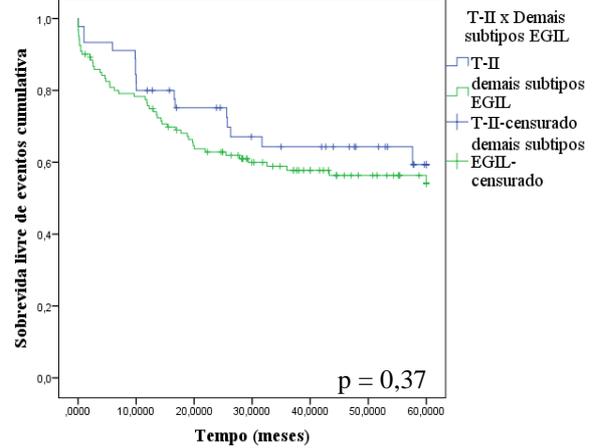
SLE LABMT x Demais subtipos EGIL



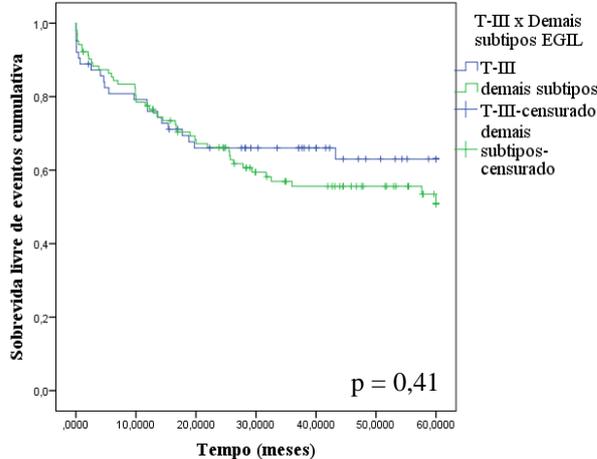
SLE T-I x Demais subtipos EGIL



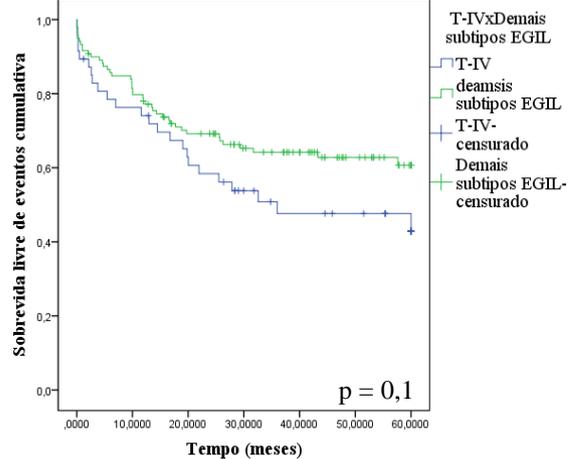
SLE T-II x Demais subtipos EGIL



SLE T-III x Demais subtipos EGIL



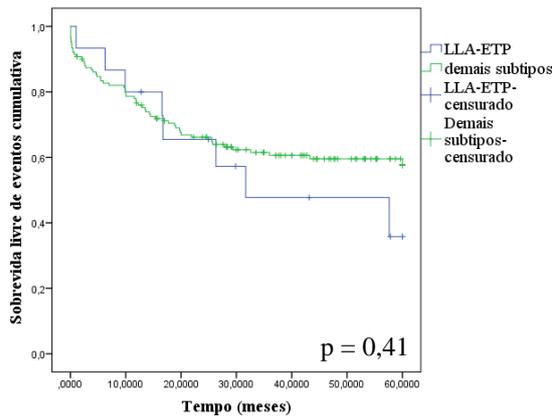
SLE T-IV x Demais subtipos EGIL



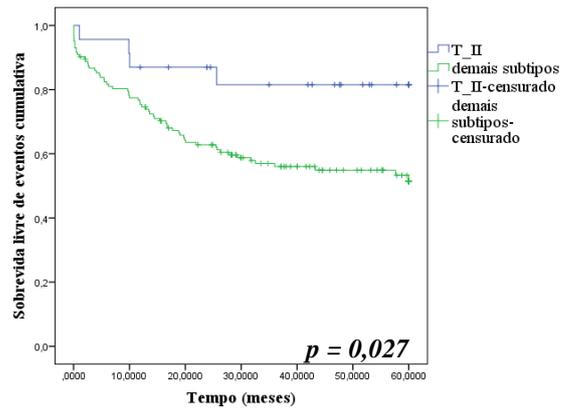
SLE: sobrevida livre de eventos; LABMT: leucemia aguda bifenotípica mielóide-T; EGIL: grupo europeu para a caracterização imunológica das leucemias agudas.

Figura 7.20. Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da sobrevida livre de eventos (SLE) entre os subtipos de acordo com a classificação EGIL. *p*-valor calculado pelo teste de *log-rank*.

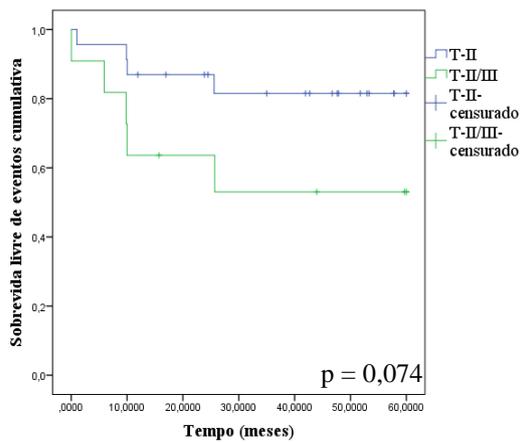
a) SLE LLA-ETP x demais subtipos pós-reclassificação



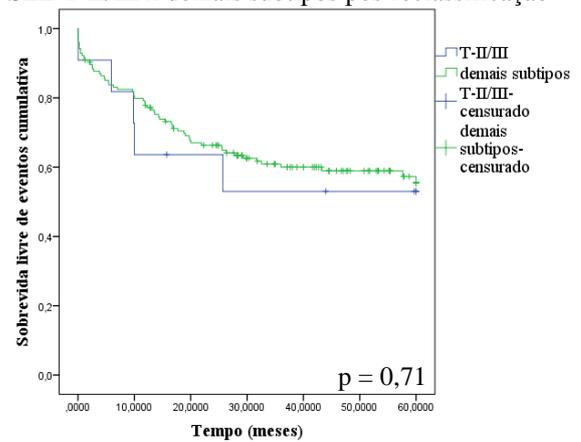
b) SLE T-II x demais subtipos pós-reclassificação



c) SLE T-II x T-II/III



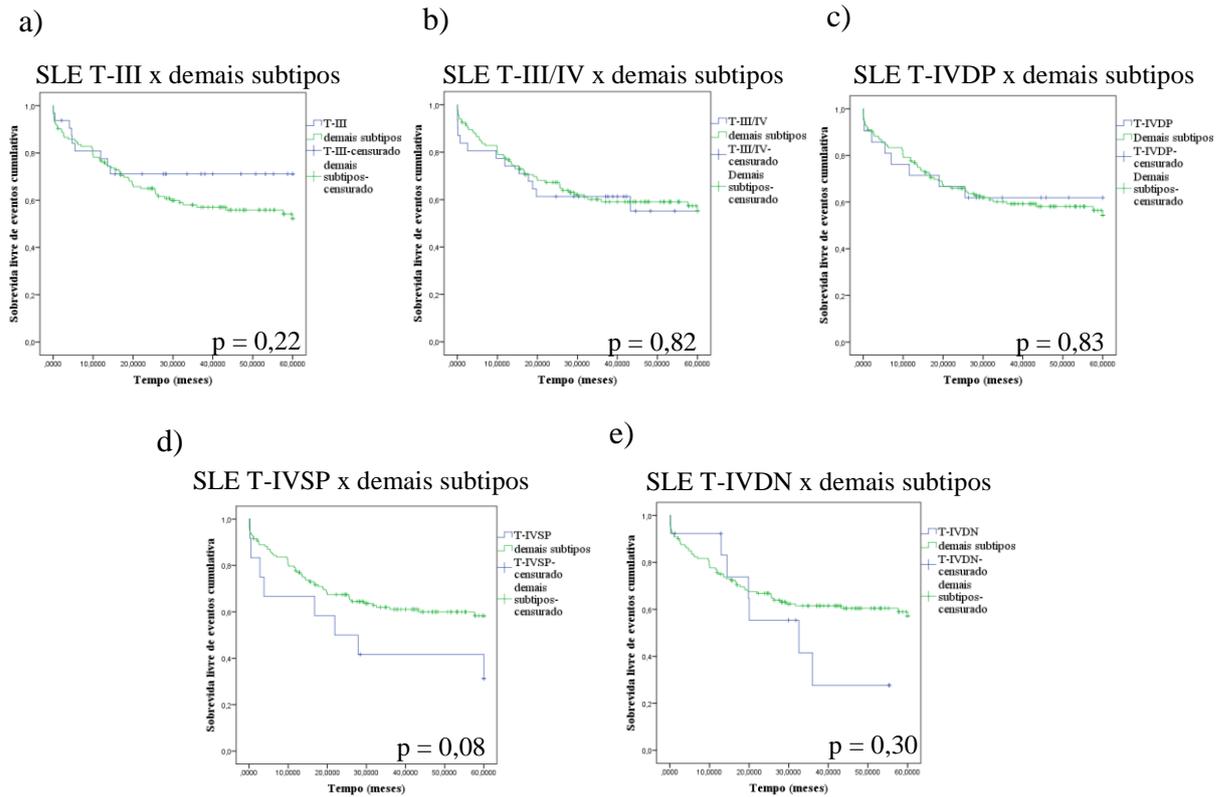
d) SLE T-II/III x demais subtipos pós-reclassificação



Subtipo	NE/NT	SLE% (IC95%)	NE/NT	SLE% dos demais subtipos (IC95%)
LLA-ETP	8/15	37,1 (25,1-49,1)	59/151	40,5 (36,5-44,6)
T-II	4/23	51,2(43,3-59,1)	63/143	38,5(34,4-42,7)
T-II/III	5/11	36,9(21,7-52,0)	62/155	40,5 (36,5-44,5)

NE: número de eventos; NT: Número total de casos; SLE%: sobrevivida livre de eventos, IC95%: Intervalo de confiança de 95%; p-valor calculado pelo teste de *log-rank*.

Figura 7.21. Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da SLE entre os subtipos LLA-ETP, T-II e T-II/III. a) Curva SLE comparando o subtipo LLA-ETP *versus* demais subtipos b) Curva SLE comparando o subtipo T-II *versus* demais subtipos c) Curva SLE comparando o subtipo T-II *versus* T-II/III d) Curva SLE comparando o subtipo T-II/III *versus* demais subtipos.



Subtipo	NE/NT	SLE% (IC95%)	NE/NT	SLE% dos demais subtipos (IC95%)
T-III	9/32	44,6(36,1-53,1)	58/134	39,4 (35,1-43,6)
T-III/IV	13/31	38,9(29,9-47,9)	54/135	40,5(36,3-44,8)
T-IV-DP	8/21	40,5 (29,7-51,4)	59/145	40,3 (36,2-44,3)
T-IV-SP	8/12	31,2 (15,6-46,7)	59/154	41,0(37,1-44,9)
T-IV-DN	7/13	31,1 (20,1-42,0)	60/153	40,6 (36,5-44,7)

NE: número de eventos; NT: Número total de casos; SLE%: sobrevida livre de eventos; IC95%: Intervalo de confiança de 95%; p-valor calculado pelo teste de *log-rank*.

Figura 7.22. Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da SLE entre os subtipos T-III, T-III/IV, T-IV. a) Curva SLE comparando o subtipo T-III *versus* demais subtipos b) Curva SLE comparando o subtipo T-III/IV *versus* demais subtipos c) Curva SLE comparando o subtipo T-IVDP *versus* demais subtipos. d) Curva SLE comparando o subtipo T-IVSP e) Curva SLE comparando o subtipo T-IVDN.

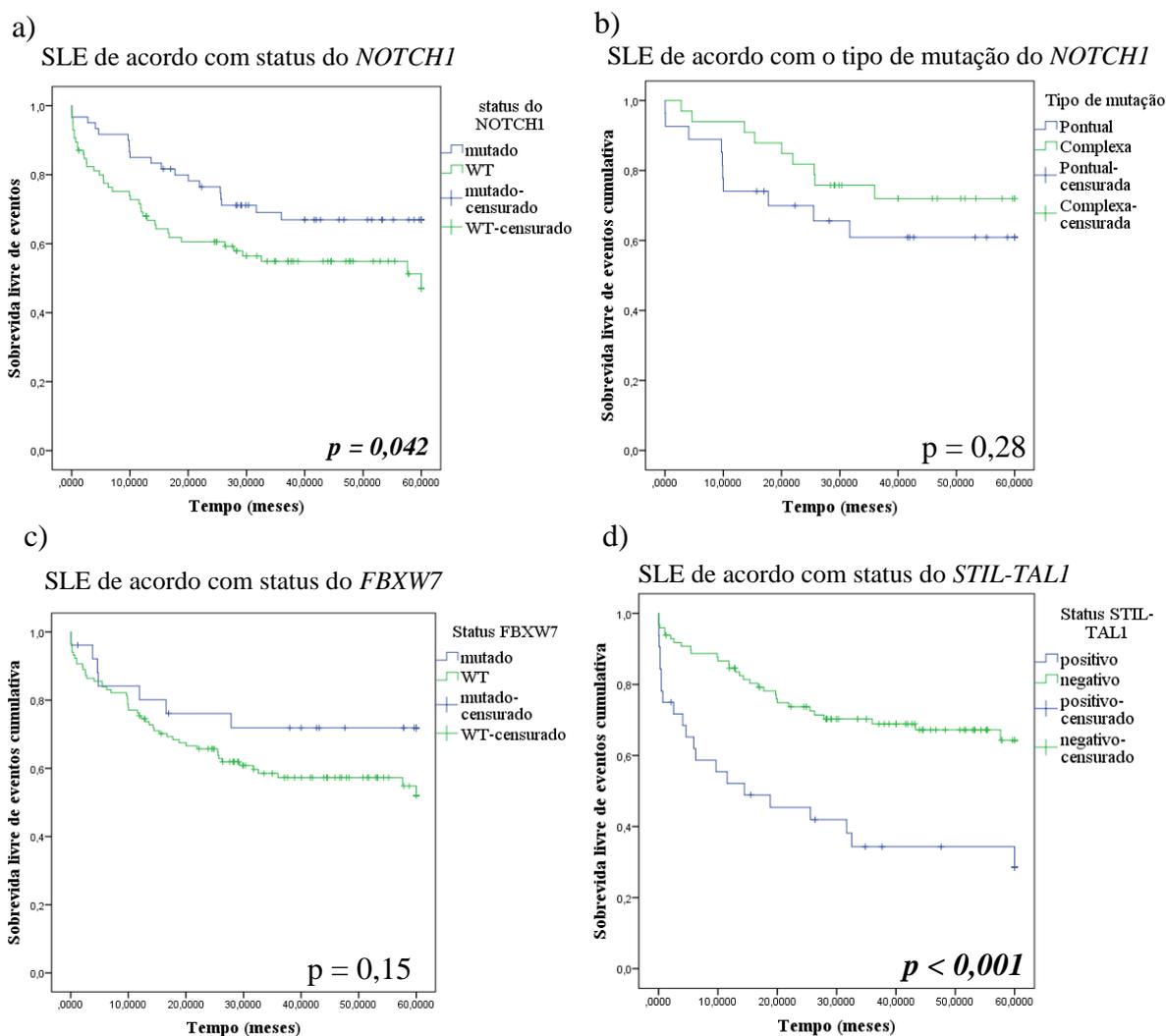
### **7.7.3 Análise de sobrevida livre de eventos de acordo com os marcadores imunofenotípicos**

Avaliamos ainda a SLE em relação a cada marcador do diagnóstico e classificação dos subtipos maturativos de LLA-T bem como do CD135 e CD127, como podem ser vistos em anexo 7. Casos CD127<sup>pos</sup> e CD135<sup>pos</sup> obtiveram uma SLE de 35,1% e 42,7%, respectivamente, sem diferença significativa quando comparados aos casos negativos para esses marcadores. Observamos que as maiores diferenças, foram vistas em relação aos marcadores: CD5, mCD3 e TCR $\alpha\beta$ . Os casos CD5<sup>pos</sup> tinham SLE de 40,8%, enquanto os casos negativos, 33,7% ( $p = 0,092$ ). Casos mCD3<sup>pos</sup> tiveram SLE de 36,9 % ( $p = 0,075$ ). O CD1a, marcador geralmente associado a um bom prognóstico, não apresentou diferença entre os casos positivos (41,9%) e negativos (39,6%) ( $p = 0,6$ ). As curvas de SLE destes resultados encontram-se em anexo (Anexo 8).

### **7.7.4 Análise de sobrevida livre de eventos de acordo com as alterações moleculares e suas associações.**

Das alterações moleculares avaliadas neste estudo, observamos que casos com *NOTCH1*<sup>mut</sup> tinham uma SLE maior (45,9%) do que casos *NOTCH1*<sup>WT</sup> (37,1%) ( $p = 0,043$ ) (Figura 7.23, a). Análise da SLE de acordo com o tipo de mutação do *NOTCH1* (complexa ou pontual) demonstrou que mutações complexas tinham SLE de 48,5% (IC95%: 41,8-55,1) e casos com mutação pontual, SLE de 41,5% (IC95%: 32,3-50,7) ( $p = 0,28$ ) (Figura 7.23, b).

Casos com *FBXW7*<sup>mut</sup> tiveram SLE de 46,5 % enquanto casos *FBXW7*<sup>WT</sup> 39,5% ( $p = 0,15$ ) (Figura 7.23, c). A menor SLE foi verificada em casos com *STIL-TALI*<sup>pos</sup> (28%) quando comparados aos casos negativos (45,0%) para esta alteração ( $p < 0,001$ ) (Figura 7.23, d). Não foram verificadas diferenças significantes na SLE em relação às alterações *N-KRAS*, *IL7R*, *FLT3* e *TLX3* (curvas de SLE em anexo 9).

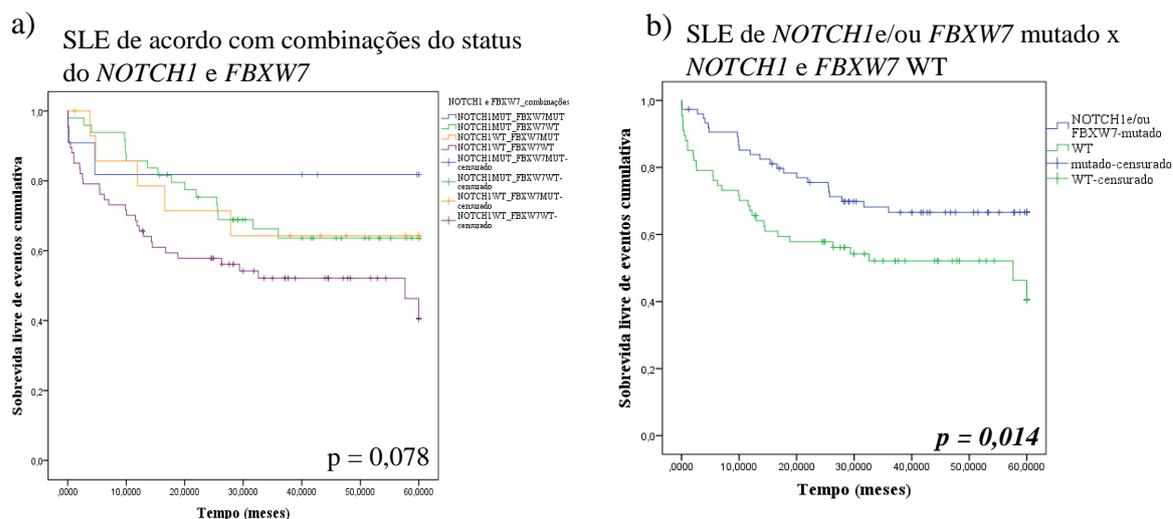


Alteração	NE/NT	Mutado SLE% (IC95%)	NE/NT	WT SLE% (IC95%)
<i>NOTCH1</i>	19/60	45,3 (39,7-50,9)	39/85	37,1 (31,5-42,8)
<i>FBXW7</i>	7/26	46,5 (37,7-55,3)	50/118	39,5 (34,9-44,0)
<i>STIL-TALI</i>	21/32	26,7 (17,2-35,9)	31/98	45,0 (40,4-49,5)

SLE%: Sobrevida livre de eventos; IC95%: Intervalo de confiança de 95%; NE: número de eventos; NT: Número total de casos; WT: selvagem; p-valor calculado pelo teste de *log-rank*.

Figura 7.23. Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da sobrevida livre de eventos (SLE) de acordo com o status do *NOTCH1*, *FBXW7* e *STIL-TALI*. a) Curva SLE comparando *NOTCH1*<sup>mut</sup> versus *NOTCH1*<sup>WT</sup>. b) Curva SLE comparando casos de acordo com o tipo de mutação do *NOTCH1*, complexas versus pontuais. c) Curva SLE comparando casos *FBXW7*<sup>mut</sup> versus *FBXW7*<sup>WT</sup> d) Curva SLE comparando casos positivos e negativos para *STIL-TALI*.

As análises de SLE de acordo com as possíveis combinações do status de *NOTCH1* e *FBXW7* demonstraram que casos com *NOTCH1<sup>mut</sup>* e *FBXW7<sup>mut</sup>* apresentavam SLE de 49,5%, quando a mutação ocorria em apenas um dos genes em questão a sobrevida foi de 44%, e casos sem mutações nesses genes apresentavam SLE de 35,4% (Figura 7.24, a) ( $p = 0,078$ ). Quando a análise foi realizada entre casos com *NOTCH1* e/ou *FBXW7* mutado *versus* casos WT, observamos sobrevida maior (45%) para os casos com mutações, e com diferença significativa ( $p = 0,014$ ) (Figura 7.24, b).



#### Associações moleculares

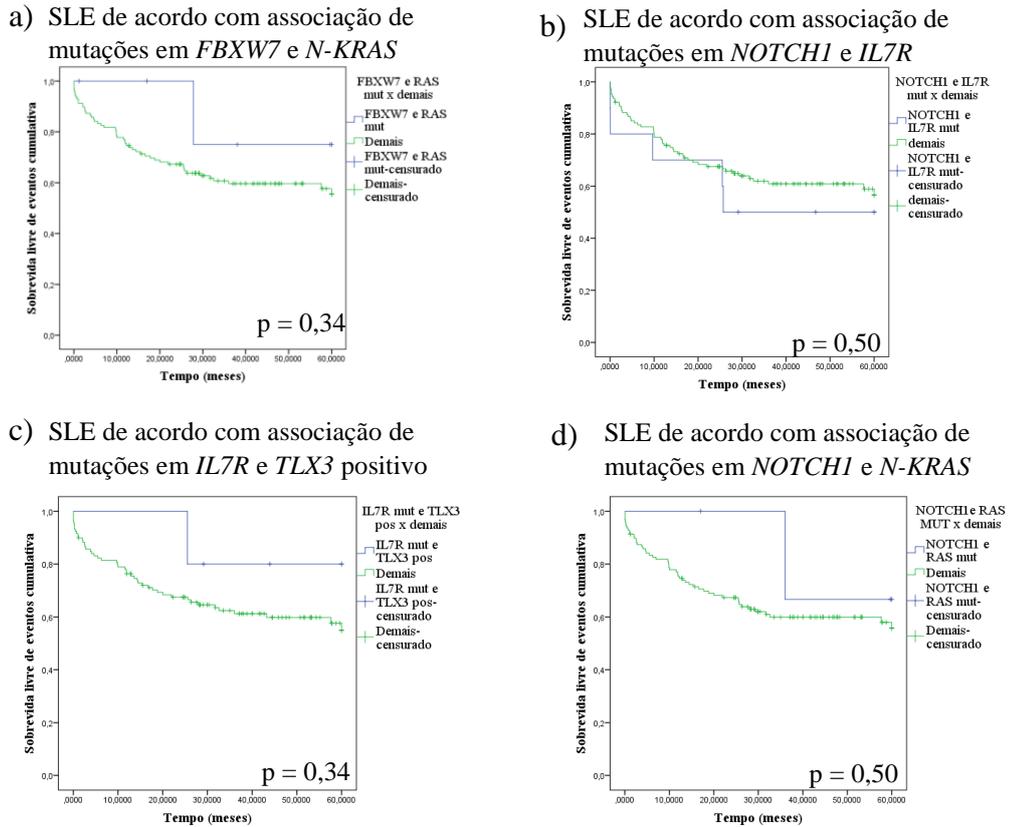
Associações moleculares	NE/NT	SLE% (IC95%)
<i>NOTCH1<sup>MUT</sup></i> + <i>FBXW7<sup>MUT</sup></i>	2/11	49,5 (36,4-62,7)
<i>NOTCH1<sup>MUT</sup></i> + <i>FBXW7<sup>WT</sup></i>	17/49	44,4 (38,3-50,5)
<i>NOTCH1<sup>WT</sup></i> + <i>FBXW7<sup>MUT</sup></i>	5/15	44,2 (32,5-55,8)
<i>NOTCH1<sup>WT</sup></i> + <i>FBXW7<sup>WT</sup></i>	33/67	35,4 (29-42,0)
<i>NOTCH1</i> e/ou <i>FBXW7</i> mutado	24/75	45,0 (39,8-50,0)

SLE%: Sobrevida livre de eventos, IC95%: Intervalo de confiança de 95%; NE: número de eventos; NT: Número total de casos; WT: selvagem; MUT: mutado; p-valor calculado pelo teste de *log-rank*.

Figura 7.24. Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da sobrevida livre de eventos (SLE) de acordo com combinações do status do *NOTCH1* e *FBXW7*.

Analisamos a SLE entre as alterações moleculares que previamente tinham demonstrado associações entre elas. Nenhuma associação demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação a SLE. Observamos que casos *FBXW7<sup>mut</sup>* / *N-KRAS<sup>mut</sup>*

e  $NOTCH1^{mut}/N-KRAS^{mut}$  tinham SLE de 52% e  $IL7R^{mut}/TLX3^{pos}$ , 53%; já a SLE de casos com  $NOTCH1^{mut}$  e  $IL7R^{mut}$  foi 36,1% (Figura 7.25).



Associação	NE/NT	Associações SLE % (IC95%)	NE/NT	Demais casos SLE% (IC95%)
$FBXW7+N-KRAS^{MUT}$	1/6	52,0 (38,3-65,6)	51/126	40,5(36,0-44,8)
$NOTCH1+IL7R^{MUT}$	5/10	36,1 (20,5-51,8)	50/128	41,1 (36,8-45,4)
$IL7R^{MUT}+TLX3^{pos}$	1/5	53,1 (41,0-65,2)	47/119	40,7 (36,1-45,3)
$NOTCH1+N-KRAS^{MUT}$	1/4	52,0 (39,2-64,8)	51/1127	40,5 (35,8-45,0)

SLE%: Sobrevivida livre de eventos, IC95%: Intervalo de confiança de 95%; NE: número de eventos; NT: Número total de casos; WT: selvagem; MUT: mutado; pos: positivo. P-valor calculado pelo teste de *log-rank*.

Figura 7.25. Curvas de Kaplan Meier mostrando SLE de acordo com associações das alterações moleculares. a) Curva SLE comparando casos com mutações em  $FBXW7$  e  $N-KRAS$  versus demais casos. b) Curva SLE comparando casos com mutações em  $NOTCH1$  e  $IL7R$  versus demais casos. c) Curva SLE comparando casos com mutações em  $IL7R$  e  $TLX3$  positivo versus demais casos d) Curva SLE comparando casos com mutações em  $NOTCH1$  e  $N-KRAS$  versus demais casos.

## 8. DISCUSSÃO

LLA-T é uma doença com grande diversidade tanto do ponto de vista biológico, clínico e com prognóstico adverso. Em contraste as LLA-cpB, onde a estratificação de risco se baseia em idade, níveis de leucometria ao diagnóstico, e presença de determinadas fusões gênicas e alterações cromossômicas numéricas, ainda não existe consenso sobre quais alterações moleculares somáticas são preditoras de prognóstico nas LLA-T. Tão pouco existem evidências de um perfil imunofenotípico específico associado com alterações moleculares e prognóstico (HRUSSAK; PORWIT-MACDONALD, 2002; SCHABATH; RATEI; LUDWIG, 2003). Embora extensos estudos moleculares combinados com o perfil de expressão gênica tenham descoberto muitas informações em relação a patogênese da LLA-T, estas descobertas ainda se traduzem em poucos estudos clínicos com benefícios para estratificação de risco e decisão terapêutica. Desta forma entendemos que seria fundamental testar alguns marcadores imunofenotípicos e moleculares dentro de uma coorte de LLA-T brasileira para identificação de potenciais variáveis que possam ter valor prognóstico.

A distribuição de variáveis demográfico-clínicas desta coorte está em conformidade com aquelas descritas na literatura para LLA-T, como maior frequência do sexo masculino, predominância de leucometria elevada, presença de alargamento de mediastino (40-60%) e ocorrência de SNC infiltrado por células leucêmicas (em torno de 5-10%) (REGO *et al.*, 1995, PULLEN *et al.*, 1999; HJALGRIM *et al.*, 2003; SCHRAPPE *et al.*, 2011; AL-MULLA, *et al.*, 2014; FADDOO *et al.*, 2015; WEI *et al.*, 2015). A predominância da cor da pele não-branca, observada neste estudo já foi descrita previamente pelo nosso grupo em uma coorte de LLA-T brasileira (POMBO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2005). Provavelmente nossos resultados são reflexos da grande quantidade de casos originados das regiões brasileiras com grande contingente de indivíduos afrodescendentes, como a região nordeste. Em comparação com a literatura, Bhatia *et al.* 2002 demonstraram maior incidência de LLA-T em crianças negras (25%) comparado com asiáticos (19%), brancos (15%) e hispânicos (13%) nos Estados Unidos.

### *Caracterização do perfil imunofenotípico e identificação dos subgrupos maturativos*

Através da imunofenotipagem pela CFM e com o desenvolvimento de novos AcMo associados a uma variedade de fluorocromos, as leucemias agudas vêm sendo diagnosticadas com mais detalhamento e bem caracterizadas as diversas etapas da diferenciação celular. Nesse

contexto, as LLA-T são estratificadas de forma semelhante aos diferentes estágios de desenvolvimento de timócitos normais, baseando-se na expressão antigênica ao longo da diferenciação das células-T como preconizado pela classificação EGIL (BENE et al., 1995).

Neste trabalho inicialmente caracterizamos os subtipos de LLA-T da coorte brasileira de acordo com a classificação EGIL, reanalisamos todos os subtipos com a inclusão da avaliação da expressão celular de marcadores mielóides e de células tronco hematopoéticas, para identificação dos subtipos LAB-M/T e as LLA-ETP. Além do CD117, CD127 e CD135, para testar se variações nos perfis imunofenotípicos poderiam estar associados a alterações somáticas genômicas das LLA-T.

Identificados assim os grupos LAB-M/T, LLA-ETP, e os casos remanescentes que haviam sido classificados de acordo com a classificação EGIL foram cuidadosamente revisitados para a identificação de possíveis subgrupos tendo como base os principais grupos propostos pela classificação EGIL (T-II, T-III e T-IV).

De acordo com a classificação EGIL verificamos que o subtipo T-III (T-cortical) foi o subtipo mais frequente, seguido de frequências semelhantes do T-II (pré-T) e T-IV (T-medular). Cabe ressaltar que o subtipo T-I (pró-T) foi extremamente raro, com apenas cinco casos com este perfil na coorte. Esses dados estão de acordo com o que está descrito na literatura para a frequência dos subtipos EGIL. Observamos que os subtipos mais indiferenciados T-I e T-II foram os que sofreram maiores alterações, uma vez que todos os casos do subtipo T-I foram reclassificados como LLA-ETP, além da reclassificação de 13 casos T-II, totalizando 18 casos de LLA-ETP (BÉNÉ, 2004; BÉNÉ, 2005; SZCZEPANSKI; VAN DERVELDEN; VAN DONGEN, 2006; BABUSIKOVA; STEVULOVA; FAJTOVA, 2009).

No contexto normal, células hematopoéticas progenitoras com um fenótipo distinto de marcador de linhagem negativo ( $\text{Lin}^{\text{neg}}$ )  $\text{cKit}^{\text{pos}}\text{FLT3}^{\text{pos}}\text{IL7R}^{\text{neg/baixo}}$  chegam ao timo. Estas células comumente se referem como sendo as ETP, e podem ser identificadas dentro do subconjunto de timócitos CD4 CD8 negativos (DN), sendo caracterizadas como  $\text{CD34}^{\text{pos}}$  e  $\text{CD44}^{\text{pos}}$ , além de expressar baixos níveis de marcadores mielóides, como CD33. Estas possuem potencial multi-linhagem, incluindo potencial para o desenvolvimento de células-T, mielóide e *natural killer* (NK) e células dendríticas (ARDAVIN *et al.*, 1993; BHANDoola; SAMBANDAM, 2006; BEL; BHANDoola, 2008; WADA *et al.*, 2008; GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2012).

Para identificação das LLA-ETP utilizamos inicialmente os critérios imunofenotípicos estabelecidos por Coustan-Smith *et al.*, (2009). Esses critérios foram: a expressão do CD1a e

CD8 em menos de 5% dos blastos, CD5  $\leq$  75% e marcadores de linhagem mielóide e/ou imaturidade em mais de 25% dos blastos. Levando em consideração estes critérios, encontramos 11 casos (5,8%) que se enquadravam nesse perfil. Coustan-Smith *et al.* (2009) encontrou uma incidência de aproximadamente de 12,2% (17/139) na coorte do grupo de estudo do *St Jude Children's Research Hospital* e 13% (13/100) do grupo AIEOP ALL-2000. No *Shanghai Children's Medical Center* esta frequência foi de 16,2% (12/74) (MA *et al.*, 2012). Entretanto frequências de LLA-ETP semelhantes à nossa, também foram identificadas no grupo *Tokyo Children's Cancer study group L100-15* (5,5%) (INUKAI *et al.*, 2011) e frequência de 5% (11/222) na coorte do *Medical Research Council UK-ALL2003* (PATRICK *et al.*, 2013). É importante salientar que a frequência deste último se refere à quando os pesquisadores utilizaram os critérios de Coustan-Smith *et al.* (2009), pois identificaram ainda um grupo de 24 casos que chamaram de provável ETP, e que para identificação desses casos, levaram em consideração positividade para o CD5 em mais de 75% das células ou que não tinham sido testados para esse marcador, e que eram negativos para CD1a e CD8 e positivos para marcadores de células mielóides ou de células tronco (PATRICK *et al.*, 2013).

Recentemente Zuurbier *et al.* (2014) demonstraram que a classificação das LLA-ETP baseado nos critérios de Coustan-Smith *et al.* (2009) pode subestimar significativamente o número de pacientes que possuem um perfil de expressão gênica imaturo e/ou de LLA-ETP. O estudo de Coustan-Smith *et al.* (2009) teve como base a avaliação do perfil de expressão gênica de 55 casos de LLA-T, em que 13 casos tinham o perfil gênico semelhante de ETP, entretanto apenas 9 se enquadraram no perfil imunofenotípico proposto. Outros dois trabalhos buscaram a identificação das LLA-ETP baseando-se apenas no perfil de expressão gênica encontrando frequências bem mais elevadas 35% (14/40) (GUTIERREZ *et al.*, 2010) em coorte de crianças e 52,8% (28/53) numa coorte em adultos (VAN VLIERBERGHE, *et al.*, 2013).

Dado o exposto, na revisitação dos casos identificamos perfis imunofenotípico muito próximos aos das LLA-ETP, inclusive que possuíam alteração moleculares características desse subtipo (Ex. *FLT3*, que será discutido posteriormente), mas que por apresentarem expressão em mais de 5% do CD8, por exemplo, embora ainda sendo considerados negativos pelo ponto de coorte de 20%, não podiam ser classificados como LLA-ETP pelos critérios de Coustan-Smith *et al.* (2009). Buscamos então na literatura outros critérios que pudessem auxiliar na identificação destes casos de LLA-ETP. Identificamos que o sistema de score sugerido por Inukai *et al.* (2011) demonstraram uma especificidade de 100% e sensibilidade de 94,1%, enquanto o perfil proposto por Coustan-Smith *et al.* (2009) possuía especificidade de 100% e

sensibilidade de 76,5% na identificação dos casos com perfil de expressão gênica semelhantes as ETP. Portanto, com esse sistema de score confirmamos os 11 casos que já tinham sido identificados previamente pelos critérios de Coustan-Smith *et al.* (2009) e ainda foram identificados mais 7 casos (que seriam classificados com T-II (pré-T) pela classificação EGIL) que não preenchiam esses critérios clássicos. Análises comparativas em relação a perfil imunofenotípico de marcadores mielóides e de células troncos, características demográficas e clínicas e alterações moleculares não foram diferentes de forma significativa entre estes sete casos dos demais, inicialmente identificados pelos critérios de Counsthan-Smith, assumimos assim que estes casos eram LLA-ETP, sendo assim a frequência de LLA-ETP na coorte brasileira de 18 casos (9,5%).

Além disso, identificamos ainda dentro do subtipo T-II um grupo que chamamos de T-II/III, em que os casos foram DP para CD4 e CD8, mas por serem CD1a<sup>neg</sup> não poderiam ser classificados como T-III (cortical), como preconizado pela EGIL. Identificamos ainda o subtipo T-III/IV, que seria classificado como T-III pela classificação EGIL. Esses casos já apresentavam o mCD3, mas ainda mantinham a expressão do CD1a. Este estágio é reconhecido como cortical tardio em LLA-T, e, em sua grande maioria, apresentam-se DP para CD4 e CD8, assim como no estágio T-III (FERRANDO *et al.*, 2002; KEERSMAECKER; MARYNEM; COOLS, 2005, SZCZEPANSKI; VANDERVELDEN; VANDONGEN, 2006).

Na diferenciação normal das células-T, o comprometimento com a linhagem T é caracterizado pela perda progressiva do CD34, CD44 e CD33 e aquisição sequencial de CD1a. Quando o marcador CD1a é expresso os rearranjos das cadeias do  $\delta$ ,  $\gamma$ , e  $\beta$  do TCR são iniciadas e são completamente ativos no estágio subsequente, chamado de imaturo simples positivo para o CD4, este subconjunto contém os precursores de linhagem  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$ . Com a produção das cadeias  $\delta$  e  $\gamma$  do TCR células-T CD3<sup>pos</sup> TCR $\gamma\delta$  serão originadas, enquanto o sucesso do rearranjo da cadeia  $\beta$  do TCR resulta na associação com a cadeia pT $\alpha$  formando assim o complexo pré-TCR. O pré-TCR coopera com sinais do NOTCH1 na seleção  $\beta$  para induzir uma onda proliferativa e a progressão para o estágio DP. Rearranjos adicionais no *locus* da cadeia  $\alpha$  do TCR nos timócitos DP favorece a expressão do TCR $\alpha\beta$ . As células DP que sobrevivem a seleção negativa e positiva mediada pelo TCR dão origem as células CD4 ou CD8 SP que iram migrar para a periferia (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2012; TAGHON; WAEGEMANS; VAN DEWALLE, 2012).

O subtipo T-IV foi categorizado em três subgrupos baseando-se na positividade de CD4 e CD8. Classicamente espera-se que esse estágio mais maduro, seguindo a lógica de

diferenciação de células-T normais, apresente uma maior proporção de casos simples positivo para CD4 e/ou CD8 (TERSTAPPEN;HUANG; PICKER, 1992), entretanto não foi o que verificamos. A maior proporção dos casos (43%) foi duplo positivo para CD4 e CD8, grupo denominado como T-IV<sup>DP</sup>, e ainda encontramos uma significativa proporção de casos T-IV que eram duplo negativos para CD4 e CD8 (T-IV<sup>DN</sup>) (29,4%).

Um ponto levantado na classificação EGIL são os casos que expressam os TCR $\alpha\beta$  e TCR $\gamma\delta$  e são determinados como subgrupos a e b, respectivamente. Na nossa coorte observamos que 50% dos casos T-III/IV eram positivos para TCR, resultado semelhante também foi visto por ASNAFI *et al* (2003a), onde 40% dos casos com expressão do CD1a tinham também expressão dos TCR. Entretanto, a classificação EGIL recomenda que casos com expressão do CD1a devem ser classificados como T-III independentemente da positividade de qualquer outro marcador de linhagem T. E em seguida sugere, baseado em dados preliminares da época (ALFSEN *et al.*, 1991; MACINTYRE *et al.*, 1990), que esses subgrupos podem representar dois subtipos de LLA-T clinicamente e fenotipicamente distintos. O que de fato foi demonstrado posteriormente, principalmente em relação as alterações moleculares que podem ser específicas de uma linhagem ou outra de TCR (BREIT *et al.*, 1993; ASNAFI *et al.*, 2003b; ASNAFI *et al.*, 2004; VAN GROTEL *et al.*, 2008; LHERMITTE *et al.*, 2013; BEN ABDELAI *et al.*, 2014).

Na nossa coorte não foi possível avaliar os casos de acordo com a classificação ASNAFI *et al.* (2003a), por não termos testado cadeia  $\beta$  intracitoplasmática do TCR, além disso, para se ter a configuração dos rearranjos gênico das cadeias dos TCR é necessária uma laboriosa técnica molecular, o que por vez pode inviabilizar sua utilização na prática clínica, e o que torna assim a classificação EGIL mais plausível de ser utilizada.

Entretanto, ao avaliarmos os casos positivos para TCR $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ , observamos que há uma proporção maior de casos T-IV<sup>DN</sup> com expressão celular do TCR $\gamma\delta$  do que TCR $\alpha\beta$ , enquanto esta proporção é invertida nos casos T-IV<sup>DP</sup>, e ainda foram encontrados o perfil T-IV<sup>DN</sup>, embora menos frequente, com TCR $\alpha\beta$ . Estes perfis imunofenotípicos também foram identificados por ASNAFI *et al.* (2003a) e Matos *et al.* (2005). As maiores frequências de TCR $\alpha\beta$  DP e TCR $\gamma\delta$  DN em LLA-T assemelham-se ao que é visto no compartimento normal de células-T, em que a maioria dos casos DP são TCR $\alpha\beta$  e a maioria TCR $\gamma\delta$  são DN. Entretanto, a proporção de LLA-T com expressão do TCR $\gamma\delta$  é relativamente elevada, quando comparada ao compartimento normal em que representam apenas cerca de 1% das células (Matos *et al.*, 2005). Provavelmente, estas células podem ter um aumento do potencial de transformação

maligna, uma vez que se é descrito diversas alterações restritas a linhagem  $\gamma\delta$ , como os rearranjos gênicos *PICALM-MLLT10*, *SET-NUP214* e mutações em *FLT3* (ASNAFI *et al.*, 2003b; LHERMITTE *et al.*, 2013; BEN ABDELAI *et al.*, 2014). Além disso foi demonstrado mais recentemente que células humanas TCR $\gamma\delta^{\text{pos}}$  podem se diferenciar em duas vias a partir de células TCR $\gamma\delta$  DN, originando células TCR $\gamma\delta$  com diferentes perfis imunofenotípicos além de DN, como: CD4SP, CD8SP e DP. Sendo estes imunofenótipo também encontrados em células leucêmicas como foi identificado também na nossa coorte (VAN COPPERNOLLE *et al.*, 2012).

Para a identificação das LAB-M/T aplicamos o sistema de score proposto pela classificação EGIL, então identificamos 7 casos (3,7%) que foram classificados como LAB-M/T. Esta frequência de LAB-M/T também está de acordo com o descrito na literatura (2-5%) (OWAIDAH, *et al.*, 2006; WEINBERG; ARBER, 2010). Cabe ressaltar que todos os casos identificados como LAB-M/T pela classificação EGIL também estão de acordo com a classificação OMS 2008. Como preconizado, devem ser positivos para o aMPO e CD3 intracitoplasmático para serem considerados como leucemia de fenótipo misto mielóide-T (BOROWITZ, M. *et al.*, 2008). Optamos pela classificação EGIL como uma melhor forma de identificar as leucemias agudas de fenótipo misto, uma vez que encontramos alguns casos (n = 12), que apresentavam a expressão do aMPO e CD3 intracitoplasmático, porém não tinham qualquer outra evidencia, além desses marcadores, de comprometimento com a linhagem mielóide e/ou imaturidade, como a presença de outros marcadores frequentemente positivos nas leucemias de fenótipo misto (CD13, CD33, CD117, CD11b, CD15, CD14, HLA-DR, CD34). Portanto, desconsideramos esses casos como leucemia bifenotípica, por supormos que talvez tenha ocorrida algum problema na marcação desses casos, porém merecem ser melhor investigados. Vale ressaltar que a OMS 2008 estabelece um papel central para aMPO intracitoplasmático detectado pela citometria de fluxo na classificação da LMA ou de fenótipo misto (M/B ou M/T), contudo, não estabelece um ponto de corte em relação aos níveis de expressão e porcentagem de células positivas para esse marcador, o que vem sendo alvo de críticas na literatura (VAN DE ANCKER *et al.*, 2013; GUY *et al.*, 2013). No nosso estudo todos os casos classificados como LAB-M/T apresentaram positividade para o a MPO em mais de 50% dos blastos. Ainda não existe consenso quanto as abordagens terapêuticas para estes casos de fenótipo misto, entretanto há relatos na literatura que casos tratados como LLA teriam maiores taxas de sobrevida do que os casos tratados como LMA (MATUTES *et al.*, 2011; MEJSTRIKOVA *et al.*, 2010).

A fim de verificar se os subtipos maturativos definidos na nossa coorte pós-reclassificação tinham diferenças em relação a expressão de marcadores não restritos a linhagem T, analisamos cada subtipo individualmente comparando com todos os demais. Os marcadores não restritos a linhagem T que foram mais frequentes na nossa coorte foram CD34 (34,3%), CD13 ou CD33 (30,5%) e CD10 (38,2%) o que é de acordo com o descrito na literatura como sendo estes marcadores aberrantemente mais expressos na LLA-T (PUI *et al.*, 1990; UCKUN *et al.*, 1997; PORWIT-MACDONALD *et al.*, 2000; BABUSIKOVA, TOMOVA, 2002; IWAMOTO *et al.*, 2011). Identificamos que CD34, CD13/CD33, CD117 foram significativamente mais frequentes em perfis mais imaturos da nossa coorte (LLA-ETP e T-II) semelhante a literatura (UCKUN *et al.*, 1997; ASNAFI *et al.*, 2003a). Verificamos ainda que estes marcadores embora mais frequentes nos casos mais imaturos também estão presentes em casos mais maduros. Da mesma forma, foi verificado por ASNAFI *et al.* (2003a) em que 25 a 50% dos casos positivos para CD3m e TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  expressavam o CD34, e em torno de 10% expressavam CD13 ou CD33. As menores frequências dos marcadores CD13/CD33 e CD117 foram verificadas nos subtipos T-III e T-III/IV, embora nestes subtipos foram identificadas as maiores frequências de CD10. O CD34 foi menos frequente (presente em apenas 21,9% dos casos) no subtipo T-III e completamente ausente no subtipo T-II/III. A expressão CD10 em LLA-T foi associado ao estágio cortical imaturo (CD1a positivos e CD3 membrana negativo) (FERRANDO *et al.*, 2002), de fato na nossa coorte observamos uma grande proporção de casos CD10<sup>pos</sup> nesse subtipo, entretanto esta expressão foi mais significativa no cortical maduro CD1a<sup>pos</sup>/CD3m<sup>pos</sup>.

Em relação as variáveis clínicas e demográficas nos subtipos pós-reclassificação as principais diferenças encontradas foi que 50% das LLA-ETP possuíam leucometria  $\leq 50 \times 10^9/L$ , fato esse descrito em outros estudos (MA *et al.*, 2012; ALLEN *et al.*, 2013; PATRICK *et al.*, 2014; ZUURBIER *et al.*, 2014). Por outro lado, observamos que a mediana da leucometria do subtipo T-II/III foi a maior entre todos os subtipos, em que 66% possuíam leucometria  $\geq 100 \times 10^9/L$ .

Outro fato que observamos foi que a proporção de sexo masculino: feminino variou entre os subtipos, como por exemplo, com a proporção praticamente igual entre masculino e feminino para o subtipo T-IV<sup>DN</sup>, em que no geral para LLA-T seria de 3:1 ou 4:1. A variação da proporção de casos masculino e feminino entre os subtipos maturativos, talvez possa ser explicada por mutações em genes supressores tumorais localizados no cromossomo X, como o gene *UTX* que foi identificada exclusivamente no sexo masculino (VAN DER MEULEN *et al.*,

2015), assim como mutações no gene *PHF6*, em que de 38 amostras rastreadas, apenas um caso foi do sexo feminino. Vale ressaltar que todos os casos pediátricos com esta alteração foram distribuídos entre os estágios T-cortical (T-III) e pré-T (T-II) (VAN VLIERBERGUE *et al.*, 2010). O perfil maturativo dos casos com mutação em *UTX* não foi descrito, entretanto em células leucêmicas com esta alteração, de modelos murinos, foi observado que eram predominantemente duplo positivas para CD4 e CD8, com baixa expressão do CD3 de membrana (VAN DER MEULEN *et al.*, 2015). Desta forma podemos sugerir que determinados perfis imunofenotípicos possam ter maior ou menor frequência de alterações sexo-específicas.

Estes dados sugerem preliminarmente que estes subtipos pós-reclassificação são distintamente diferentes em alguns pontos, não apenas em relação a marcadores de linhagem T e também não específicos de linhagem T, mas também em relação a variáveis clínicas e demográficas. Portanto as LLA-T têm subtipos imunofenotípicos distintos e provavelmente preditores de alterações genômicas somáticas de valor prognóstico.

#### *Caracterização molecular*

Alterações moleculares em oncogenes e genes supressores de tumor em LLA-T atualmente cooperam para direcionar a completa transformação leucêmica, entretanto ainda falta um completo entendimento das interações das alterações genéticas que preferencialmente podem co-ocorrerem em LLA-T, além do entendimento da exata ordem em que as alterações genéticas são adquiridas durante a iniciação, progressão e/ou manutenção da doença (DURNICK *et al.*, 2015). Diversas alterações moleculares podem afetar sobrevivência e proliferação das células como mutações somáticas principalmente genes atuantes nas vias de sinalização celular como *N-KRAS*, *FLT3*, *IL7R*, *NOTCH1*, *PTEN*, capacidade de auto-renovação conferida por mutação em *N-KRAS*, bloqueio na diferenciação pela ativação de fatores de transcrição oncogênico como *TLX1*, *TLX3*, *TAL1*, *LMO1*, *LMO2*, genes *HOXA* frequentemente encontradas na LLA-T (VAN VLIERBERGHE; FERRANDO *et al.*, 2012).

Na nossa coorte investigamos algumas dessas alterações e determinamos suas frequências. Mutações nos genes *NOTCH1*(43,7%), *FBXW7* (18,1%), *IL7R* (7,2%), *N-KRAS* (9%), *FLT3*(5,5%), e os rearranjos *STIL-TAL1*(23,6%) e *TLX3* (11,8%). Estas frequências estão semelhantes a maioria dos trabalhos que investigaram estas alterações e revisados em Keersmaecker; Marynem; Cools, (2005); Graux *et al.*, (2006); Aifantis, Raetz, Buonamici, (2008); Van Vlierberghe *et al.* (2008); Van Vlierberghe; Ferrando *et al.* (2012), exceto para a

presença do *TLX3* que na nossa coorte foi de 11,8% e a maioria dos estudos relata uma frequência de aproximadamente 20%. Em estudos anteriores do nosso grupo esta frequência também se manteve baixa (8,4%) (MANSUR *et al.*, 2012).

As frequências das variáveis demográficas e clínicas de acordo com o status das alterações moleculares foi avaliada. A associação mais importante foi observada em relação a mutação no *N-KRAS* e idade menor do que 10 anos. Resultados semelhantes foram descritos por Perentesis *et al.* (2004) em crianças tratadas pelo protocolo do *Children's Cancer Group* (CCG) para LLA em geral (B e T). Por outro lado, um estudo recente em LLA-T pediátrica, no Reino Unido, não encontrou essa associação de mutação em *RAS* e idade (JENKINSON, *et al.*, 2016). Este achado é importante porque mutações em *RAS* são descritas como prováveis eventos iniciais na leucemogênese (TREMBLAY; CURTIS, 2014).

Neste contexto, um ponto a ser discutido é em relação as mutações concomitantes em *NOTCH1* e *N-KRAS* em que modelos murinos de indução de LLA-T através da mutação *KRAS*<sup>G12D</sup> adquirem mutações no *NOTCH1* em aproximadamente 50% dos animais (KINDLER *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2013), esses dados sugerem que o *NOTCH1* seja um evento secundário na leucemogênese da LLA-T. Na nossa coorte observamos que 46% dos casos com mutação no *N-KRAS* também possuíam mutação em *NOTCH1*, entretanto não foi observada uma associação significativa uma vez que a proporção de *NOTCH1* na coorte total é de 43%. Outro ponto importante é a inclusão deste marcador na caracterização de LLA-T, pois é um candidato a alvo terapêutico (STEELMAN *et al.*, 2011).

Em relação as associações significantes entre as alterações moleculares observamos associações do gene *IL7R* com *NOTCH1* e o *TLX3*, em que 83% e 45% dos casos, respectivamente com mutação no *IL7R* possuíam estas alterações moleculares, estes dados confirmam associação encontrada por Zenatti *et al.* (2011) que também demonstrou associações entre mutações no *IL7R* e o subgrupo oncogênico *TLX*. Entretanto não foi observada associação com o *NOTCH1*. Vale destacar que no trabalho de Zenatti *et al.* (2011) o gene *NOTCH1* foi avaliado em conjunto com o *FBXW7* como uma variável única. Estudos experimentais em modelos murinos mostram que o *IL7R per se* não foi capaz de induzir LLA-T sendo necessária uma interação com *NOTCH1* para o desenvolvimento da LLA-T, estes dados podem explicar a associação encontrada no nosso estudo para essas duas alterações em pacientes com LLA-T (YOKOYAMA *et al.*, 2012).

Foi observado ainda associação entre *N-KRAS* e *FBXW7* onde 46,2% dos casos com *N-KRAS* apresentavam mutações no *FBXW7*. Recentemente o valor prognóstico das combinações

*NOTCH1-FBXW7*<sup>mutado</sup> em associação com status de *N-KRAS* e *PTEN* no prognóstico de pacientes adultos e pediátricos tem sido avaliada (TRINQUAND *et al.*, 2013; JENKINSON, *et al.*, 2016).

As mutações encontradas no domínio HD do NOTCH1 induzem uma clivagem do receptor independente de ligante, onde a porção intracelular do Notch1 (ICN1), que atua como um fator de transcrição, é deslocada para o núcleo. As mutações também podem ocorrer na porção ICN1, no domínio PEST do NOTCH1, impedindo a interação com o FBXW7 e posterior degradação pelo proteossoma, aumentando assim o tempo de meia-vida da porção intracelular e mantendo a via de sinalização mediada pelo NOTCH1 ativada. Da mesma forma, quando as mutações ocorrem no *FBXW7*, a porção intracelular do NOTCH1 assim como outras proteínas, como c-Myc, tem sua ubiquitinação e posterior degradação afetada (MALECKI *et al.*, 2006; THOMPSON *et al.*, 2007; O'NEIL *et al.*, 2007; KING *et al.*, 2013). A sinalização oncogênica do RAS impacta principalmente na via RAF/MEK/ERK e mutações no *NOTCH1* e *IL7R* contribuem para uma maior ativação da via PI3K/Akt/mTOR, por outro lado, o gene *PTEN* é o principal regulador negativo desta última e também se encontra mutado nas LLA-T. Alterações nessas vias conferem vantagem proliferativa a célula, bem como resistência a quimioterapia. Por isso a importância do estudo das associações entre estas alterações e seu impacto no prognóstico do paciente (TRINQUAND *et al.*, 2013; MARTELLI, *et al.*, 2014; JENKINSON, *et al.*, 2016).

Por outro lado, mutações em *NOTCH1* e *FLT3* foram quase mutuamente excludentes ( $p = 0,04$ ) com apenas um paciente possuindo mutação nesses dois genes. Na literatura apenas dois trabalhos avaliaram mutações em *NOTCH1* e *FLT3* em coorte pediátrica (ZHANG *et al.*, 2012; KRASZEWSKA *et al.*, 2013). Zhang *et al.* (2012) não encontraram associação entre *FLT3* e *NOTCH1* e em Kraszewska *et al.* (2013) o tamanho amostral avaliado foi muito pequeno havendo apenas dois casos com mutação no *FLT3* para se ter qualquer conclusão. Entretanto, em pacientes adultos do grupo de estudo alemão *German Acute Lymphoblastic Leukemia Multicenter Study Group* (GMALL) não foram encontradas mutações concomitantes em *NOTCH1* e *FLT3* (NEUMANN *et al.*, 2012).

*Relação imunofenótipo-genótipo*

Na literatura é extremamente escasso a quantidade de estudos que tentam correlacionar o imunofenótipo com genótipo em LLA-T (FERRANDO *et al.*, 2002; ASNAFI *et al.*, 2004; VAN GROTEL *et al.*, 2008; BEN ABDELAI *et al.*, 2013).

Algumas diferenças na frequência das alterações foram observadas em relação aos subtipos pós-reclassificação. O *NOTCH1* esteve presente em todos os subtipos, inclusive em dois casos de LAB-M/T. Mutações em *NOTCH1*, embora raras, já foram descritas em pacientes com LMA e leucemia bifenotípica mielóide-T (FU *et al.*, 2006; PALOMERO *et al.*, 2006b; WOUTERS *et al.*, 2007; YAN *et al.*, 2012). Esses dados sugerem que mutações no *NOTCH1* ocorrem em células progenitoras que podem se diferenciar tanto para linhagem mielóide quanto linfóide. Outras alterações encontradas no subtipo de LAB-M/T foram mutação em *N-KRAS* e *FLT3*, que são consensualmente marcadores de LMA com valor prognóstico (VOGELISTEIN *et al.*, 1990; STAFFAS *et al.*, 2011; RUBNITZ; INABA, 2012), em contrapartida encontradas com menos frequência em LLA-T. Outra alteração encontrada nesse subtipo foi a presença de uma paciente com a alteração *TLX3*, na nossa revisão de literatura encontramos apenas um único relato de caso em uma criança do sexo masculino, assim como nosso caso, que foi diagnosticada com uma leucemia bifenotípica mielóide -T que apresentou esta alteração e deleção no braço curto do cromossomo 9 (OLIVEIRA *et al.*, 2011). A desregulação no *TLX3* é associada a certas características de imaturidade em LLA-T como expressão de CD34, CD13/CD33<sup>+</sup> e dupla negatividade para CD4 e CD8 (ASNAFI *et al.*, 2004).

Estudos mais completos para detectar o perfil genômico em uma coorte significativa de LAB-M/T precisam ser feitos para se entender melhor esta entidade, e ainda se teriam alguma sobreposição com a LLA-ETP, já descritas na literatura com elevada frequência de alterações comumente encontradas em LMA, e o perfil transcricional semelhante ao perfil das células tronco hematopoiéticas normais e precursores de granulócitos e macrófagos (ZHANG *et al.*, 2012).

Em relação aos subtipos LLA-ETP encontramos que mutações no *FLT3* foram significativamente mais frequentes comparado aos demais subtipos de LLA-T. Mutações em *N-KRAS* (11,8%) também se fizeram presentes neste subtipo. Outra observação importante no grupo LLA-ETP foi a elevada frequência de mutações do *NOTCH1*(38,9%) e ausências de mutações em *IL7R*. Estes achados diferem dos dados descritos por Zhang *et al.*, (2012), que encontraram 8% de mutações em *IL7R* e apenas 16% de mutações em *NOTCH1*. E mutações em *FLT3* foram exclusivas das LLA-ETP, estando presente em 14% dos casos.

Entretanto alguns pontos em relação ao estudo de Zhang *et al.*, (2012) devem ser discutidos em comparação aos nossos dados e a outros estudos. Em primeiro lugar, nós já descrevemos mutações em *FLT3* em casos que não tem perfil imunofenotípico de LLA-ETP, como casos duplo positivo para CD4 e CD8 (NORONHA *et al.*, 2016), da mesma forma que Lhermitte *et al.*, (2013). Estes últimos sugerem que mutações em *FLT3* são restritas a perfil imaturo (TCR e cadeia  $\beta$  intracitoplasmática negativas, classificação de ASNAFI (2003a)) ou casos com expressão do TCR $\gamma\delta$ , uma vez que não foi encontrado mutação em *FLT3* em casos da linhagem  $\alpha\beta$ , fato este também observados por nós.

Em relação a frequência do *NOTCH1* ser menor nas LLA-ETP, como descrito por Zhang *et al.* (2012), existe apenas um trabalho além desse último, que faz uma análise mais detalhada de alterações moleculares em crianças com LLA-ETP, incluído mutações do *NOTCH1*, e não encontraram, assim como no nosso estudo, diferença da frequência de mutações do *NOTCH1* em relação aos demais casos que não eram LLA-ETP (ZUURBIER *et al.*, 2014).

Recentemente alguns trabalhos têm buscado o entendimento das mutações do *IL7R* como potencial marcador para o desencadeamento inicial da LLA-T (ZENATTI *et al.*, 2011; YOKOYAMA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012), em especial as LLA-ETPs (TREANOR *et al.*, 2014).

Treanor *et al.* (2014) demonstraram que tímócitos DN1 de murinos foram transduzidos com o *IL7R* mutante homólogo ao de humanos o que levou a um bloqueio no estágio DN2, em que foi observada aumento nos níveis de expressão do fator de transcrição *LMO2* e ainda uma diminuição na expressão do *BCL11b*. Estas células transplantadas em murinos foram capazes de desencadear leucemia aguda com fenótipo semelhante ao de LLA-ETP. *BCL11b* um fator de transcrição que é requerido para que os tímócitos progridam além do estágio DN2 e necessário para o irreversível comprometimento com a linhagem T (LI *et al.*, 2010). Em contraste, Treanor *et al.* (2011) demonstraram que células CD4 CD8 DP derivadas de células tronco hematopoéticas com superexpressão gênica de *LMO2*, tinham níveis significativamente elevados de *BCL11b*. Uma vez que mutações em *IL7R* estão presentes em casos com LLA-ETP e em LLA-T não-ETP o estágio celular em que a superexpressão de *LMO2* e/ou mutações em *IL7R* são adquiridas podem diferenciar o nível maturativo do início da LLA-T (TREANOR *et al.*, 2014).

Yokoyama *et al.* (2013) demonstraram que células progenitoras T DN1 transduzidos com *IL7R* mutante, não foram capazes de induzir LLA-T em murinos, e sim uma desordem mieloproliferativa. Entretanto, as células transduzidas com *IL7R* mutante juntamente com a

forma ativa intracelular do *NOTCH1* (ICN1) levaram ao desenvolvimento de uma agressiva LLA-T com um fenótipo CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TCRβ<sup>+</sup>, neste modelo murino. Nós supomos que nossos dados podem ser comparáveis com estes achados experimentais, em que dos 12 casos com mutação no *IL7R*, 10 tinham fenótipo DP para CD4 e CD8, e destes 9 com mutação no *NOTCH1*. Em especial o subtipo T-II/III apresentou-se com a maior frequência de mutações em *IL7R* e *NOTCH1*, seguido do subtipo T-III/IV.

Portanto supomos que o estágio maturativo em que a leucemia irá se desencadear podem ser dependentes das alterações que cooperam com a mutação do *IL7R* substanciadas pelos experimentos de Yokoyama *et al.* (2012) e Treanor *et al.* (2014).

Outro ponto que observamos em relação a alterações moleculares e os subtipos pós-reclassificação foi em relação a elevada frequência do rearranjo *STIL-TALI* no subtipo T-IV<sup>SP</sup> em que 50% dos casos possuíam esta alteração. Além de maiores frequências de mutações em *NOTCH1* e *FBXW7* neste subtipo do que nos subtipos T-IV<sup>DP</sup> e T-IV<sup>DN</sup>. Outro fato interessante foi a presença de mutações em *N-KRAS* com certa frequência no subtipo T-IV<sup>DN</sup>. Estas diferenças servem para fortalecer a ideia de que esses subtipos pós-reclassificação possam representar entidades com biologia distintas, não devendo ser classificadas como por exemplo como um único subtipo T-IV.

#### *CD127 e correlação com alterações moleculares*

Baseando-se no fato que foi demonstrado que a sinalização do Notch1 pode regular a expressão do IL7Rα (CD127) em timócitos humanos e em LLA-T (GARCIA-PEYDRO *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2009; MAGRI *et al.*, 2009), verificamos se casos com mutações no *NOTCH1* poderiam ter uma expressão diferenciada do IL7R (CD127), na tentativa de identificar um marcador que pudesse ser preditivo de alterações em *NOTCH1*. Testamos assim a expressão do CD127 pela citometria de fluxo e comparamos entre casos mutados e WT. Nós não encontramos uma associação entre expressão celular do CD127 e mutações no *NOTCH1*. No entanto, observamos que a expressão celular do CD127 foi maior em relação aos casos com mutação no *N-KRAS*.

A possível interação entre via do RAS e receptores de citocinas na LLA-T foi demonstrado recentemente. Foi observado que casos de LLA-T pediátricas possuíam uma alta expressão do fator de troca de nucleotídeo, o RasGRP1, que ativa o RAS por promover a troca de GDP por GTP. Entretanto, o aumento da expressão de RasGRP1 resulta apenas em fraca e

basal sinalização de RAS. Quando este aumento de RasGRP1 coopera com a sinalização de receptores de citocinas como IL-7R, há uma maior ativação do RAS. Esta interação entre receptores de citocinas e a via do RAS demonstrou ser exclusiva de células de LLA-T não ocorrendo em tímócitos normais. Foi observado ainda que células com mutação em *KRAS* têm baixa expressão de *RasGRP1*. Desta forma, sugerimos que a mutação *N-KRAS* pode de alguma maneira, influenciar na expressão celular do receptor da interleucina-7, aumentando a sua expressão, como um mecanismo compensatório a baixa expressão de *RasGRP1*, desta maneira aumentando a proliferação e sobrevivência celular e contribuindo para a leucemogênese de células-T (HARTZELL *et al.*, 2013; KSIONDA *et al.*, 2015).

### *Análise de sobrevida*

Uma vez que fatores celulares e moleculares podem predizer o risco em leucemias agudas e com escassez de estudos para LLA-T, um dos nossos objetivos foi identificar quais características biológicas das LLA-T poderiam ser preditoras de prognóstico dos casos identificados no Brasil. Um dos marcos do estudo foi referente ao estágio maturativos dos linfoblastos T. A tentativa de associar o estágio maturativo com o prognóstico nas LLAs-T vem sendo um desafio há décadas (CRIS *et al.*, 1988; PUI *et al.*, 1990; LUDWIG *et al.*, 1993; UCKUN *et al.*, 1997; NIEHUES, *et al.*, 1999; PULLEN *et al.*, 1999; VAN GROTEL *et al.*, 2008; BABUSIKOVA; STEVULOVA; FAJTOVA, 2009; MEIJERINK, 2010; SCHRAPPE *et al.*, 2011).

Inicialmente avaliamos a sobrevida da coorte em relação as variáveis demográficas e clínicas. Não identificamos nenhuma diferença significativa em relação a fatores prognósticos utilizados para estratificação de risco como idade e leucometria. Achados da literatura demonstram que o comprometimento do SNC e o sexo masculino são fatores de mau prognóstico acarretando na menor sobrevida. A observação de que pacientes com LLA-T do sexo masculino tem uma menor sobrevida já foi descrita pelo grupo Suíço *Swiss Pediatric Oncology Group* em pacientes tratados por diferentes protocolos (IMBACH *et al.*, 1995), diferente da revisão do COG que demonstra não haver diferenças de taxas de sobrevida de acordo com o sexo (HUNGER *et al.*, 2012).

Em relação aos subtipos segundo a classificação EGIL também não observamos diferenças significantes. O subtipo T-IV foi que apresentou as menores taxas de sobrevida. Os resultados na literatura são controversos em relação ao estágio maturativo e prognóstico.

Niehues *et al.* (1999) compararam dois grupos, um com fenótipo cortical (CD1a<sup>+</sup> e/ou CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) *versus* todos os outros fenótipos, e observaram que o grupo com fenótipo cortical tinha melhor sobrevida. Uckun *et al.* (1997) estratificaram três subtipos Pró-T (CD7<sup>+</sup>CD2<sup>-</sup>CD5<sup>-</sup>), imaturo (CD7<sup>+</sup> CD2 ou CD5<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>) e maduro (CD7<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>), e observaram que o grupo pró-T era o que tinha menor taxa de sobrevida comparado com o imaturo e maduro, que tiveram taxas muito próximas. Já Van Grote *et al.* (2008) não encontraram diferenças de acordo com os subtipos da classificação EGIL. Entretanto vale ressaltar que o os subtipos pró-T (T-I) e pré-T (T-II) foram avaliados conjuntamente como sendo um mesmo subtipo. Da mesma forma o grupo alemão BFM englobando todos os subtipos imaturos, que inclui as (pró-T, pré-T e LLA-ETP), observou que o subtipo T-cortical (T-III) tinha maior proporção de pacientes que eram bons respondedores a prednisona e com risco padrão para DRM no final da fase de indução, e ainda maior SLE. Por outro lado, maus respondedores a prednisona foram mais frequentes no subtipo T-maduro (T-IV) (SCHRAPPE *et al.*, 2011).

Como exposto, alguns estudos não seguem à risca a classificação EGIL elegendo alguns critérios para estratificação dos grupos, talvez por todos os marcadores necessários para classificação não terem sido testados uniformemente ou em função do tamanho amostral, ou ainda os critérios da classificação EGIL podem não enquadrar a grande parte dos casos.

Nesta coorte avaliamos os subtipos de acordo com o que é preconizado pela classificação EGIL e reclassificamos alguns subgrupos, onde, embora comprometendo às alterações moleculares, marcadores imunofenotípicos e características demográficas e clínicas.

Um ponto a ser discutido é que as LLA-ETP não tiveram menor SLE comparadas aos demais subtipos, contrastando com os achados de Inukai *et al.* (2012), Ma *et al.* (2012); Allen *et al.* (2013), Chopra *et al.* (2013) e semelhante ao descrito por Schrappe *et al.* (2011), Patrick *et al.* (2014) e Zuubier *et al.* (2014). Este último estudo, assim como nesta coorte, também não identificou diferenças na frequência de mutações em *NOTCH1* entre casos com LLA-ETP.

As mutações no *NOTCH1* foram indicativas de melhor sobrevida na nossa coorte. Talvez, isso possa influenciado na sobrevida das LLA-ETP. A identificação de mutações adicionais, que são mais frequentes em LLA-ETP, ainda se faz necessária nesta coorte, como alterações em gene modificadores de histona (*SETD2*, *EP300*) e que codificam componentes do complexo policombo repressor 2 (PRC2) (*EED*, *EZH2* e *SUZ12*) inicialmente descritas por Zhang *et al.* (2012) e que podem influenciar no prognóstico. Além disso não se pode deixar de levar em consideração a possibilidade das diferenças dos protocolos de tratamento entre estes estudos.

Observamos que o subtipo T-II pós-reclassificação foi o que apresentou maior SLE comparado aos demais subtipos. E ainda, é importante ressaltar que o subtipo T-II/III, que seria classificado como uma T-II (pré-T) pela classificação EGIL por não apresentar a expressão do CD1a, apresentou SLE bem distinta (36,9%) do subtipo T-II pós-reclassificação (51,2%), embora sem valor estatisticamente significante quando comparado aos demais subtipos.

O subtipo T-II/III, como demonstrado anteriormente, também foi diferente em relação às alterações moleculares, teve uma maior proporção de mutações em *NOTCH1* e *IL7R*, além de apresentar a maior mediana de leucometria entre os subtipos.

Outro ponto observado em relação às variações das SLE entre os subtipos T-IV, é que os casos T-IV<sup>DP</sup> parece ter uma melhor sobrevida que os subtipos T-IV<sup>DN</sup> e T-IV<sup>SP</sup>. Devido ao tamanho amostral da coorte este resultado necessita ser revalidado. A menor SLE do subtipo T-IV<sup>SP</sup> pode ser explicada pela elevada frequência de alteração *STIL-TAL1* neste subtipo.

Entre as alterações moleculares, encontramos que casos com mutação no *NOTCH1* possuíam uma maior taxa de SLE (45,3%) do que casos WT (37,1%) ( $p = 0,043$ ). Ao compararmos a combinação de *NOTCH1<sup>mut</sup> + FBXW7<sup>mut</sup>*, observa-se que essa combinação leva a maior SLE (49,5%), enquanto casos sem nenhuma dessas alterações têm uma SLE menor (35,4%). Em trabalhos anteriores do nosso grupo não foi observado impacto de prognóstico nos casos *NOTCH1<sup>mut</sup>* sozinho e nem com associação ao *FBXW7*, entretanto foi observado diferença em relação ao tipo de mutação do *NOTCH1*, em que casos com mutações do tipo complexa possuíam uma maior SLE do que os casos com mutação pontual.

Na coorte atual as mutações complexas continuam apresentando SLE maior (48,5%) do que casos com mutação pontual, SLE de 41,5%, entretanto sem diferença estatisticamente significante ( $p = 0,28$ ). Essas diferenças podem ser explicadas talvez, porque na coorte de Mansur *et al.*, (2012) os protocolos clínicos utilizados predominantemente foram GBTLI-93 e BFM-95, ao passo que na coorte atual a predominância de protocolos utilizados foram GBTLI-99 e BFM-02, que intensificaram a utilização de dexametasona e incluíram drogas mais citotóxicas quando comparado aos protocolos anteriores. O que reforça a ideia de que o impacto prognóstico das mutações em *NOTCH1* e *FBXW7* sejam dependentes do protocolo utilizado, como diversos trabalho na literatura vêm mostrando discordância em relação ao papel prognóstico dessas alterações. (KOX *et al.*, 2010; CLAPPIER *et al.*, 2010; ZUURBIER *et al.*, 2010; JENKINSON *et al.*, 2013).

Um ponto interessante deste estudo é a confirmação do estudo anterior em relação ao papel do *STIL-TAL1* no prognóstico de LLA-T (MANSUR *et al.*, 2009; MANSUR *et al.*, 2012).

Portanto *STIL-TALI* pode ser considerada alteração preditiva de prognóstico adverso independente de protocolo terapêutico utilizado até o momento na coorte brasileira. Numa coorte de crianças chinesas foram observadas uma SLE e SG menores para casos com *STIL-TALI<sup>pos</sup>*, em que a maioria dos pacientes *STIL-TALI<sup>pos</sup>* não sobreviviam por 1 mês após a recaída (WANG *et al.*, 2013). Em estudo do grupo AIEOP (*Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediátrica*) em pacientes com *STIL-TALI<sup>pos</sup>* foi observada uma alta frequência de recaída extra medular, associação com alta leucometria ao diagnóstico e maior frequência em adolescentes, entretanto a SLE foi apenas um pouco menor nos casos *STIL-TALI<sup>pos</sup>*, e sem diferença na sobrevida global (D'ANGIO *et al.*, 2015), demonstrando que diferente da coorte chinesa, pacientes com recaída conseguiram ser recuperados. Já no estudo de Van Grotel *et al.* (2008) encontrou uma tendência a melhor SLE de pacientes *STIL-TALI<sup>pos</sup>* resultados semelhantes foram observados por CAVÉ *et al.* (2004).

Certamente a LLA-T por ser heterogênea, a busca de uma única alteração genética, não é suficiente para a identificação de fatores prognósticos. Nós testamos a SLE das associações moleculares identificadas nesse estudo como *N-KRAS<sup>mut</sup> + FBXW7<sup>mut</sup>*, *NOTCH1<sup>mut</sup> + IL7R<sup>mut</sup>*, *IL7R<sup>mut</sup> + TLX3<sup>pos</sup>*. Entretanto, devido ao tamanho amostral restrito, estas combinações de alterações moleculares ainda necessitam mais investigações. A combinação de diversas alterações moleculares, como *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* já foi proposta como estratificação de risco para LLA-T em adultos (TRINQUAND *et al.*, 2013). Porém ao contrário do que foi verificado em adultos, mutações em *PTEN* ou em *RAS* não alteram a sobrevida de pacientes pediátricos com mutações em *NOTCH1<sup>mut</sup> /FBXW7<sup>mut</sup>*, tratados pelo UKAL-2003 (JENKISON *et al.*, 2015).

## 9. Considerações finais e Conclusões

A subdivisão dos subtipos maturativos das LLA-T realizada neste trabalho são evidências da sua heterogeneidade independentemente das características demográficas e clínicas. Vale salientar, que casos com os estágios mais imaturos da classificação EGIL, T-I (pró -T) e T-II (pré-T), podem ser enquadrados como um subtipo distinto, a LLA-ETP. E ainda a LLA-T DP CD4/CD8<sup>pos</sup> (subtipo T-II/III) que se mostrou diferente do ponto de vista clínico em relação a sobrevida e alterações moleculares, sugerindo, que esses casos não devam ser caracterizados como subtipo T-II conforme ocorre na maioria dos estudos. Da mesma forma, as T-IV, em que observou-se haver uma variação em relação a frequência de sexo, *NOTCH1*<sup>mut</sup> e de *STIL-TALI*<sup>pos</sup>, e perfis diferentes de curvas de sobrevida, acreditamos que não podem ser consideradas como um único subtipo, devendo ser melhor classificada em SP, DP ou DN em termos de positividade do CD4 e CD8.

A inclusão no painel de diagnóstico de LLA-T de marcadores expressos na linhagem mielóide como CD117 e CD11b, se mostrou útil no auxílio da identificação das LLA-ETPs. Além disso demonstramos o potencial da expressão celular do CD117 e CD135, avaliada pela CFM, como preditores mutações em *FLT3*, *IL7R* e *TLX3*.

Demonstramos que os subtipos maturativos podem ser indicativos do prognóstico e de presença de alterações moleculares. Entretanto estes resultados devem ser validados em uma coorte independente para confirmações.

## 10. REFERÊNCIAS

ABBAS, A; LICHTMAN, Principais Características de moléculas CD. In: **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, p.253-269.

AIFANTIS, I.; RAETZ, E.; BUONAMICI, S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. **Nat Rev Immunol** , v.8, n.5, p.380-390, 2008.

ALFSEN, G.C. *et al.* T-cell receptor tau delta +/CD3+4-8-T- cell acute lymphoblastic leukemias: a distinct subgroup of leukemias in children. A report of five cases. **Blood**, v.77, n.9, p.2023-2030, 1991.

AL-MULLA, N.A. *et al.* Childhood acute lymphoblastic leukemia in the Middle East and neighboring countries: a prospective multi-institutional international collaborative study (CALLME1) by the Middle East Childhood Cancer Alliance (MECCA). **Pediatr Blood Cancer**, v.61, n.8, p.1403-1410, 2014.

ANDERSSON, A *et al.* Flt3 mutations in a 10 year consecutive series of 177 childhood acute leukemias and their impact on global gene expression patterns genes **Genes chromosomes cancer**, v. 47, p.64-70, 2008.

ALLEN, A. *et al.* Early T-cell precursor leukemia/lymphoma in adults and children. **Leuk Res**, v.37, n. 9, p.1027-1034, 2013.

APLAN, P. D. *et al.* Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. **Science**, v.250, p.1426-1429, 1990.

APLAN, P.D. LOMBARDI, D.P.; KIRSCH, I.R. Structural characterization of SIL, a gene frequently disrupted in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Mol Cell Biol**, v.11, p.5462-5469, 1991.

APLAN, P.D. *et al.* The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. **EMBO J**, v.11:4073–4081, 1992a.

APLAN, P.D *et al.* Involvement of the putative Hematopoietic Transcription Factor *SCL* in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v.79, n.5, p.1327-1333,1992b

ARDAVIN, C. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. **Nature**, v. 362, p.761 – 763, 1993.

ARMSTRONG, S. A. *et al.* FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.103, n.9, p.3544-3546, 2004.

ASNAFI, V. *et al.* Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. **Blood**, n.101, p.2693-703,2003a.

ASNAFI, V. *et al.* CALM-AF10 is a common fusion transcript in T-ALL and is specific to the TCR gamma delta lineage. **Blood**, v.102, n.3, p.1000-1006, 2003b.

ASNAFI, V. *et al.* Age-Related phenotypic and oncogenic differences in T-cell acute lymphoblastic leukemias may reflect thymic atrophy. **Blood**, v.104, p.4173-4180, 2004.

ASTER, J.C.; PEAR, W.S., BLACKLOW S.C. Notch signaling in leukemia. **Annu Rev Pathol.**, v.3, p.587-613, 2008.

ATTARBASCHI, A. *et al.* Prognostic relevance of TLX3 (HOX11L2) expression in childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia treated with Berlin–Frankfurt–Munster (BFM) protocols containing early and late re-intensification elements. **British Journal of Haematology**, v.148, p.293–300, 2009.

BALLERINI, P. *et al.* Impact of genotype on survival of children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the French protocol FRALLE-93: the effect of *TLX3/HOX11L2* gene expression on outcome. **Haematologica**, v.93, n.11, p.1658-1665, 2008.

BABUSÍKOVÁ, O.; TOMOVÁ, A. The analogy in cell immunophenotype and parameters of cell cycle of ectopic thymus, normal thymus, and some acute lymphoblastic leukemia of T-phenotype. **Neoplasma**, v.49, n.5, p.312-318, 2002.

BABUSIKOVA, O.; STEVULOVA, L.; FAJTOVA, M. Immunophenotyping parameters as prognostic factors in T-acute leukemia patients. **Neoplasma**, v.56, n.6, p.508-513, 2009.

BARATA, J. T. *et al.* Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. **Blood**, v.98, n.5, p.524-531, 2001.

BARATA, J.T.;CARDOSO, A.A; BOUSSIOTIS, V,A. Interleukin-7 in T-cell acute lymphoblastic leukemia: an extrinsic factor supporting leukemogenesis? **Leuk Lymphoma**, v.46 n.4, p.483-495, 2005.

BARCENA, A. *et al.* Phenotypic and functional analysis of T-cell precursors in the human fetal liver and thymus: CD7 expression in the early stages of T-and myeloid-cell development. **Blood**,v.82, p.3401–14, 1993.

BELL, J.J; BHANDoola, A.The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. **Nature**, v.452, p.764-767, 2008.

BEN ABDELALI, R. *et al.* SET-NUP214 is a recurrent  $\gamma\delta$  lineage-specific fusion transcript associated with corticosteroid/chemotherapy resistance in adult T-ALL. **Blood**, v.123, n.12, p.1860-1863, 2014.

BÉNÉ, M. C. *et al.* Proposal for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological characterization of leukemia (EGIL). **Leukemia**, v.9, p.1783-1786, 1995.

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

BÉNÉ, M.C.; Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies; European Group for the Immunological Classification of Leukemias. Pro-T ALL: immunophenotypical analyses. **J Biol Regul Homeost Agents**, v.18, n.3-4, p.327-330, 2004.

BENE, M. C. Immunophenotyping of acute leukaemias. **Immunol Lett**, v.98, p.9-21, 2005.

BENE, M. C. *et al.* Acute leukemias of ambiguous lineage. **Semin Diagn Pathol**, v.29, n. 1, p.12-8, 2012.

BERNARD, O. A. *et al.* Two site-specific deletions and t(1;14) traslocation restricted to human T-cell acute leukemias disrupt the 5' part of the tal-1 gene. **Oncogene**, v.8, n.6, p.1477-1488, 1991.

BERNARD, O.A. *et al.* A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v.10, n.15, p.1495-504, 2001.

BHANDOOLA, A.; SAMBANDAM. A. From stem cell to T cell: one route or many?. **Nat Rev Immunol**, v.6, p. 117-126, 2006.

BHATIA, S. *et al.* Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.100, n.6, p.1957-1964, 2002.

BOMKEN, S.N.; VORMOOR, H.J. Childhood leukaemia. **Paediatrics and child health**, v.19, n.8, p. 345-350, 2009.

BOROWITZ, M. *et al.* Acute leukemia of ambíguos origin. In: SWERDLOW, S. *et al.* **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon, France: International Agency for Resarchon Cancer, 2008a. p.150-155.

- BORNHOLDT, J. *et al.* K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. **BMC Cancer**, v.8, n.53, p.1-11, 2008.
- BOROWITZ, M.; CHAN, J.T. lymphoblastic leukemia/lymphoma. In: SWERDLOW, S. *et al.* **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2008. p. 176–178.
- BURKHARDT, B. Paediatric lymphoblastic T-cell leukaemia and lymphoma: one or two diseases? **Br J of Haematol**, v.149, p. 653–668, 2009.
- BREIT, T.M. Site-specific Deletions involving the *tal-1* and *sil* Genes are restricted to cells of the T cell receptor  $\alpha\beta$  lineage: T cell receptors  $\delta$  gene deletions mechanism affect multiples gene. **J Exp Med**, v.177, p.965-977, 1993.
- BREIT, S. *et al.* Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.108, n.4, p. 1151-1157, 2006.
- BROWN, L. *et al.* Site-specific recombination of the tal-1 gene is a common occurrence in human T cell leukemia. **EMBO J**, v.9, n.10, p.3343-3351, 1990.
- CAROW, C. E. *et al.* Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias **Blood**, v.87, n.3, p.1089-1096, 1996.
- CARROL, A. J. *et al.* The t(1;14)(p34;q11) is nonrandom and restricted to T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v.76, n.6, p.1220-1224, 1990.
- CAVÉ, H. *et al.* Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL1 fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. **Blood**, v.103, n.2, p.442-450, 2004.

CLAPPIER, E. *et al.* NOTCH1 and FBXW7 mutations have a favorable impact on early response to treatment, but not on outcome, in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) treated on EORTC trials 58881 and 58951. **Leukemia**, v.24, n.12, p.2023-2031, 2010.

CLEAVER, A.L. *et al.* Gene-based outcome prediction in multiple cohorts of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. **Mol Cancer**, v.9, n.105, p.1476-4598, 2010.

CRAIG, F. E.; FOON, K. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, v.111, p.3941-3967, 2008.

CHEN, Q. *et al.* The *tal* gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. **The EMBO Journal**, v.9, n.2, p.415-424, 1990.

CHIARETTI, S.; FOÀ, R. T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 94, n.2, p.160-163, 2009.

CHOPRA, A. *et al.* Immunophenotypic analysis of T-acute lymphoblastic leukemia. A CD5-based ETP-ALL perspective of non-ETP T-ALL. **Eur J Haematol**, v.92, n.3, p. 211-218, 2013.

CHUNG, E.; KONDO, M. Role of Ras/Raf/MEK/ERK signaling in physiological hematopoiesis and leukemia development. **Immunol Res**, v.49, n.1-3, p.248-268, 2011.

COUSTAN-SMITH, E. *et al.* Early t-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet oncol**, v.10, n.2, p.147-156, 2009.

CRIST, W. *et al.* Current results of studies of immunophenotype-, age- and leukocyte-based therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. The Pediatric Oncology Group. **Leukemia**, v.6, p.162-166, 1992.

DADI, S. *et al.* TLX Homeodomain Oncogenes Mediate T Cell Maturation Arrest in T-ALL via Interaction with ETS1 and Suppression of TCR $\alpha$  Gene Expression. **Cancer Cell**, v. 21, p.563–576, 2012.

D'ANGIÒ, M. *et al.* Clinical features and outcome of SIL/TAL1-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: a 10-year experience of the AIEOP group. **Haematologica**, v.100, n.1, 2015.

DEMAREST, R. M. *et al.* It's T-ALL about Notch. **Oncogene**, v. 27, p. 5082–5091, 2008.

DEAR, T. N. *et al.* The HOX11 gene encodes a DNA-binding nuclear transcription factor belonging to a distinct family of homeobox genes. **Proc. Nat. Acad. Sci**, v.90, p. 4431-4435, 1993.

DE CAMARGO, B. *et al.* Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **Int J Cancer**, v.3, n.126, p.715-720, 2010.

DEFTOS, M.L. *et al.* Notch1 Signaling Promotes the Maturation of CD4 and CD8 SP Thymocytes. **Immunity**, v.13, p.73–84, 2000.

DREXLER, H.G. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. **Leukemia**, v.10, n.4, p.588-99, 1996.

DU, J. *et al.* Loss of CD44 attenuates aberrant GM-CSF signaling in Kras G12D hematopoietic progenitor/precursor cells and prolongs the survival of diseased animals. **Leukemia**, v.27, n.3, p.754-757, 2013.

DURINCK, K. *et al.* Novel biological insights in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Exp Hematol**, v.43, n.8, p.625-639, 2015.

EMERENCIANO, M. *et al.* Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v.49, n.12, p.2291-2297, 2008.

ELLISEN, L. W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. **Cell**, v.66, p.649-61, 1991.

FADDOO, Z. *et al.* Clinical features and induction outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia in a lower/middle income population: A multi-institutional report from Pakistan. **Pediatr Blood Cancer**, v.62, n.10, p.1700-1708, 2015.

FERRANDO, A. A. *et al.* Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Cell**, v.1, n.1, p.75-87, 2002.

FRIEDERIKE, C. *et al.* Ras Activation in Normal White Blood Cells and Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clin Cancer Res**, v.6, p.1804-1810, 2000.

FRY, T. J. *et al.* The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. **J. Immunol**, v.174, p.6571–6576, 2005.

FU, L. *et al.* NOTCH1 mutations are rare in acute myeloid leukemia. **Leuk Lymphoma**. 47: 2400-2403, 2006.

GARCÍA-PEYDRÓ, M.; DE YÉBENES, V.G.; TORIBIO, M.L. Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. **J Immunol**, v.177, n.6, p.3711-3720, 2006.

GILLILAND, D.G. *et al.* The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**, v.100, n.5, p.1532-1542, 2002.

GONZÁLEZ-GARCÍA, S. *et al.* CSL-MAML-dependent Nocht1 signaling a controls T lineage-specific IL7R $\alpha$  gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. **J.Exp.Med**, v.206, n.4, p.779-791, 2009.

GONZÁLEZ-GARCÍA, S; GARCÍA-PEYDRÓ;ALCAIN, J.; TORIBIO, M. Notch1 and IL-7 receptor signalling in Early T-cell development and Leukaemia. **Current Topics in Microbiology and Immunology** , v.360, p.47-73, 2012.

GORDON, W.R. *et al.* Structural basis for autoinhibition of Notch. **Nat Struct Mol Biol**, v.14, p.295-300, 2007.

GRABHER, C.; VON BOEHMER, H.; LOOK, A.T. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 6, p. 347-59, 2006.

GRAUX, C. *et al.* Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. **Leukemia**, v.20, n.9, p.1496-1510, 2006.

GREAVES, M. Analyses of the clinical and biological significance of lymphoid phenotypes in acute leukemia. **Cancer research**, v.41, p.4752-4766, 1981.

GREAVES M. Infection, immune response and the aetiology of childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v.6, n.3, p.193-203, 2006.

GUTIERREZ, A. *et al.* Absence of biallelic TCRgamma deletion predicts early treatment failure in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v.28, n.24, p.3816-3823, 2010.

HARRIS, N.L. *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood**, v.84, p.1361–1392, 1994.

GUY, J. *et al.* Flow cytometry thresholds of myeloperoxidase detection to discriminate between acute lymphoblastic or myeloblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v.161, n.4, p.551-555, 2013.

HALES, E.C.; TAUB, J.W.; MATHERLY, L.H. New insights into Notch1 regulations of the PI3K-AKT-m TOR1 signaling axis: targeted therapy of  $\gamma$ -secretase inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cellular Signaling**, v.26, p.149-161, 2014.

HARTZELL, C. *et al.* Dysregulated RasGRP1 responds to cytokine receptor input in T cell leukemogenesis. **Sci Signal**, v.6, n.268, p.ra21, 2013.

HAYDU, J.E.; FERRANDO, A. A. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Curr Opin Hematol**, v.20, n.4, p.369-373, 2013.

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.1539-1544, 2003.

HOEHN, D. *et al.* CD117 expression is a sensitive but nonspecific predictor of FLT3 mutation in T acute lymphoblastic leukemia and T/myeloid acute leukemia. **Am J Clin Pathol**, v.137, n.2, p.213-219, 2012.

HOLLAND, P.W. *et al.* Classification and nomenclature of all human homeobox genes. **BMC Biol**, v.5, p.47, 2007.

HORNBRUCH, A. *et al.* A BMP-mediated transcriptional cascade involving Cash1 and Tlx-3 specifies first-order relay sensory neurons in the developing hindbrain. **Mech Dev**, v.122, p.900-913, 2005.

HRUSAK, O.; PORWIT-MACDONALD, A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. **Leukemia**, n.16, p. 1233-1258, 2002.

HSU, H.L. *et al.* Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.13, p.5947-5951, 1994.

HUNGER, S.P. *et al.* Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. **J Clin Oncol**, v.30, n.14, p.1663-1669, 2012.

HUNGER, S, P. *et al.* Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, v.60, n.6, p.957-963, 2013.

IMBACH, P. *et al.* Boys but not girls with T-lineage acute lymphocytic leukemia (ALL) are different from children with B-progenitor ALL. Population-based data results of initial

prognostic factors and long-term event-free survival. Swiss Pediatric Oncology Group. **J Pediatr Hematol Oncol**, v.17, n.4, p.346-349, 1995

INUKAI, T. *et al.* Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. **Br J Haematol**, v.156, n.3, p.358-365, 2011.

IWAMOTO, S. *et al.* Flow cytometric analysis of de novo acute lymphoblastic leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. **Int J Hematol**, v.94, n.2, p.185-192, 2011.

JEHA, S.; PUI, C.H. Risk-adapted Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v.23, p.973–990, 2009.

JENKINSON, S. *et al.* Impact of NOTCH1/FBXW7 mutations on outcome in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia patients treated on the MRC UKALL 2003 trial. **Leukemia**, v.27, n.1, p.41-47, 2013.

JENKINSON, S. *et al.* Impact of PTEN abnormalities on outcome in pediatric patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated on the MRC UKALL2003 trial. **Leukemia**, v. 30, n.1, p. 39-47, 2016.

KARAWAJEW, L. *et al.* Inhibition of in vitro spontaneous apoptosis by IL-7 correlates with Bcl-2 up-regulation, cortical/mature immunophenotype, and better early cytoreduction of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.96, n.1, p.297-306, 2000.

KSIONDA, O. *et al.* RasGRP1 overexpression in T-ALL increases basal nucleotide exchange on Ras rendering the Ras/PI3K/Akt pathway responsive to protumorigenic cytokines. **Oncogene**, 2015.

KEERSMAECKER, K.; MARYNEN, P.; COOLS, J. Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v.90, n.8, p.1116-1127, 2005.

KINDLER, T. *et al.* K-RasG12D-induced T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemias harbor Notch1 mutations and are sensitive to gamma-secretase inhibitors. **Blood**, v.112, n.8, p.3373-3382, 2008.

KING, B. The ubiquitin ligase FBXW7 modulates leukemia-initiating cell activity by regulating MYC stability. **Cell**, v.153, n.7, p.1552-66, 2013.

KNIGHT,T; IRVING,J. Ras/Raf/MEK/ERK pathway activation in childhood acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic targeting. **Frontiers in oncology**, v.4, article 160, 2014.

KUROOKA, H. *et al.* Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. **Nucleic Acids Res**, v.26, p.5448–5455, 1998.

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

KRASZEWSKA, M.D. *et al.* BCL11B, FLT3, NOTCH1 and FBXW7 mutation status in T-cell acute lymphoblastic leukemia patients. **Blood Cells Mol Dis**, v.50, n.1, p.33-38, 2013.

LACOMBE, F. *et al.* Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v.11, p.1878-1886, 1997.

LÉCUYER, E. *et al.* The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. **Blood**, v.100, n.7, p.2430-2440, 2002.

LÉCUYER, E.;HOANG T.SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. **Exp Hematol**, v.32, n.1, p.11-24, 2004.

LEVIS, M.; SMALL, D.FLT3: ITDoes matter in leukemia. **Leukemia**, v.17, n.9, p.1738-1752, 2003.

LHERMITTE, L. *et al.* Receptor kinase profiles identify a rationale for multitarget kinase inhibition in immature T-ALL. **Leukemia**, v.27, n.2, p.305-314, 2013.

LIANG, D.C. *et al.* K-Ras mutations and N-Ras mutations in childhood acute leukemias with or without mixed-lineage leukemia gene rearrangements. **Cancer**, n.106 , p. 950 – 956, 2006.

LINABERY, A.M.; ROSS, J.A. Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004). **Am Cancer Society**, v.112, n.2, p.416-32, 2008.

LI, L. LEID, M.; ROTHENBERG, E.V. An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. **Science**, v.329, n.5987, p.89-93, 2010.

LUBMAN, O. Y. *et al.* Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. **Mol Cell**,v.13, p.619–26, 2004.

LUDWIG, W.D. *et al.* Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. **Recent Results Cancer Res**, n.131, p.269-282, 1993.

MA, M. *et al.* Early T-cell precursor leukemia: a subtype of high risk childhood acute lymphoblastic leukemia. **Front Med**, v.6, n.4, p.416-420, 2012.

MACINTYRE, E.A.; SALLOUM, E.; SIGAUX, F. Comparison of alpha beta and gamma delta expressing CD3+ acute lymphoblastic leukemias. **Nouv Rev Fr Hematol**, v.32, n.1, p.95-99, 1990

MACKALL, C.L.;FRY, T.J.; GRESS, R.E. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application.**Nat Rev Immunol**, v.11, n.5, p. 330-342, 2011.

MAGRI, M. *et al.* Notch ligands potentiate IL-7-driven proliferation and survival of human thymocyte precursors. **Eur J Immunol**, v.39, n.5, p.1231-1240, 2009.

MALECKI, M.J. *et al.* Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. **Mol Cell Biol**, v.26, n.12, p.4642-4651, 2006.

MALYUKOVA, A. *et al.* The tumor suppressor gene hCDC4 is frequently mutated in human T-cell acute lymphoblastic leukemia with functional consequences for Notch signaling. **Cancer Res**, v.67, n.12, p.5611-6, 2007.

MARTELLI, A *et al.*, Targeting signaling pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia initiating cells. **Adv Biol Regul**. n.56, p.6-21, 2014.

MATOS, D *et al.*  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T-cell acute lymphoblastic leukemia: comparison of their clinical and immunophenotypic features. **Haematologica**, v.90, n.2, p.264-266.

MATUTES, E. *et al.* Definition of acute biphenotypic leukemia. **Haematologica**, v.82, p. 64–66, 1997.

MATUTES, E. *et al.* Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. **Blood**, v.117, n.11, p.3163-3171, 2011.

MANSUR, M. B. *et al.* *SIL-TAL1* fusion gene negative impact in T cell acute lymphoblastic leukemia outcome. **Leukemia and Lymphoma**, p.1-8, 2009.

MANSUR, M. B. Mutações do gene *NOTCH1* e outras alterações moleculares relacionadas à etiopatogênese das leucemias linfoblásticas agudas de linhagem T (LLA-T).2008. 102f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2008.

MANSUR, M. B. *Status* do Gene *NOTCH1* e sua Interação com o Perfil de Alterações Genômicas das Leucemias Linfoblásticas Agudas-T Pediátricas. 2011. 133 f. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2011.

MANSUR, M.B. *et al.* Impact of complex notch1 mutations on survival in paediatric T-cell leukaemia. **BMC Cancer**, v.12, n.9, p.2407-2412, 2012.

MCCUBREY, J. A. *et al.* Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. **Oncotarget**, v.3, n.9, p. 954-987, 2012.

MEIJERINK, J.P. Genetic rearrangements in relation to immunophenotype and outcome in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, v.23, n.3, p.307-318, 2010.

MEJSTRIKOVA, E. *et al.* Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. **Haematologica**, v.95, n.6, p.928-935, 2010.

NAKAO, M. *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v.10, p.1911–1918, 1996.

NEUMANN, M. *et al.* Clinical and molecular characterization of early T-cell precursor leukemia: a high-risk subgroup in adult T-ALL with a high frequency of FLT3 mutations. **Blood Cancer**, v.2, n.1, p.2011-2049, 2012.

NIEHUES, T. A classification based on T cell selection-related phenotypes identifies a subgroup of childhood T-ALL with favorable outcome in the COALL studies. **Leukemia**, v.13, n.4, p.614-617, 1999.

NORONHA, E.P. *et al.* Immunophenotyping with CD135 and CD117 predicts the FLT3, IL-7R and TLX3 gene mutations in childhood T-cell acute leukemia. **Blood Cells Mol Dis**, v.57, p.74-80, 2016.

OLIVEIRA, Raimundo Antônio; NETO, Adelino Poli. Fisiopatologia e Diagnóstico Laboratorial das neoplasias Hematológicas e doenças correlacionadas. In: \_\_\_\_ **Anemias e**

**Leucemias. Conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais.** São Paulo: Roca, 2004. p. 111.

OLIVEIRA, J.L. *et al.* Successful treatment of a child with T/myeloid acute bilineal leukemia associated with TLX3/BCL11B fusion and 9q deletion. **Pediatr Blood Cancer**, v.56, n.3, p.467-469, 2011.

ONCIU, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 23, p.655–674, 2009.

O'NEIL, J. *et al.* FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. **J Exp Med**, v.204, n.8, p.1813-1824, 2007.

ORFAO, A. Immunophenotyping. In: WULFF, S. *et al.* **Flow Cytometry.Educational Guide**.2.ed. Califórnia:Ed.Dako Carpinteria, 2006, p. 61-62.

OWAIDAH, T.M. *et al.* Cytogenetics, molecular and ultrastructural characteristics of biphenotypic acute leukemia identified by the EGIL scoring system. **Leukemia**, v.20, n.4, p.620-626, 2006.

PAIETTA, E. *et al.* Activating FLT3 mutations in CD117/KIT(+) T-cell acute lymphoblastic leukemias. **Blood**, v.104, n.2, p.558-560, 2004.

PALOMERO, T. *et al.* Transcriptional regulatory networks downstream of TAL1/SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.108, n.3, p.986-992, 2006.

PALOMERO, T. *et al.* Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. **Leukemia**, v.20, n.11, p.1963-1966, 2006b.

PATEL, J.L. *et al.* The immunophenotype of T- Lymphoblastic lymphoma in children and adolescents: a Children´s Oncology Group report. **Br J Haematol**, v.159, n.4, p.454-461, 2012.

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

PIETERS, R.; CARROLL, W.L. Biology and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 24, p.1–18, 2010.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S. *et al.* Biological diversity variations of pediatric acute leukemia in Brazil: contribution of immunophenotypic profiles to epidemiological studies. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.27, n.1, p. 21-26, 2005.

PORCHER, C. *et al.* The T Cell Leukemia Oncoprotein SCL/tal-1 Is Essential for Development of All Hematopoietic Lineages. **Cell**, v.86, p.47–57, 1996.

PORWIT-MACDONALD, A. *et al.* BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). **Leukemia**, v.14, n.5, p.816-825, 2000.

PARCELLS, B.W. *et al.* FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. **Stem Cells**, v.24, n.5, p, 1174-1184, 2006.

PERENTESIS, J.P. *et al.* RAS oncogene mutations and outcome of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v.18, n.4, p.685-692, 2004.

PUEL, A. *et al.* Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. **Nat Genet**, v.20, p.394–397, 1998.

PUI, C.H. *et al.* Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. **Blood**, v.75, n.1, p.198-202, 1990.

PUI, C.H. *et al.* Heterogeneity of presenting features and their relation to treatment outcome in 120 children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.75, n.1, p.174-179, 1990.

PUI, C.H. Acute lymphoblastic leukemia. In: Pui, C.H. editor. **Childhood leukemias**. New York: Cambridge University Press, 2006. p. 439–72.

PUI, C.H.; ROBISON, L.; LOOK, A.T. Acute Lymphoblastic Leukaemia. **The Lancet**, v. 37, p.1030-1043, 2008.

PUI, C.H. *et al.* Pediatric acute lymphoblasti leucemia:where we going and how do we get there?.**Blood**, v.120, p.1165-1174, 2012.

PULLEN, J. *et al.* Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. **Leukemia**, v.13, p.1696–1707,1999.

REGO, E.M. *et al.* Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in Brazilian patients. **Leuk Res**, v.20, n.4, p.349-355, 1996.

RIBEIRO, D.;MELÃO, A.; BARATA, J.T. IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia.**Adv Biol Regul**, v.53, n.2, p. 211-222, 2013.

ROBEY, E. *et al.* An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineage. **Cell**, v.87, p.483-492,1996.

ROCHMAN, Y. *et al.* New insights into the regulation of T cells by  $\gamma$ c family cytokines.**Nat Rev Immunol**, v.9, n.7, p.480, 2009.

ROTHENBERG, E.V.; MOORE, J.E.; YUI, M.A. Launching the T-Lineage Developmental Programme. **Nat Rev Immunol**, v.8, p. 9-21, 2008.

ROTHENBERG, E.V; ZHANG, J.; LI, L. Multilayered specification of the T-cell lineage fate. **Immunol Rev**, n.238, v.1, p. 150-168, 2010.

RUBNITZ, J.E.; INABA, H. Childhood acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**, v.159, n.3, p.259-276, 2012.

SACAMURRA, D.O. *et al.* Acute leukemia presenting with myeloid and lymphoid cell markers. **Ann Clin Lab Sci**, v.13, p.496-502, 1983.

SCHABATH, R; RATEI, R. LUDWIG, W. The prognostic significance of antigen expression. in leukaemia. **Best Practice&Research Clinical Haematology**, v. 16, n.4, p.613-628, 2003.

SAVINO *et al.*, Hormonal control of T-cell development in health and disease **Nat Rev Endocrinol**, v.12, n. 2, p.77-89, 2016.

SAVINO, W. *et al.*, Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. **J Leukoc Biol**.v.75, p. 951–961, 2004.

SCHRAPPE, M. *et al.* Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. **Blood**, v.118, n.8, p.2077-2084, 2011.

SCRIDELI, C. *et al.*, A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. **Haematologica**, v.94, n.6, p. 781-789,2009.

SILVA, A. *et al.* IL-7 contributes to the progression of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. **Cancer Res**, v.71, n.14, p. 4780-4789, 2011.

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, 1996.

SPERLING, C. *et al.* Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias. **Haematologica**, v.82, n.5, p.617-21, 1997.

SPITS, H. *et al.* Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. **Immunol Rev**, v.165, p.75-86, 1998.

SPITS, H. Development of  $\alpha\beta$  T cells in the human thymus. **Nat Rev Immunol**, v.2, p.760-772, 2002.

SHIMAMOTO, T. *et al.* Homeobox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. **Int J Hematol**, v.67, n.4, p.339-350, 1998.

SHOCHAT, C. *et al.* Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- $\alpha$  (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. **J Exp Med**, v. 208, n. 5, p.901-908, 2011.

SHORTMAN, K.; WU, L. Early T Lymphocyte Progenitors. **Annu Rev Immunol**, v.14, p.29-47, 1996.

STAFFAS, A. *et al.* Presence of FLT3-ITD and high BAALC expression are independent prognostic markers in childhood acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 118, n.22, p.5905-5913, 2011.

STARY, J. *et al.*, Intensive Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of the Randomized Intercontinental Trial ALL IC-BFM 2002. **J Clin Oncol**, v.32, n.3, p.174-185, 2014.

STEELMAN, L.S. *et al.* Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. **Leukemia**, v.22, n.4, p.686-707, 2008.

STEELMAN, L.S. *et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. **Leukemia**, v.25, p.1080-1094, 2011.

SZCZEPANSKI, T.; VANDERVELDEN, V.H.J; VANDONGEN, J.J.M. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. **Clin Chem Lab Med**, v.44, n.7, p.775-796, 2006.

SZCZEPÁNSKI, T. *et al.* Late recurrence of Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Frequently represents a Second Leukemia Rather Than a Relapse: First Evidence for Genetic Predisposition. **Journal of Clinical Oncology**, v.29, n.12, p.1643-1649, 2011.

TAGHON, T.; WAEGEMANS, E.; VAN DE WALLE, I. Notch signaling during human T cell development. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.360, p.75-97, 2012.

TAMURA, K. *et al.* Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J  $\kappa$ /Su(H). **Curr. Biol**, v.5, p.1416–1423, 1995.

TAKAHASHI, S. Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. **J Hematol Oncol**, v.4, n.13, p.1-10, 2011.

TERSTAPPEN, L.W.; HUANG, S.; PICKER, L.J. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. **Blood**, v.79, n.3, p.666-677, 1992.

TREANOR, L.M. *et al.* Interleukin-7 receptor mutants initiate early T cell precursor leukemia in murine thymocyte progenitors with multipotent potential. **J Exp Med**, v.211, n.4, p.701-713, 2014.

TREANOR, L.M. *et al.* Functional interactions between Lmo2, the Arf tumor suppressor, and Notch1 in murine T-cell malignancies. **Blood**, v. 117, n.20, p.5453-5462, 2011.

TREMBLAY; CURTIS. The clonal evolution of leukemic stem cells in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Current opinion**, v.21, n.4, p.320-324, 2014.

THOMPSON, B. J. *et al.* The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. **J Exp Med**, v.204, n.8, p.1825-1835, 2007.

TRINQUAND, A. *et al.* Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. **J Clin Oncol**, v.31, n.34, p.4333-4342, 2013.

UCKUN, F.M. *et al.* Clinical features and treatment outcome of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T-lineage leukemic blasts: a Children's Cancer Group study. **J Clin Oncol**, v.15, n.6, p. 2214-2221, 1997.

UCKUN, F.M. *et al.* Biology and Treatment of Childhood T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia, **Blood**, v.91, p.735-746, 1998.

VAN COPPERNOLLE, S. *et al.* Notch induces human T-cell receptor  $\gamma\delta^+$  thymocytes to differentiate along a parallel, highly proliferative and bipotent CD4 CD8 double-positive pathway. **Leukemia**, v.26, n.1, p.127-138, 2012.

VAN DEN ANCKER, W. *et al.* A threshold of 10% for myeloperoxidase by flow cytometry is valid to classify acute leukemia of ambiguous and myeloid origin. **Cytometry B Clin Cytom**, v.84, n.2, p.114-118, 2013.

VAN DER MEULEN, J. *et al.* The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.125, n.1, p.13-21, 2015.

VAN GROTEL, M. *et al.* The outcome of molecular-cytogenetic subgroups in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of patients treated according to DCOG or COALL protocols. **Haematologica**. v.91, n.9, p.1212-1221, 2006.

VAN GROTEL, M. *et al.* Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences. **Leukemia**, v.22, n.1, p.124-131, 2008.

VAN VLIERBERGHE, P. *et al.* Activating FLT3 mutations in CD4+/CD8- pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias. **Blood**, v.106, n.3, p. 4414-4415, 2005.

- VAN VLIERBERGHE, P. *et al.* Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v.143, p. 153-68, 2008.
- VAN VLIERBERGHE, P. *et al.* PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, v.42, n.4, p.338-342, 2010.
- VAN VLIERBERGHE, P; FERRANDO, A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Invest**, v.122, n.10, p.3398-406, 2012.
- VAN VLIERBERGHE, P. *et al.* Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia, **Blood**, v.122, n.1, p.74-82, 2013.
- VISVADER, J. *et al.* Differential expression of the *LYL*, *SCL* and *E2A* helix–loop–helix genes within the hemopoietic system. **Oncogene**, v.6, p.187–194, 1991.
- VOGELSTEIN, B. *et al.* RAS gene mutations in childhood acute myeloid leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **Genes Chromosomes Cancer**, v.2, n.2, p.159-162, 1990.
- VORA, H. H. *et al.* Clinical relevance of FLT3 receptor protein expression in Indian patients with acute leukemia. **Asia Pac J Clin Oncol**, v.6, n.4, p.306-319, 2010.
- YAMAMOTO, Y. *et al.* Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. **Blood**, v.97, p.2434–2439, 2001.
- YAN, L. *et al.* Clinical, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular genetic features in 117 adult patients with mixed-phenotype acute leukemia defined by WHO-2008 classification. **Haematologica**, v.97, n.11, p.1708-1712, 2012
- YOKOYAMA, K. *et al.* In vivo leukemogenic potential of an interleukin 7 receptor  $\alpha$  chain mutant in hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood**, v.122, n.26, p.4259-4263, 2013.
- WADA, H. *et al.* Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. , v.452, p. 768-772, 2008.

WANG, D. *et al.* SIL-TAL1 Rearrangement is related with poor outcome: a study from a Chinese Institution. **Plos one**, v. 8, p. e.73865, 2013.

WENG, A. P. *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. **Science**, v.306, p.269-271, 2004.

WEI, W. *et al.* Prediction of outcomes by early treatment responses in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study in China. **BMC Pediatr**, v.15:80, 2015.

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

WIEMELS, J. L. *et al.* RAS mutation is associated with hyperdiploidy and parental characteristics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v.19, p.415–419, 2005.

WENG, A.P. *et al.* c-Myc is an important direct target of Nocht1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.*20, 2096-2109, 2006.

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

ZAREMBA, C.M. *et al.* Distinct immunophenotype of early T-cell progenitors in T lymphoblastic leukemia/lymphoma may predict FMS-like tyrosine kinase 3 mutations. **Ann Diagn Pathol**, v.16, n.1, p.16-20, 2012.

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

ZENATTI, P.P., *et al.* Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, v.43, p.932-939, 2011.

ZUURBIER, L. *et al.* NOTCH1 and/or FBXW7 mutations predict for initial good prednisone response but not for improved outcome in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia patients treated on DCOG or COALL protocols. **Leukemia**, v.24, n.12, p.2014-2022, 2010.

ZUURBIER, L. *et al.* Immature MEF2C-dysregulated T-cell leukemia patients have an early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia gene signature and typically have non-rearranged T-cell receptors. **Haematologica**, v.99, n.1, p.94-102, 2014.

## 11. ANEXOS

### Anexo.1. Instituições e médicos responsáveis

Instituição	Médicos Responsáveis
CETOHI - CENTRO DE TRATAMENTO ONCO-HEMATOLOGICO INFANTIL DE MATO GROSSO DO SUL	Rosania Maria Basegio, Marcelo S. Souza
HOSPITAL AMARAL CARVALHO-SP	Alejandro Mauricio Aranciba, Claudia Teresa de Oliveira, Maura R.V. Ikoma
HOSPITAL ARAÚJO JORGE-GOIANIA-GO	Patricia Caneiro de Brito, Anna Carolina Silva Dias
HOSPITAL DA CRIANÇA DE BRASÍLIA JOSE ALENCAR - DF	Isis Maria Quezado Magalhães, José Carlos Cordoba
HOSPITAL MARTAGÃO GESTEIRA - BA	Juliana Teixeira Costa, Luciana Nunes Silva Souza, Ana Maria Marinho, Eny Guimarães Carvalho
HOSPITAL NAPOLEÃO LAUREANO-PB	Andrea Gadelha, Eloisa Cartaxo
HOSPITAL SANTA MARCELINA-SP	Renato Melaragno, Alejandro Mauricio Aranciba
HOSPITAL SARINA ROLIN-SP	Gustavo Ribeiro Neves
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ALCIDES CARNEIRO-PB	Renata Silva de Carvalho Gurgel
INSTITUTO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA-PB	Gilson Guedes Filho
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE ITABUNA-BA	Teresa Cristina Cardoso Fonseca

## Anexo 2. Fichas de encaminhamento dos pacientes

### Diagnóstico Imunomolecular

Bem vindo»

SAIR



Exames  
Manual de Acesso  
Envio de amostras  
Amostras /  
Anticoagulantes  
Fale Conosco  
Alterar Senha

Exames - Requisição - Incluir

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\*

[  ]

Idade Faixa etária

Data diagnóstico\*

Sexo\*

Cor\*

Registro Hospitalar

Síndrome Down\*  Sim  Não

Outras Síndromes  Sim  Não  Desconhecido

Logradouro Residência\*  Número Residência\*  Complemento Residência

CEP Residência\*  Bairro Residência\*

Estado Residência\*  Município Residência\*

Região Residência  Quanto tempo?

Estado Naturalidade\*  Município Naturalidade\*

Dados da Instituição/Médico

Instituição\*  UF

Dados Clínicos Dados Diagnósticos

Suspeita Diagnóstica

Diagnóstico

Tratamento Utilizado

Baço*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Fígado*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Linfonodos*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Tumoração*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Sistema Nervoso Central Comprometido*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Alargamento de Mediastino*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Medicamentos sendo usados pelo paciente*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Uso Prévio de Corticóide*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Tem irmã(o) gemelar?*	Sim <input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Tem irmã(o) não gemelar ou primo de 1º grau com câncer?*	<input type="radio"/>	Não <input type="radio"/>
Sim		

Dados Laboratoriais

Leucometria	<input type="text"/>	Hematócrito	<input type="text"/> %
	<input type="text"/>		
	<input type="text"/> %	PlaquetasHemoglibina	<input type="text"/>

Blastos\*

: EDTA Heparina

Outros

Tumor  Congelado  Parafina  Outros

Saliva

Lâminas Medula Óssea  Lâminas Sangue Periférico

Lâminas Histopatológica

<input type="checkbox"/> Motivo da Coleta*	Diagnóstico	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Recaída	<input type="checkbox"/> DRM	<input type="checkbox"/> Pesquisa
		<input type="checkbox"/>

Data da Coleta\*  Projeto  Tumor Solido

Data do Envio da Amostra\*

Observação

\*Itens de preenchimento obrigatório

[ enviar ]

Anexo 3 Ficha de coleta de dados clínicos

**PROJETO: IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES IMUNOFENOTÍPICAS E MOLECULARES DAS LEUCEMIAS DE CÉLULAS - T PEDIÁTRICAS**

**IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:**

Nº do Prontuário: Nome: Nº. Laboratório PHOP:

Local: Data do Diagnóstico: Data de Nascimento:

Hospital : Médico Responsável:

Residência (cidade/ UF):

Naturalidade:

**INFORMAÇÃO SOBRE O TRATAMENTO da LLA**

Protocolo de Tratamento: Data do inicio:

Resposta a Prednisona: Na 1ª semana  
 Sim Não

Leucometria (D8) (< de 1000 blastos ou ≥ 1000 blastos):

DRM [dia 28 ou 33]

**ACOMPANHAMENTO**

Recidiva: Sim Não

Tipo de Recidiva: Isolada Combinada

Local: Local:

MO  MO +SNC

SNC  MO + Testículos

Testículos  MO + Outro local

Outros  SNC + Testículos ou outros

Data da Recidiva: Data Última Consulta:

Tratamento da Recidiva:

Data Óbito: Causa Óbito:

Anexo 4. Quadro com a reatividade e funções dos principais marcadores utilizados na imunofenotipagem dos blastos de LLA-T.

<b>Marcador</b>	<b>Reatividade com células hematopoiéticas normais</b>	<b>Resumo de funções conhecidas ou propostas</b>
CD1a	Timócito cortical, células de Langerhans, subpopulação de células dendríticas	Apresentação de antígeno não-peptídico a alguns linfócitos T
CD2	Todas as células-T, maioria de células NK	Molécula de Adesão (liga-se a CD58); ativação de linfócitos T; lise mediada por CLT e células NK
CD3ε	Células-T imaturas no citoplasma e células-T madura na membrana	Expressão celular e transdução de sinal pelo receptor antigênico dos linfócitos T, associada com CD3δ e CD3γ no complexo TCR
CD4	Linfócitos T restritos ao MHC de classe II, subconjunto de timócitos, monócitos e macrófagos.	Sinalização e co-receptor de adesão na ativação de linfócitos T induzida por antígeno restrita ao MHC II; desenvolvimento dos timócitos, receptor primário para retrovírus HIV.
CD5	Linfócitos T, timócitos, subconjunto de linfócitos B	Molécula de sinalização; liga-se a CD72
CD7	Células tronco hematopoiéticas, timócitos, subconjunto de linfócitos T, células NK, subpopulação de células mielóides imaturas	Sinalização
CD8α	Subpopulação de timócitos corticais, linfócitos T restritos ao MHC de classe I	Sinalização e co-receptor de adesão na ativação de linfócitos T induzida por antígenos restritos ao MHC classe I, desenvolvimento de timócitos.
CD10	Subpopulação de células precursoras B, e alguns linfócitos B maduros; subpopulação de timócitos, granulócitos, subconjunto de	Metaloproteinase
CD11b	Neutrófilos, monócitos, células NK, subconjunto de linfócitos CD8 e células B de memória	Fagocitose de partículas; adesão de neutrófilos e monócitos ao endotélio e proteínas da matriz extracelular.
CD13	Monócitos, granulócitos, células precursoras mielóides	Aminopeptidase envolvida em aparar peptídeos ligados a molécula da classe II e na clivagem da quimiocinas MIP-1

		para alterar especificidade de célula alvo; receptor de corona vírus
--	--	--

<b>Marcador</b>	<b>Reatividade com células hematopoiéticas normais</b>	<b>Funções conhecidas ou propostas</b>
CD15	Granulócitos, monócitos	Adesão de leucócitos a células endoteliais; ligante para CD62E, P (selectinas)
CD16	Neutrófilos, monócitos, macrófagos células NK	Ativação celular, (ex. neutrófilo) induzida por imunocomplexos;
CD22	Linfócitos B, células precursoras B	Regulação da ativação dos linfócitos B, transregulação com CD19
CD33	Monócitos, células progenitoras mielóide, subconjunto de células precursoras T	Liga-se ao ácido siálico; regulação na sinalização de células mielóides
CD34	Células precursoras hematopoiéticas	Adesão célula-célula;
CD56	Células NK, subconjunto de linfócitos T e B	Adesão
CD79a	Células precursoras B (expressão citoplasmática) e em membrana de linfócitos B maduros	Necessária para a transdução na superfície celular e sua transdução pelo complexo do receptor antigênico dos linfócitos B.
CD117(c-Kit)	Células-tronco e progenitoras hematopoiéticas	Receptor de fator de células tronco liga-se ao ligante de c-Kit e medeia seus efeitos biológicos
CD127	Precusores de linfócitos e subconjunto de linfócitos T maduros.	Cadeia $\alpha$ do receptor da IL-7, em associação com CD132, medeia os efeitos biológicos da IL-7, Desenvolvimento de timócitos
CD135	Células precursoras mielóide, B, T	Receptor do fator de crescimento envolvido na hematopoese.
TdT	Células imaturas linfoides, pequena fração de precusores mielóides	Função no rearranjo gênico da Ig e TCR (inserção de nucleotídeos no sítios de junção)
HLA-DR	Células precursoras hematopoiéticas, células-B células-T ativadas, monócitos.	Receptor de superfície MHC de classe II
aMPO	Células mielóides.	Enzima encontrada em grânulos azurófilos de células mielóides, efeitos citotóxicos

Adaptado de Szczepanski;Van der Velden;Van Dongen , 2006 e Abbas ; Lichtman, 2007.

Anexo 5 Quadro com a descrição das mutações do gene *IL7R* e status de outras alterações moleculares.

<b>PATIENT ID</b>	<b><i>IL7R EXON6</i></b>	<b><i>NOTCH1</i></b>	<b><i>FBXW7</i></b>	<b><i>RAS</i></b>	<b><i>FLT3</i></b>	<b><i>STIL-TAL1</i></b>	<b><i>TLX3</i></b>
<b>T-ALL11</b>	c.724_725insGCAAAGACT p.L242insCKD	mutado	mutado	WT	WT	Neg	Pos
<b>T-ALL27</b>	c.729_730delTAinsGTAAATGCCTGACGAGACCCTTC p.L242RinsKCLTRPF c.732_733delCinsGACCTGCCAGATCTCGTCTGCTCCTCAATGTCT	mutado	WT	WT	WT	Neg	Neg
<b>T-ALL38</b>	p.L243SinsRPGPDLVCSMSS	mutado	WT	WT	WT	Neg	Pos
<b>T-ALL46</b>	c.728_729delCTinsGCCCTGTCTTGTC p.L242TdelinsALSCP	mutado	WT	WT	WT	Pos	Neg
<b>T-ALL49</b>	c.722_731delCCTATCTTACinsTGTTGGGGCCTTT p.P240IinsCWG	mutado	mutado	WT	WT	Pos	Neg
<b>T-ALL54</b>	c.725_729delTTACTinsCTTTGTAGGTTTCC p.L242TinsCRFP c.726_731delACTAACinsGGTGCTGTTGCCCAT p.L242LVLL; SNP - rs6897932 c.731C>T	WT	WT	WT	WT	Neg	Pos
<b>T-ALL72</b>	p.T244I	WT	WT	WT	WT	Neg	Neg
<b>T-ALL92</b>	c732_733delACinsTGTCAGTA p.L243IinsCQY	mutado	WT	WT	WT	Neg	Pos
<b>T-ALL128</b>	c.728_730delCTAinsGGTCCTTGC p.L243insGPC	mutado	WT	WT	WT	NA	NA
<b>T-ALL166</b>	c.729_733delTAACCinsCTCAGTGTGG p.L242IinsPQCT	mutado	WT	WT	WT	Neg	Neg
<b>T-ALL181</b>	c.740_741indel p.I247indel	mutado	WT	WT	WT	Neg	Neg
<b>T-ALL187</b>	c.728_729delTAinsGTCTGAGTAGG p.L243RLSR	mutado	WT	WT	WT	Neg	Pos

Anexo 6 Quadro com descrição de mutações do *NOTCH1* e polimorfismos (azul)

Caso	<i>NOTCH1</i> STATUS	Descrição de mutações e polimorfismo(Azul)
T-ALL01	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL02	WT	WT
T-ALL03	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL04	mutado HD	c.4811 T>G p.V1604G ,c.5025C>T p.1675 I/I,rs10521 c.5094C>T p.D1698D
T-ALL05	WT	WT
T-ALL06	WT	WT
T-ALL07	WT	WT
T-ALL08	mutado PEST	c.7311_7313del GCC c.7311_7312insAT p.P2438X
T-ALL09	mutado HD	c.4799 T>C p.L1600P
T-ALL10	WT	WT
T-ALL11	mutado HD&PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D / c.5162 T>A p.V1721E (cosmic),rs 61751486 c.7209G>A p.Q2403Q,c.7413_7414insGTATTCCG p.L2472VFRWSHPX
T-ALL12	WT	WT
T-ALL13	WT	WT
T-ALL14	WT	WT
T-ALL15	WT	WT
T-ALL16	NA	NA
T-ALL17	WT	WT
T-ALL18	WT	WT
T-ALL19	NA	NA
T-ALL20	WT	WT

Caso	NOTCH1 STATUS	Descrição de mutações e polimorfismo(Azul)
T-ALL21	WT	WT
T-ALL22	NA	NA
T-ALL23	WT	WT
T-ALL24	mutado HD	c.4732_4734delGTG p.V1578del (cosmic)/ rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL25	mutado HD	c.4754T>C p.L1585P (cosmic)
T-ALL26	WT	WT
T-ALL27	mutado HD	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D / c.5039 T>A p.I1680N (cosmic) c.4818_4819insGGGGTCAC, c.4818_4819del het CA p.F1606L, p.1606_1607delKinsGSQ/rs10521 c.5094C>T p.D1698D/rs61751489
T-ALL28	mutado HD	c.6853G>A p.V2285I
T-ALL29	mutado HD&PEST	c.4873_4911delGAGCTGCGCAAGCACCCCATCAAGCGTGCCGCCGAGGGC p.1625_1637delELRKHPIKRAAEG / rs772314400 c.4866C>T p.R1622R/c.7479T>G p.P2493P
T-ALL30	NA	NA
T-ALL31	NA	NA
T-ALL32	NA	NA
T-ALL33	WT	WT
T-ALL34	NA	NA
T-ALL35	NA	NA
T-ALL36	WT	WT
T-ALL37	NA	NA
T-ALL38	mutado HD	c.4754T>A p.L1585Q/rs10521 c.5094C>T p.D1698D/rs61751489 c.6853G>A p.V2285I
T-ALL39	WT	WT
T-ALL40	mutado HD	c.4793 G>C p.R1598P/rs751446074 c.4905C>T p.A1635A / rs566680728 c.4927G>A p.A1643T

Caso	NOTCH1 STATUS	Descrição de mutações e polimorfismo(Azul)
T-ALL41	mutado PEST	c.7328_7329indel
T-ALL42	WT	WT
T-ALL43	mutado HD	c.4906_4941delGAGGGCTGGGCCGCACCTGACGCCCTGCTGGGCCAG p.1636_1647delEGWAAPDALLGQ / rs367838230 c.4971C>T p.S1657S/rs188270459 c.7648A>G p.I2550V
T-ALL44	WT	WT
T-ALL45	WT	WT
T-ALL46	mutado HD	c. 4775T>C p.F1592S/c.4939C>T p.Q1647X / c.4976G>A p.G1659D
T-ALL47	NA	NA
T-ALL48	WT	WT
T-ALL49	mutado HD	rs10521 c.5094C>T p.D1698D / c.5033T>C p.L1678P
T-ALL50	NA	NA
T-ALL51	mutado HD	c.5033T>C p.L1678P (cosmic)
T-ALL52	mutado HD	c.4790G>T p.S1597I
T-ALL53	mutado HD	rs10521 c.5094C>T p.D1698D / c.5033T>C p. L1678P (cosmic)
T-ALL54	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL55	NA	NA
T-ALL56	NA	NA
T-ALL57	NA	NA
T-ALL58	WT	rs372830543 c.5015G>A p.R1672H
T-ALL59	mutado HD	c. 4918_4939delGCACCTGACGCCCTGCTGGGCC p.A1640R, p.P1641X / c.4899T>C p.R1633R
T-ALL60	WT	WT

Caso	NOTCH1 STATUS	Descrição de mutações e polimorfismo(Azul)
T-ALL61	WT	WT
T-ALL62	WT	WT
T-ALL63	WT	rs2229968 c.5011,G>A p.V1671I/rs34152221 c.7515T>G p.2505P
T-ALL64	WT	rs61751489 c.6853 G>A p.V2285I
T-ALL65	mutado HD	c.5033T>C p.L1678P (cosmic) / rs10521c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL66	WT	rs142375989 c.4626 C>T p.D1542D / rs187112709 c.4867G>A p.E1623K
T-ALL67	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL68	mutado HD	c.4732_4734delGTG p.V1578del (cosmic)/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL69	NA	NA
T-ALL70	WT	rs11574911 c.7233A>G p.P2411P;INTRON rs.73668310 c.7674G>A
T-ALL71	WT	WT
T-ALL72	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL73	NA	NA
T-ALL74	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL75	NA	NA
T-ALL76	mutado HD	c.4847_4848insGGACCC p.I1616insMDP/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs61751489 c.6853 G>A p.V2285I
T-ALL77	WT	WT
T-ALL78	mutado PEST	rs11574911 c.7233A>G p.P2411P/c.7541_7542delCT p.P2514RVPX (cosmic)
T-ALL79	NA	NA
T-ALL80	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL81	mutado HD	c.4787T>A p.L1596H (cosmic)/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs61751489 c.6853 G>A p.V2285I
T-ALL82	WT	WT
T-ALL83	mutado PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7330C>T p.Q2444X
T-ALL84	NA	NA

Caso	NOTCH1 STATUS	Descrição de mutações e polimorfismo(Azul)
T-ALL85	mutado HD	c.4980_4907delGCGGCGGGCGGAGGGAGCTGGACCCCATG, c.4979_4980 insACGTCCGCAGGTGAGTGAGACACGGCGA p.G1660GRPQVSETRR/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL86	NA	NA
T-ALL87	NA	NA
T-ALL88	NA	NA
T-ALL89	NA	NA
T-ALL90	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL91	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL92	mutado PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7541_7542delCT p.P2514RVPX (cosmic)
T-ALL93	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs11574911 c.7233A>G p.P2411P/rs11574911 c.7233A>G p.P2411P/INTRON rs.73668310 c.7674G>A rs187112709 c.4867G>A p.E1623K/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.4960 C>T p.P1654S / c.4981 C>T p.R1661W/rs61751486 c.7209G>A
T-ALL94	mutado HD	p.Q2403Q
T-ALL95	NA	NA
T-ALL96	WT	WT
T-ALL97	mutado HD	c.4778 T>C p.L1593P (cosmic)/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL98	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs147041036 c.7083 G>A p.Q2361Q
T-ALL99	mutado PEST	c.7541_7542insC p.P2514PX
T-ALL100	WT	rs2229968 c.5011G>A p.V1671I/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/ rs34152221 c.7515T>G p.P2505P
T-ALL101	NA	NA
T-ALL102	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs760480706 c.7236A>C p.P2412P/INTRON rs.73668310 c.7674G>A
T-ALL103	NA	NA
T-ALL104	mutado PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7541_7545delCTGAG, c.7540_7541insAGAA p.P2514RIPX
T-ALL105	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL106	mutado HD&PEST	c.4754T>C p.L1585P (cosmic);c.7401_7402indel/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL107	WT	WT
T-ALL108	WT	WT
T-ALL109	mutado HD&PEST	c.4754T>C p.L1585P (cosmic)

Caso	NOTCH1 STATUS	Descrição de mutações e polimorfismo (Azul)
T-ALL110	WT	WT
T-ALL111	NA	NA
T-ALL112	mutado HD	c.4721T>C p.L1574P (cosmic) / rs187112709 c.4867G>A p.E1623K/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL113	WT	WT
T-ALL114	WT	WT
T-ALL115	mutado HD	c.4775 T>C p. F1592S (cosmic)
T-ALL116	mutado PEST	c.7192 C>T p.Q2398X (cosmic)/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL117	mutado HD&PEST	c.4972G>A p.E1658K/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7203_7204insGGGCTGAAAGAGGTC p.I2402GLKEV
T-ALL118	mutado HD	c.4775 T>C p. F1592S (cosmic)/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs11574911 c.7233A>G p.P2411P
T-ALL119	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL120	mutado PEST	c.7327delG, c.7326_7327insACCGCATCCTAGGTTGTGATCCC p.V2443insTASX
T-ALL121	mutado HD	c.4967 G>A p.G1656D;rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL122	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL123	WT	WT
T-ALL124	NA	NA
T-ALL125	mutado PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7501C>T p.Q2501X (cosmic)
T-ALL126	WT	WT
T-ALL127	mutado HD&PEST	c.5033T>C p.L1678P (cosmic)/c.7005_7021delGAGCACACAGGCCCCCT p.L2335LPAAWHGRPAAQX
T-ALL128	Mutado HD	c.4814_4815insTCCGGT p.V1605insPVFK
T-ALL129	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL130	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL131	NA	NA
T-ALL132	NA	NA
T-ALL133	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D;rs756653663 c.6924C>T p.C2308C
T-ALL134	WT	WT
T-ALL135	mutated PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D;c.7320_7321insTCCAG p.A2441SRQTCSHWAPAAWRCTLCPRRAPPCCRCHPRWSHPX

Caso	NOTCH1 STATUS	Descrição de mutações e polimorfismo (Azul)
T-ALL136	NA	NA
T-ALL137	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL138	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL139	mutado HD&PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.4915_4975delGCCGCACCTGACGCCCTGCTGGGCCAGGTGAAGGCCTCGCTGCTCCCTGGTGGCAGCGAGGC p.A1639QAWAAA/c.7430_7431insGAAGCCCTAGTTGGGAC p.T2477TKPX
T-ALL140	mutado HD&PEST	c.4734_4735insGTG p.L1579V/c.7526_7527insT p.F2509FPHPVPX
T-ALL141	WT	WT
T-ALL142	mutado PEST	c.7280delG, c.7244_7246delCAC p.2415delP, p.G2427X
T-ALL143	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/ rs760480706 c.7236A>C p.P2412P
T-ALL144	mutado HD	c.4969 A>T p.S1657C /rs10521 c.5094 C>T p.D1698D / c.5033 T>C p. L1678P (cosmic)
T-ALL145	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL146	WT	rs375018022 c.4898 G>A p.R1633H/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs202065858 c.6980G>A p.R2327Q
T-ALL147	WT	WT
T-ALL148	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL149	mutado PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7184A>G p.Q2395R / rs11574911 c.7233A>G p.P2411P
T-ALL150	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL151	mutado HD&PEST	c.4769_4770insGGAGGAGGA p.F1590insLEED/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7458_7464delGCAGCAC, c.7457_7458insAGGCGTCTAGCCGCAT p.S2486SGVX
T-ALL152	mutado PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs11574911 c.7233A>G / c.7225C>T p.Q2409X (cosmic)/
T-ALL153	NA	NA
T-ALL154	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL155	mutado HD	c.4721T>C p.L1574Q (cosmic) / rs187112709 c.4867G>A p.E1623K
T-ALL156	WT	WT
T-ALL157	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL158	mutado HD	c.4775_4776insAGGAAT p.F1592insLGI
T-ALL159	WT	WT
T-ALL160	WT	WT

Caso	NOTCH1 STATUS	Descrição de mutações e polimorfismo (Azul)
T-ALL161	WT	WT rs113634293 c.4827C>T; p.D1609D/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs11574911 c.7233A>G p.P2411P / rs111309246 c.6991G>A
T-ALL162	WT	p.A2331T
T-ALL163	WT	c.4799T>C p.L1600P
T-ALL164	WT	rs187112709 c.4867G>A p.E1623K/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs61751489 c.6853 G>A p.V2285I
T-ALL165	WT	WT
T-ALL166	mutado HD	c.4732_4734delGTG p.V1578del (cosmic)/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL167	WT	WT
T-ALL168	WT	rs76371972 c.4823G>A p.R1608H/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL169	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL170	mutado HD	c.5033T>C p.L1678P (cosmic)
T-ALL171	mutado HD	c.4749_4750insGGTGTAAATGAG p.Q1584insGVNE/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL172	mutado HD	c.47574T>C p.L1585P (Cosmic) / rs187112709 c.4867G>A p.E1623K/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL173	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL174	mutado	
T-ALL174	HD&PEST	c.4754T>C; p.L1585P (cosmic)/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7430_7431insAAGAAGAAAAA p.T2477TRRKTQPSSX
T-ALL175	mutado PEST	rs2229968 c.5014G>A p.V1671I/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7293delG p.R2431RASX/rs34152221 c.7515T>G p.P2505P
T-ALL176	mutado PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7529_7535delTCACCCC p.LTPS2510del
T-ALL177	WT	WT
T-ALL178	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs11574911 c.7233A>G p.P2411P / rs111309246 G>A p.A2331T/rs11574911 c.7233A>G p.P2411P/
T-ALL179	mutado HD	c.4732_4734delGTG p.V1578del (cosmic)
T-ALL180	NA	NA
T-ALL181	mutado HD	c.4793G >C (cosmic) p.R1598P / rs187112709 c.4867G>A p.E1623K/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL182	mutado	
T-ALL182	HD&PEST	c.5033T>C p.L1678P(cosmic) / rs10521c.5094 C>T p.D1698D/c.7375C>T p.Q2459X (cosmic)
T-ALL183	WT	WT
T-ALL184	WT	rs76371972 c.4823G>A p.R1608H/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D

Caso	NOTCH1 STATUS	Descrição de mutações e polimorfismo (Azul)
T-ALL186	mutado PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D;c.7501C>T p.Q2501X (cosmic)
T-ALL187	mutado HD	c.4775T>C p. F1592S (cosmic), rs187112709 c.4867G>A; p.E1623K
T-ALL188	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL189	WT	WT
T-ALL190	mutado PEST	c.7401_7405delGCTGC, c.7400_7401insTGGGAGGGATGGGGGAGGCTGA p.S2467SGRDGGGX
T-ALL191	mutado PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7277_7295delGCGGCCACCTGGGCCGGAG c.7277_7278insCCTGGGACGTGA p.S2426TWDVTSX
T-ALL192	mutado HD	c.4775_4776insGGTAAAGC p.F1592insLGKA
T-ALL193	mutado HD	c.4733T> A p.V1578E (cosmic)
T-ALL194	WT	rs61751539 c.4887 C>T p.H1629H/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D
T-ALL195	mutado HD	c.4818delC, c.4817_4818insGGAA p.F1606insLEK
T-ALL196	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs61751489 c.6853 G>A p.V2285I
T-ALL197	Mutado HD&PEST	c.4817_4818insTTT p.F1606insFF/c.7210 C>T, p. Q2404X/3'UTR rs.73668310 c.7674G>A rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs1157491 c.7233G>A p.P2411P / rs111309246 c.6991G>A p.A2331T / rs61751488 c.6870 C>T p.S2290S/rs11574911 c.7233A>G p.P2411P
T-ALL198	WT	
T-ALL199	mutado PEST	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/c.7314_7315insGCCGGAGCTTCCTGAGTGGAGAGGCCG p S2439AGASX/3'UTR rs.73668310 c.7674G>A
T-ALL200	WT	rs11574911 c.7233A>G p.P2411P
T-ALL201	WT	WT
T-ALL202	WT	rs10521 c.5094 C>T p.D1698D rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/rs11574911 c.7233A>G p.P2411P/rs111309246 G>A p.A2331T/rs11574911 c.7233A>G p.P2411P/3'UTR rs.73668310 c.7674G>A
T-ALL203	WT	
T-ALL204	mutado HD&PEST	c.4799T>C p. L1600P (cosmic)/c.7327_7330delGTGC, c.7326_7327insTAGCTGTGA p.V2443X/rs10521 c.5094 C>T p.D1698D/ rs11574911 c.7233A>G p.P2411P / rs111309246 G>A p.A2331T / 3'UTR rs.73668310 c.7674G>A

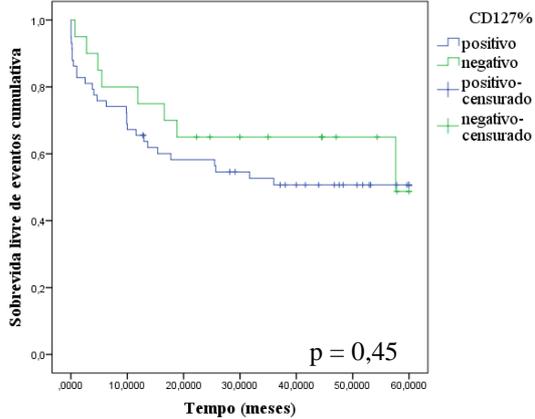
ANEXO 7 Tabela Análise de sobrevida livre de eventos de acordo com os marcadores imunofenotípicos.

<b>Subtipo</b>	<b>NE/NT</b>	<b>Casos positivos SLE% (IC95%)</b>	<b>NE/NT</b>	<b>Casos negativos SLE% (IC95%)</b>	<b>p-valor</b>
CD117	8/17	39,7 (28,2-51,3)	38/87	37,7 (32,2-43,1)	1,0
CD135	3/7	42,7 (23,2-62,3)	33/71	36,4 (30,4-42,5)	0,78
CD127	28/58	35,1 (28,2-41,9)	8/20	42,1 (31,5-52,7)	0,45
HLA-DR	10/21	41,7(32,2-51,2)	45/115	39,5(34,6-44,5)	1,0
CD34	20/52	41,5(35-48,1)	42/103	40,2(35,3-45,1)	0,85
TdT	49/118	39,5 (34,9-44,2)	11/35	45,3 (38,1-52,6)	0,21
CD1a	23/65	41,4 (35,2-47,6)	41/96	40,1 (35,2-45,1)	0,60
CD2	47/119	40,3 (35,7-44,8)	18/38	38,4(30,6-46,2)	0,53
CD5	55/143	40,8 (36,7-44,9)	10/16	33,7 (20,3-47,2)	0,092
mCD3	38/80	36,9 (31,3-42,6)	29/86	43,5 (38,4-48,5)	0,075
CD4	36/93	39,9 (34,6-45,1)	28/64	40,3 (34,4-46,3)	0,71
CD8	48/119	39,7 (35,1-44,4)	18/45	41,7 (34,5-48,6)	0,82
TCR $\alpha\beta$	10/19	33,2 (21,3-45,1)	50/130	41,6(37,4-45,9)	0,20
TCR $\gamma$ $\delta$	6/14	38,9(25,7-52,1)	54/135	40,7(36,5-44,9)	0,72
CD10	22/59	41,3 (35,0-47,6)	39/96	40,7 (35,7-45,7)	0,68
CD11b	10/31	36,7 (26,1-47,4)	37/83	38,1 (32,4-43,8)	0,88
CD13ouCD33	22/44	36,5 (29,2-43,8)	39/102	40,8 (35,9-45,9)	0,30
CD16	2/4	32,5 (5,4-59,7)	35/84	40,1 (34,7-45,6)	0,72
CD56	5/15	46,2 (36,1-56,3)	35/78	38,0 (32,2-43,9)	0,32

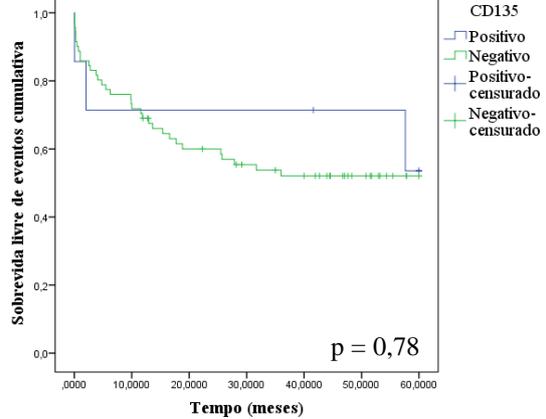
SLE%: Sobrevida livre de eventos, IC95%: Intervalo de confiança de 95%. P -valor calculado pelo teste de *log-rank*. NE: número de eventos; NT: número total de casos

ANEXO 8 Figuras das curvas de sobrevida livre de eventos de acordo com os marcadores imunofenotípicos.

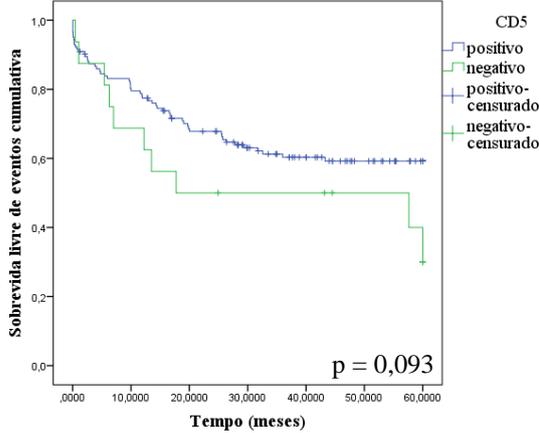
a) SLE de acordo com status do CD127



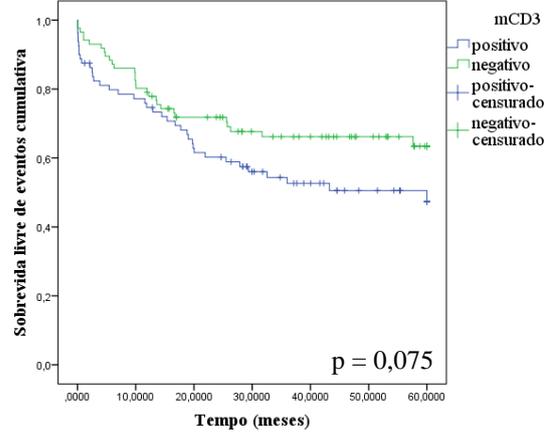
b) SLE de acordo com status do CD135



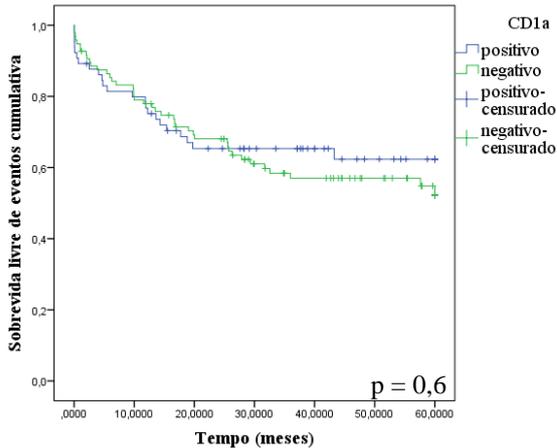
c) SLE de acordo com status do CD5



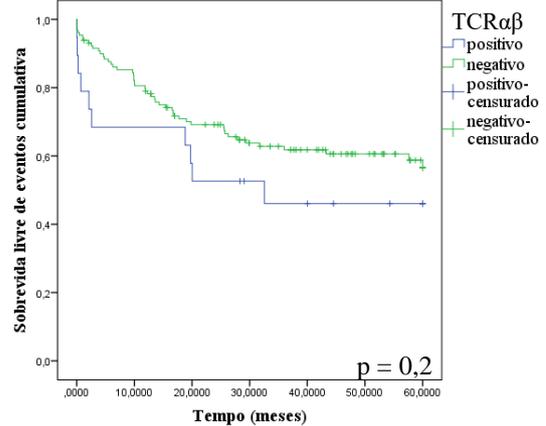
d) SLE de acordo com status do mCD3



e) SLE de acordo com status do CD1a



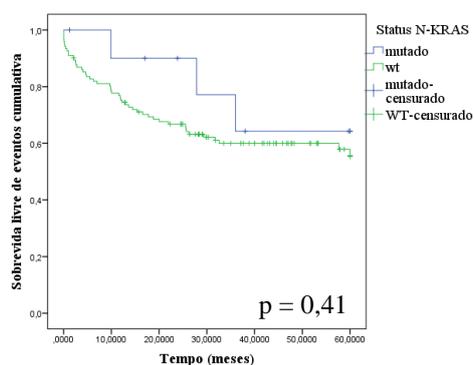
f) SLE de acordo com status do TCRαβ



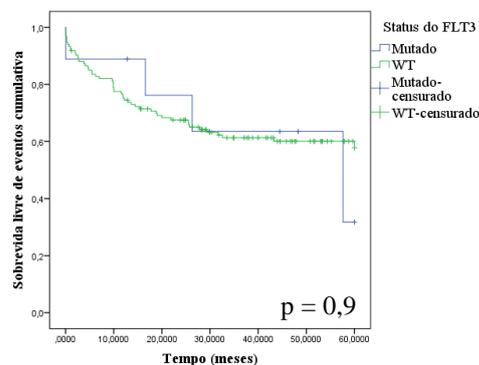
Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da sobrevida livre de eventos (SLE) de acordo com o status do CD127, CD135, CD5, CD3 de membrana (mCD3), CD1a e TCR αβ. p-valor calculado pelo teste de *log-rank*.

ANEXO 9 Figuras das curvas de sobrevida livre de eventos de acordo com as alterações moleculares.

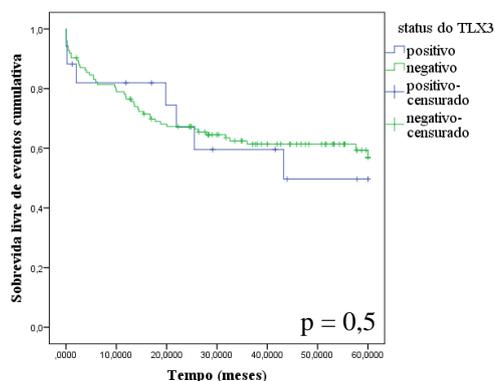
SLE de acordo com status do *N-KRAS*



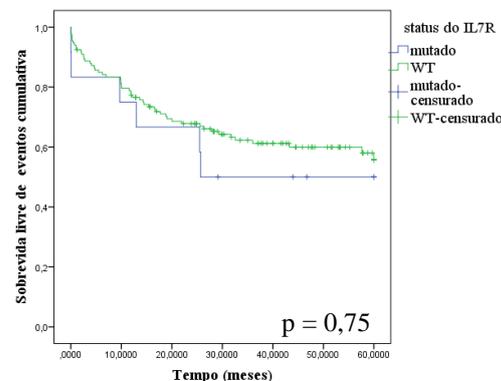
SLE de acordo com status do *FLT3*



SLE de acordo com status do *TLX3*

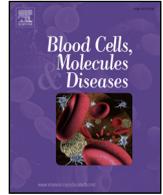


SLE de acordo com status do *IL7R*



Alteração	NE/NT	Mutado	NE/NT	WT	<i>p</i> valor
		SLE% (IC95%)		SLE% (IC95%)	
<i>N-KRAS</i>	3/11	47,8 (36,2-59,4)	49/122	40,4 (36,2-45,2)	0,41
<i>FLT3</i>	4/9	44,5 (30,7-58,3)	52/134	40,8 (36,8-45,1)	0,9
<i>IL7R</i>	6/12	36,2 (21,0-50,3)	52/133	41,2 (36,9-45,4)	0,50
<i>TLX3</i>	7/17	39,2 (27,4-51,1)	48/124	41,0 (36,5-45,4)	0,75

Curvas de Kaplan Meier mostrando diferenças da sobrevida livre de eventos (SLE) de acordo com o status do *N-KRAS*, *FLT3*, *IL7R* e *TLX3*. SLE%: Sobrevida livre de eventos, IC95%: Intervalo de confiança de 95%. NE: número de eventos; NT: número total de casos, P-valor calculado pelo teste de *log-rank*.



## Immunophenotyping with CD135 and CD117 predicts the *FLT3*, *IL-7R* and *TLX3* gene mutations in childhood T-cell acute leukemia



Elda Pereira Noronha, Francianne Gomes Andrade, Carolina Zampier, Camilla F.C.G. de Andrade, Eugênia Terra-Granado, Maria S. Pombo-de-Oliveira <sup>\*,1</sup>, Brazilian Study Group for Childhood Leukaemia

BSGCL: Renato Melaragno <sup>1</sup>, Alejandro Mauricio Aranciba <sup>a</sup>, Claudia Teresa de Oliveira <sup>b</sup>, Maura R.V. Ikoma <sup>b</sup>, Andrea Gadelha Nóbrega <sup>c</sup>, Eloisa Cartaxo C. Fialho <sup>c</sup>, Gustavo Ribeiro Neves <sup>d</sup>, Isis Maria Quezado Magalhães <sup>e</sup>, José Carlos Cordoba <sup>e</sup>, Patricia Caneiro de Brito <sup>f</sup>, Anna Carolina Silva Dias <sup>f</sup>, Juliana Teixeira Costa <sup>g</sup>, Luciana Nunes Silva Souza <sup>g</sup>, Marcelo Santos <sup>h</sup>, Rosania Maria Basegio <sup>h</sup>

<sup>a</sup> Hospital Santa Marcelina, São Paulo, SP

<sup>b</sup> Hospital Amaral Carvalho-SP

<sup>c</sup> Hospital Napoleão Laureano-PB

<sup>d</sup> Hospital Sarina Rolin Caracante, Sorocaba-SP

<sup>e</sup> Hospital da Criança de Brasília Jose Alencar- Brasília, DF

<sup>f</sup> Hospital Araújo Jorge-Goiania, GO

<sup>g</sup> Hospital Martagão Gesteira- BA

<sup>h</sup> Centro de Tratamento Onco-hematológico Infantil de Mato Grosso do Sul:

Paediatric Haematology–Oncology Program, Research Centre, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Submitted 10 September 2015

Accepted 2 December 2015

Available online 2 December 2015

#### Keywords:

T-cell acute lymphoblastic leukemia

*FLT3* mutations

CD117

CD135, *IL7R*, *TLX3*

### ABSTRACT

With the combination of immunophenotyping and molecular tests, it is still a challenge to identify the characteristics of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) associated with distinct outcomes. This study tests the possible correlation of cellular expression of CD135 and CD117 with somatic gene mutations in T-ALL. One hundred sixty-two samples were tested, including 143 at diagnosis, 15 from T-lymphoblastic lymphoma at relapse, and four relapse samples from sequential follow-up of T-ALL. CD135 and CD117 monoclonal antibodies were included in the T-ALL panel of flow cytometry. The percentage of cells positivity and the median fluorescence intensity were correlated with gene mutational status. *STIL-TAL1*, *TLX3*, *FLT3* and *IL7R* mutations were tested using standard techniques.

*STIL-TAL1* was found in 24.8%, *TLX3* in 12%, *IL7R* in 10% and *FLT3-ITD* in 5% of cases. *FLT3* and *IL7R* mutations were mutually exclusive, as were *FLT3-ITD* and *STIL-TAL1*. Associations of CD135<sup>high</sup> ( $p < 0.01$ ), CD117<sup>intermediate/high</sup> ( $p = 0.02$ ) and *FLT3-ITD*, CD117<sup>low</sup> with *IL7R*<sup>mutated</sup> ( $p < 0.01$ ) and CD135<sup>high</sup> with *TLX3*<sup>pos</sup> were observed.

We conclude that the addition of CD135 and CD117 to the diagnosis can predict molecular aberrations in T-ALL settings, mainly segregating patients with *FLT3-ITD*, who would benefit from treatment with inhibitors of tyrosine.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Abbreviations:** ALL, acute lymphoblastic leukemia; APC, allophycocyanin; AML, Acute myeloid leukemia; Bcp-ALL, B-cell precursor ALL; BM, bone marrow; BFM, Berlin–Frankfurt–Munster; cy, cytoplasmatic; DS, diagnosis sample; EGIL, European group for the immunological characterization of leukemia; FITC, fluorescein isothiocyanate; GBTLI-ALL, Brazilian Group for Treatment of Childhood Leukemia; ITD, internal tandem duplication; MFI, median fluorescence intensity; M-FCM, multiparametric flow cytometry; MoAb, monoclonal antibody; mut, mutated; Neg, negative; PB, peripheral blood; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin-chlorophyll protein; Pos, positive; RS, relapse sample; SSC, side scatter; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; T-LL, T-lymphoblastic lymphoma; T-LL RSL, relapse in bone marrow of T-LL diagnosis; TCR, T-cell receptor; TKD, tyrosine kinase domain; WBC, white blood cell count; WT, wild Type.

\* Corresponding author at: Paediatric Haematology–Oncology Program, Research Centre, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti, 37, 20231-050, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail address: [mpombo@inca.gov.br](mailto:mpombo@inca.gov.br) (M.S. Pombo-de-Oliveira).

<sup>1</sup> Brazilian Study Group for Childhood Leukemia (BSGCL) members described in the acknowledgments section.

## 1. Introduction

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) in childhood is an aggressive malignancy characterized by high white blood cell count (WBC), mediastinal tumor and a high rate of relapses in the central nervous system, bone marrow (BM) or testicle infiltration [1]. T-ALL accounts for approximately 15% of all childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), and in contrast to B-cell ALL, the prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL has not been yet elucidated [2]. Therefore, exploring the immunophenotype and molecular connections to define some T-ALL settings is one of the potential issues for clinical translation. T-ALL can be classified according to specific subgroups that are associated with the expression of specific immunophenotypic markers, reflecting maturational arrest at distinct T-cell developmental stages [2].

FMS-like kinase-3 (FLT3/CD135) and stem cell factor receptor c-Kit/CD117) are members of the class III receptor tyrosine kinase family and share the common structure of five extracellular immunoglobulin-like domains, a single transmembrane segment, a juxtamembrane domain and a split cytoplasmic domain [3]. They mutually contribute to the normal differentiation and proliferation of primitive hematopoietic cells. FLT3 and CD117 are expressed at high levels in early cell populations with lymphoid and myeloid differentiation potential [4].

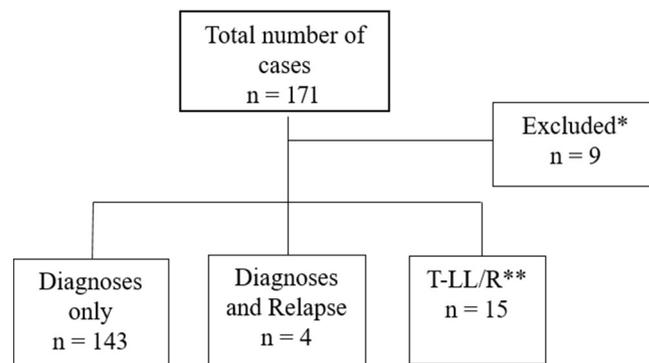
Mutations in *FLT3* such as internal tandem duplication (ITDs) in the juxtamembrane domain or in the tyrosine kinase domain (TKD) result in constitutive activation of the FLT3 receptor in the absence of a ligand [4]. Both genetic abnormalities are well defined in acute myeloid leukemia (AML) and confer a poor clinical prognosis [5]. At the same time, these mutations are rarely found in childhood ALL [6–8], and the prognosis of *FLT3*-mutated patients has not yet been tested due to the low frequency of this mutation in this disease. Recently, some authors have demonstrated that immature T-ALL might benefit from receptor-kinase inhibition drug therapeutic strategies depending on the *FLT3* status [9], as in patients with B-cell precursor ALL (Bcp-ALL) with a Ph-like genome profile [10].

Because very few data are available regarding the *FLT3* mutational status and correlation with immunophenotyping in an exclusive pediatric T-ALL cohort, the present study aimed to establish the distribution frequencies of *FLT3* mutations and to test the association between *FLT3* status and CD135 and CD117 identified by flow cytometry in pediatric T-ALL.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

One hundred seventy-one unselected samples from T-cell leukemia patients (aged less than 19 years old) were included for immunophenotyping and molecular tests (shown in Fig. 1). Bone marrow (BM) aspirates and/or peripheral blood (PB) samples were sent to the Pediatric Hematology–Oncology Program, Research Centre, Instituto Nacional de Cancer, Rio de Janeiro, Brazil, for cellular and molecular diagnostic tests before treatment decisions were made. The referring physicians provided demographic and clinical information regarding age strata, gender, mediastinal mass, nervous system involvement, and white blood cell (WBC) count. A total of 166 samples were collected from 147 patients at diagnosis prior to any oncological treatment ( $n = 143$ , only once); 15 samples were obtained from T-ALL as first relapse in BM of T-lymphoblastic lymphoma diagnosis (T-LL RSL, only once), and sequential samples were collected from T-ALL patients collected at diagnosis (DS) and at first relapse in BM (RS), as shown in Fig. 1. Patients were not enrolled in clinical trials but were receiving treatments according to the Brazilian Group for Treatment of Childhood Leukemia (GBTLI-ALL 93 and 99,  $n = 92$ ) or were treated according to



**Fig. 1.** The characterization of the T-ALL cases and samples included in the study. \*There were 9 out of 171 (5.2%) cases excluded due to lack of material for all analysis, low percentage of blast cells or acute leukemia with mixed phenotype; 8 samples are sequential from the diagnosis ( $n = 4$ ) and first relapse ( $n = 4$ ); \*\*15 cases were T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LL) at first relapse in bone marrow/peripheral blood as T-ALL.

the Berlin–Frankfurt–Munster ALL (BFM;  $n = 66$ ) protocols backbone strategies [11,12].

### 2.2. T-ALL diagnosis by flow cytometry

Immunophenotyping was performed by multiparametric flow cytometry (M-FCM). In the first step, cytoplasmic (cy) antigens were tested with a-MPO, CD13, IgM, CD79a, TdT, CD3, and CD22. Positive cyCD3 and negative aMPO, CD22 and CD79a defined the T-cell leukemia; then, a panel of T-cell-associated membrane antigen monoclonal antibodies were applied for cell differentiation level and anomalous expression in T-ALL, including cyCD3/CD7, CD2, CD5, CD1a, CD4, CD8, mCD3, TCR  $\alpha\beta$ , TCR  $\gamma\delta$ , HLA-DR, CD34, CD10, CD13, CD33, CD11b, CD15, CD16, CD56, and TdT in four or six colors. FLT3 receptor (CD135) (4G8) and c-KIT ligand (CD117) (104D2) conjugated to phycoerythrin (PE) were analyzed using triple or quadruple staining with fluorescein isothiocyanate (FITC), pyridine-chlorophyll protein (PerCP) and allophycocyanin (APC) in combination with anti-CD34, anti-CD7, anti-CD2, anti-CD5 and anti-CD45 monoclonal antibodies.

FACS Calibur and Canto Flow cytometers (Becton, Dickinson and Company, CA, USA) were used for the acquisition (approximately 20,000 events) in the case of blasts cells (CD45<sup>low/intermediate</sup>). The normalization of median fluorescence intensity (MFI) of CD117 and CD135 was defined as a ratio (MFI-r) between the MFI values of CD117 and CD135 on leukemic blasts and on a population of cells non-specifically stained with IgG of the same isotype and conjugated to the same fluorochrome. Summit 5.2 software (Dako, Glostrup, Denmark) was used for analysis and determination of the median fluorescence intensity (MFI) and the percentage of cells positive to CD135 and CD117. The analysis was initially performed using side scatter versus CD45 parameters. A sample was considered to have positive markers when at least 20% of the blasts had a specific immunophenotypic marker in a live gate CD45<sup>low/intermediate</sup>. Immunological classification of T-ALL subsets was based on previously published criteria [13–15]. The criterion for cellular antigen expression for CD135 and CD117 was determined as high, medium or low cellular expression, which was defined according to the percentile values of MFI-r. Cases with values of MFI-r below the median were considered to have low expression, cases with a value above the median and below 75th percentile were considered to have medium expression and cases with values above 75th were considered to have high expression.

The presence or absence of blast cells in the samples was reviewed before any molecular analysis was performed. To diagnose leukemia, a threshold of >20% of blast cells in the BM was used as a lower limit for further analysis in T-ALL. In the PB, a clinically high WBC count or a blast percent  $\geq 25\%$  were considered suitable for any test.

### 2.3. Molecular Analysis

DS, T-LL RSL and RS were first subjected to total RNA extraction using TRIzol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized by using 2 µg of total RNA with the First-Strand cDNA Synthesis Kit™ (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont/UK). The integrity of the RNA and cDNA was examined by amplifying a fragment of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) constitutive gene according to reported conditions [16]. Genomic DNA from the same leukemic cell samples were also obtained using a QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) as recommended by the protocol.

### 2.4. Identification of *STIL-TAL1* fusion gene and *TLX3* transcript

The *STIL-TAL1* fusion gene status and the presence of the *TLX3* (*HOX11L2*) transcript were assessed by reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT–PCR) technique using primers and conditions as previously described [16].

### 2.5. Mutational analysis in the genes *FLT3* and *IL7R*

*FLT3*-D835 mutations in exon 17 were detected by a restriction fragment length mediated PCR assay (RFLP). To detect *FLT3* mutations in the juxtamembrane domain, the (*FLT3*-ITD) region spanning exons 11 and 12 was amplified using the primers, PCR reactions and cycle conditions described previously [17,18].

*IL7R* mutations (exon 6) were detected by direct sequencing using the primers, PCR amplification conditions previously described for gene region [19].

For all sequencing analyses, the PCR products were purified using the GFX PCR DNA and a Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Amersham, UK) and sequenced using a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) with a 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems). The analyses were performed with BioEdit 7.0.9 software, comparing electropherograms with the reference sequence accessed from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) for *IL7R* (*IL7R*\_NM\_002185; NP-002176; NG-009567).

### 2.6. *FLT3* real-time quantitative-PCR analysis

Real-time quantitative-PCR (qRT-PCR) was performed to determine the expression levels of *FLT3* transcription. qRT-PCR was conducted using a ViiA™7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). Reactions were performed in duplicate and were assessed using SYBR Green Go Taq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA). The relative target mRNA expression was determined using the comparative  $\Delta$ cycle threshold ( $\Delta$ CT) method. *GAPDH* was used as an internal control. Threshold values were calculated and normalized with *GAPDH*, and  $\Delta$ CT was used to quantify *FLT3* gene expression, as analyzed using Expression Suite Software Version 1.0.4 (Life Technologies, CA, USA). The primer pairs used for *FLT3* were Forward AGCATCCAGTCAATCAG and Reverse CTGGCTGGTCTATGA (5' to 3').

### 2.7. Statistical analysis

To compare the distribution of categorical variables, the Chi-square test was used, and Fisher's exact test (2-tailed) was used when the expected count in at least one cell of the table was less than five. Cases were grouped as T-ALL prior to any treatment (DS) or T-ALL as first relapse of prior T-LL diagnosis (T-LL, RSL). Cases were grouped as *FLT3-WT* or *FLT3-ITD*, and both groups were analyzed by age range, gender, and immune-molecular and clinical features to compare for significant differences. The Mann–Whitney U test was used to test the differences in continuous variables (percentage-positivity and MIF-r of CD135 and

CD117) in models that included *FLT3*, *IL7R*, *STIL-TAL1* and *TLX3* status. Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated to determine the likelihood expression of CD117 and CD135 to predict genotype status. The ROC curves are tools to test accuracy, sensitivity and specificity of association between cell markers. The Spearman rank correlation coefficient was calculated for both cellular (CD117 and CD135) and gene expression (*FLT3*). All tests were performed using PRISM software (PRISM, Graphpad, La Jolla, CA, USA). p-Values < 0.05 were considered statistically significant.

### 2.8. Ethical aspects

Patients were cared for in accordance with the Declaration of Helsinki ethical standards. The Ethical and Scientific Committees of the Instituto Nacional de Cancer, Rio de Janeiro, Brazil, approved the study (CEP/INCA#117/12; CEP-CONEP: PB #888.277).

## 3. Results

The demographics and main clinical and laboratorial features of the 162 T-ALL/LL patients included in this study are shown in Table 1. To examine possible bias introduced by selecting variables regarding T-ALL (*de novo*) and T-ALL secondary to T-LL, the demographics, clinical, and laboratorial molecular characteristic were tested for homogeneity. Almost all variables were similar, including the male: female ratio (3:1) in both groups; the mediastinal mass and WBC were higher in T-ALL ( $p = 0.03$  and 0.001, respectively). T-cortical was the more frequent

**Table 1**

Demography and clinical features of T-ALL at diagnosis and lymphoblastic lymphoma with bone marrow relapse.

	N (%) <sup>a</sup>	T-ALL (DS)	T-LL RSL	p
Age				
<10 year	85 (52.5)	81 (55.1)	4 (26.7)	0.05
10–18 years	77 (47.5)	66 (44.9)	11 (73.3)	
Gender				0.5
Male	121 (74.7)	111 (75.5)	10 (66.7)	
Female	41 (25.3)	36 (24.5)	5 (33.3)	
Skin color				0.83
White	66 (40.7)	60 (40.8)	6 (40)	
Non-White	96 (59.3)	87 (59.2)	9 (60)	
WBC ( $\times 10^9/L$ )				0.03
<50	51 (31.5)	42 (28.6)	9 (60)	
$\geq 50 < 100$	29 (17.9)	26 (17.7)	3 (20)	
$\geq 100$	82 (50.6)	79 (53.7)	3 (20)	
Mediastinal mass				0.01
yes	58 (35.8)	57 (38.8)	1 (6.6)	
no	104 (64.2)	90 (61.2)	14 (93.4)	
<i>STIL-TAL1</i>				0.99
positive	34 (26.4)	31 (26.3)	3 (27.3)	
negative	95 (73.6)	87 (73.7)	8 (72.7)	
<i>TLX3</i>				0.36
positive	16 (11.4)	16 (12.5)	0	
negative	124 (88.6)	112 (87.5)	12 (100)	
<i>FLT3</i>				0.9
ITD	8 (4.9)	7 (4.8)	1 (6.6)	
Wild-type	154 (95.1)	140 (95.2)	14 (93.4)	
<i>IL7R</i>				0.6
Mutated	9 (5.8)	9 (6.3%)	0	
Wild-type	147 (94.2)	135 (93.7)	12 (100)	
EGIL (WHO) <sup>b</sup>				0.2
ETP-ALL	12 (8.3)	11 (8.3)	1 (8.3)	
T-II (Pre-T)	32 (22.1)	30 (22.6)	2 (16.7)	
T-III (T-cortical)	66 (45.5)	63 (47.4)	3 (25)	0.057
T-IV (T-mature)	35 (24.1)	29 (21.8)	6 (50)	
Total	162 (100)	147 (90.7)	15 (9.3)	

T-ALL, T cell acute leukemia at diagnosis; Ds, diagnostic sample; T-LL RSL, lymphoblastic lymphoma with bone marrow relapse.

All cases classified was T-I (pro-T) fill criteria to early T cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ETP-ALL).

<sup>a</sup> N, Total number of cases.

<sup>b</sup> EGIL classification was not applied in 17 cases due to lack of mCD3 and/or CD1a tests.

subtype (45.5%). Furthermore, the sample consisted of 8.3% early T cell precursor ALL (ETP-ALL), 22.1% pre-T and 24.1% T mature subtypes. The prevalences of *STIL-TAL1*, *TLX3* and *IL7R* were 26.4%, 11.4% and 5.8%, respectively. There were eight cases with *FLT3-ITD* that represented 4.9% of the whole cohort. In addition, the *FLT3-D835* mutation was not observed, and the *FLT3-ITD* mutations and *IL-7R* mutations were mutually exclusive, as were the *FLT3-ITD* and *STIL-TAL1* mutations. The main characteristics of T-ALL/LL patients according to *FLT3* status are shown in Table A.1 in the appendix. There were no differences in demographics (sex, age at the diagnosis) or clinical variables (EGIL/WHO immunophenotyping, mediastinal mass, high white blood cell count or SNC involvement) according to *FLT3* status.

The T-ALL/LL subtypes determined by immunophenotyping profile and *FLT3* status are shown in Table A.2. HLA-Dr<sup>pos</sup>, CD34<sup>pos</sup> and CD10<sup>pos</sup> were found in 21.6%, 38.6% and 42.8% of cases, respectively. Myeloid antigens (CD11b<sup>pos</sup>, CD117<sup>pos</sup>, CD33/CD13<sup>pos</sup>) were also found in 18.2%, 20.2% and 30.5% of cases, respectively. CD135 was positive in 11.4% (10/88) of cases tested (three ETP-ALL, two pre-T, two T-cortical and three T-mature ALL). The distribution of different immunophenotypes of T-ALL/LL sub-sets was similar between patients with or without *FLT3-ITD* mutations. However, the majority of cases with *FLT3-ITD* (62.5%) were CD2/CD5<sup>pos</sup> and CD4/CD8<sup>neg</sup>. CD1a<sup>pos</sup> was expressed at low levels ( $\geq 20\%$  and  $< 50\%$  positivity blasts cell) in three of eight patients with *FLT3-ITD*. Expression of mCD3<sup>pos</sup> was observed in very few cases.

To test whether cellular expression of CD135 and CD117 identified by M-FCM would predict somatic mutations, the sensitivity and specificity of CD117 and CD135 were then evaluated by MFI-r and the percentage of positive cells. The median expression levels of CD117 and CD135 were heterogeneous in the whole cohort (MFI-r, 1.9 (0.5–82), 5% (0–96%) and MFI-r 1.8 (0.5–22.3), 3% (0–97%), respectively) and were taken as an example case, as shown in Fig. 2.

However, CD117 and CD135 MFI-r and the positivity changes in the median values varied according to gene mutations. Significant differences in the cellular expression levels of CD117, CD135 were observed, as shown in Fig. 3. CD135 expression was higher in *FLT3-ITD* than in *FLT3-WT* ( $p < 0.01$ ) or the *TLX3*<sup>pos</sup> group ( $p = 0.046$ ), whereas no

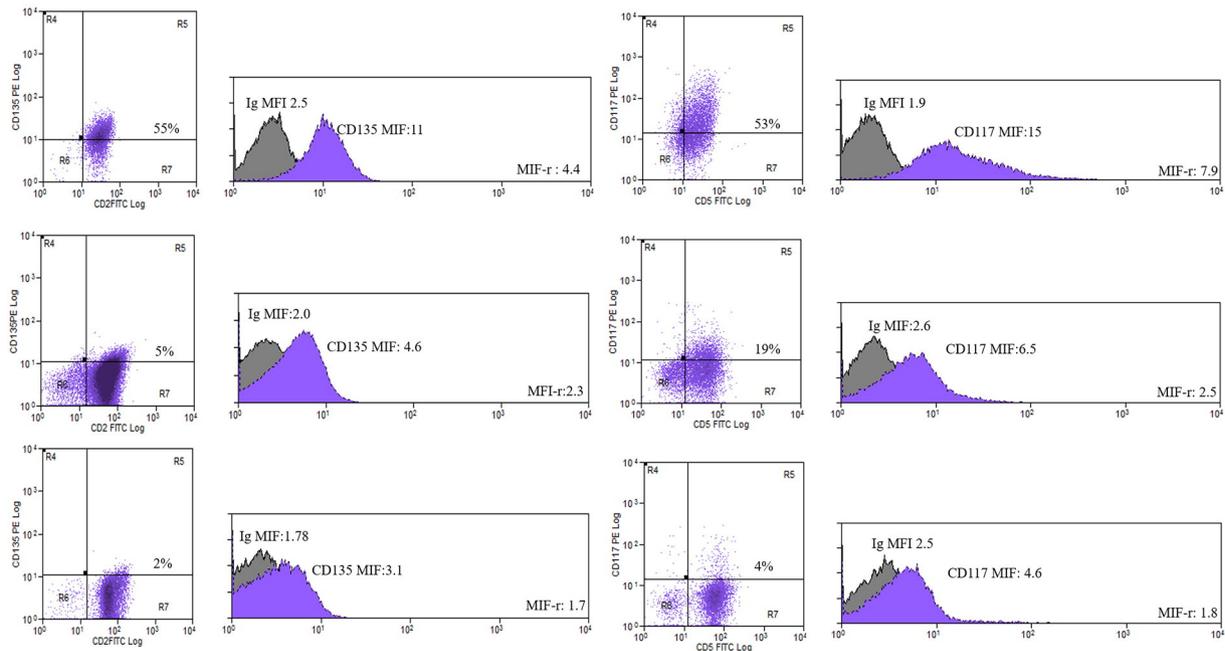
differences in CD135 and CD117 expression were observed in *STIL-TAL1* cases. The lowest expression of CD117 was found in T-ALL with *IL7R* mutated compared with *IL7R-WT* ( $p < 0.01$ ).

The cellular expression variability of CD117 and CD135 according to MFI-r percentile values and *FLT3*, *TLX3* and *ILR* status are shown in Table 2. Fifty-four percent of *TLX3*<sup>pos</sup> cases and 83.3% of *FLT3-ITD* cases were associated with high CD135 MFI-r ( $p < 0.01$ ). Regarding the expression of CD117 and *FLT3-ITD*, 50% of cases were associated with intermediate MFI-r and another 50% were associated with high MFI-r ( $p = 0.03$ ). Conversely, all cases with *IL7R* mutated were associated with low MFI-r ( $p < 0.01$ ) (Table 2).

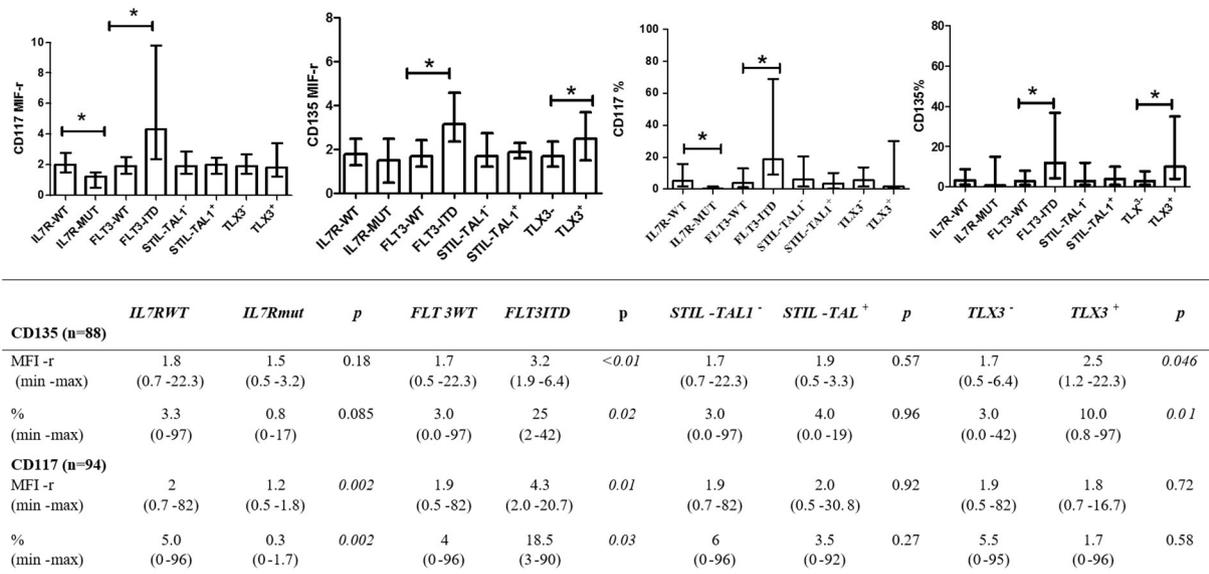
The ability of CD117 and CD135 expression variability to predict molecular aberrations was tested after the adequate cutoff ratio was established in order to achieve the appropriate sensitivity and specificity (shown in appendix Table A.3). The accuracy values to predict *FLT3-ITD* were better for CD135 and CD117 MFI-r (0.86 and 0.79, respectively) than for the percentage of positivity cells (0.77 and 0.74, respectively). In addition, for *IL7R* mutation prediction, taking into account the expression of CD117 resulted in equal accuracy value for both percentage and MFI-r (0.85).

Then, the *FLT3* transcript expression was quantified by qRT-PCR in order to compare with the CD117 and CD135 cellular profiles determined by M-FCM. Thirty samples with CD117 and CD135 cellular profiles determined by M-FCM in which biological material was still available were analyzed (Fig. 4). Quantitative qRT-PCR assays revealed that 5T-ALL cases had high *FLT3* expression. *FLT3-ITD* expression was 1.55-fold higher than *FLT3-WT* expression ( $p = 0.025$ ). The correlation of *FLT3* transcription with CD135 and CD117 MFI-r levels was tested, and positive correlations were found with both markers ( $p = 0.03$ ;  $p = 0.002$ ).

Finally, a summary of the demography and laboratorial findings of all patients with *FLT3-ITD* is shown in Table A.4 in the appendix. Two cases (#5; #8) were classified as ALL-ETP according to the immunophenotyping profile. In both cases, the status of *FLT3* changed during patient follow-up. The sequential samples (DS and RS) demonstrated that in one case (#5), heterozygous *FLT3-ITD* mutation was present in the DS sample and was not present in the RS sample, while in case



**Fig. 2.** Cellular expression of CD135 and CD117 antigens in blast cells analyzed by M-FCM. Cells positivity in dot plot and ratio median fluorescence intensity (MFI-r) in histograms. Non-specific IgG, CD135 and CD117 were used to define the MFI-r normalization. A) CD135 and CD117 high expression; B) CD135 and CD117 intermediate expression; C) CD135 and CD117 low expression.



**Fig. 3.** Differences of cellular expression of CD117 and CD135 according to molecular alteration. \* $p < 0.05$ ; interquartile range of MIF-r (ratio of median fluorescence intensity); positive cells (%) of CD117 and CD135. In tables the median, minimum and maximum value of MFI-r and positive cells (%) according to gene status. Mut, mutated; WT, wild-type, ITD, internal tandem duplication.

#8, heterozygous *FLT3-ITD* mutation was present in the DS and changed to the *FLT3-ITD* homozygous pattern in the RS (17 months after DS). Both patients died during relapse.

#### 4. Discussion

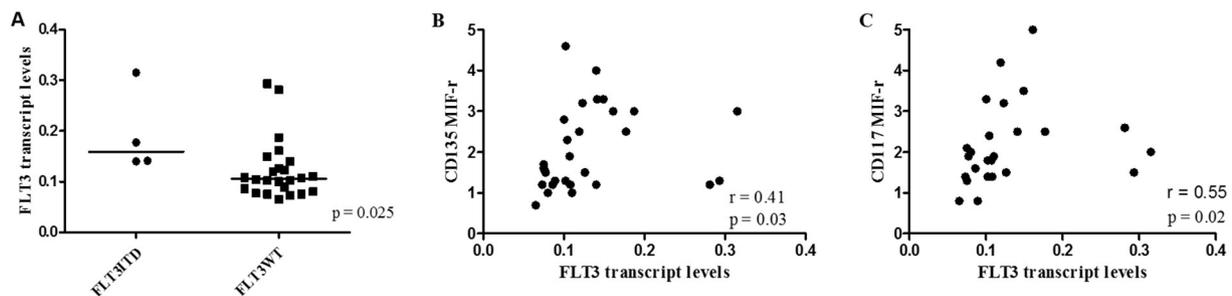
The application of M-FCM is widely accepted as a frontline test for the identification of ALL subtypes for risk stratification and treatment. However, the correlation of antigen expression and somatic genotyping of T-ALL has not been explored as in Bcp-ALL, in which the antigen expression patterns reflecting the genotype are associated with molecular-cytogenetic abnormalities that predict prognosis [20,21]. Therefore, efforts have been made to achieve sensitivity and specificity values using M-FCM to identify T-ALL subsets associated with somatic genetic aberrations [22,23].

In the present study, the accuracy of CD135 (*FLT3*) and CD117 (*c-KIT*) were explored in a large cohort of T-ALL samples from Brazil, seeking possible correlations with T-ALL-specific gene aberrations such as *STIL-TAL*, *TLX3* and *IL7R* mutations. The frequency of the *FLT3* mutation was low (5%) compared with other molecular aberrations, and only *FLT3-ITD* was identified, similar to previous studies [6,8]. *STIL-TAL*, *TLX3* and *IL7R* were found in according to previous reports [15,17], and *FLT3-ITD* and *IL7R* mutations were mutually exclusive, as were *FLT3-ITD* and *STIL-TAL1*.

Although the CD135 antigen is recognized as the *FLT3* ligand to the *FLT3* receptor–signaling pathway, it is rarely tested in acute leukemia

[24]. A few studies have found that the CD135 antigen is highly expressed in Bcp-ALL, B-cell line and acute myeloid leukemia (AML) and in a minor percentage in T-cell ALL [25]. The cellular expression of CD135 was found in 11.4% of the cases tested, and the frequency was lower than that of CD117 (20%). However, the correlation test indicates that a high level of combining cell markers is a good predictor of *TLX3*, *FLT3-ITD* and *IL7R* gene mutations. The cellular expression in terms of positivity and MFI-r of CD117 and CD135 was greater in cases with *FLT3-ITD*, although *FLT3-WT* cases were also found with CD135 and CD117 antigens. These findings were confirmed in the positive correlation of high levels of *FLT3* transcripts in cases of *FLT3-ITD* and *FLT3-WT*. Furthermore, we observed that CD135 antigen expression in blast cells was higher in cases with *TLX3<sup>pos</sup>*, in contrast to *STIL-TAL1<sup>pos</sup>* in T-ALL. These findings are in agreement with those of Lhermitte et al. (2013) [9], who suggested that *FLT3* protein expression can be ectopic and overrepresented in subsets of T-ALLs and that expression of *FLT3* was higher in oncogenic groups associated with TCR $\gamma\delta$  lineage orientation, such as *TLX3*, and lower in oncogenic groups with  $\alpha\beta$  lineage orientation, such as *STIL-TAL* [9,26].

Recently, CD117 expression was found in a T-ALL subset known as early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ETP-ALL), which is characterized by less than 5% CD1a and CD8, CD5<sup>weak</sup> with less than 75% blasts and the presence of stem cell (CD34, HLA-DR) or myeloid markers (CD117, CD13, CD33, CD11b, CD15, CD65) [22]. ETP-ALL demonstrates unfavorable outcomes in adults and children and is associated with a high frequency of *FLT3* mutation [27,28]. However, even more



**Fig. 4.** Comparisons between *FLT3* status and CD135 and CD117 cellular expression and *FLT3* transcript. A) Differences of *FLT3* transcript expression according to *FLT3* mutation status, calculated by Mann–Whitney test; the median expression is shown by horizontal bar; B) correlation between CD135 cellular expression and *FLT3* transcript expression levels. C) correlation between CD117 cellular expression and *FLT3* transcript expression. *r*, Spearman coefficient; *p* value.

**Table 2**

Expression variability between molecular alterations according to MFI-r percentile values of CD117 and CD135.

	Low	Intermediate	High	p
CD135 MFI-r	(<1.8)	(≥1.8 < 2.5)	(≥2.5)	
<i>FLT3-ITD</i> (n = 6)	0	1 (16.7)	5 (83.3)	<0.01
<i>FLT3-WT</i> (n = 82)	42 (51.2)	20 (24.4)	20 (24.4)	
<i>TLX3</i> <sup>+</sup> (n = 11)	3 (27.3)	2 (18.2)	6 (54.5)	0.13
<i>TLX3</i> <sup>-</sup> (n = 69)	36 (52.2)	17 (24.6)	16 (23.2)	
CD117 MFI-r	(<1.9)	(≥1.9 < 2.7)	(≥2.7)	
<i>FLT3-ITD</i> (n = 6)	0	3 (50)	3 (50)	0.03
<i>FLT3-WT</i> (n = 88)	43 (48.8)	24 (27.3)	21 (23.9)	
<i>IL7R</i> mutated (n = 7)	7 (100)	0	0	<0.01
<i>IL7R-WT</i> (n = 86)	35 (40.7)	27 (31.4)	24 (27.9)	

Abbreviations: ratio median fluorescence intensity (MFI-r); WT, wild-type; ITD, Internal tandem duplication.

importantly, CD117 alone does not predict *FLT3* mutation in T-ALL cases [6,24,29–31]. In the majority of the studies, mixed-lineage T/myeloid was involved or the studies did not include pediatric cohorts exclusively.

In our study, two cases with *FLT3-ITD* fulfilled the criteria for ETP-ALL, but *FLT3-ITD* was not restricted to more immature T-ALL; although most cases with *FLT3-ITD* were CD4<sup>neg</sup>/CD8<sup>neg</sup>, we found cases CD4<sup>pos</sup>/CD8<sup>neg</sup> and CD4<sup>pos</sup>/CD8<sup>pos</sup>. These immunophenotypic features were also described in previous studies [6,9]. Interestingly, TCRγδ was detected in two cases with *FLT3-ITD*, and these data suggest that *FLT3-ITD* is restricted to the TCRγδ lineage and is not found in the αβ lineage [9].

In T-ALL, CD117 expression was found in 9 to 28% of cases [32–34]. No correlation between the expression of CD117 and *STIL-TAL1*<sup>pos</sup> or *TLX3*<sup>pos</sup> was observed. The expression of CD117 was lowest in cases of *IL7R*-mutations. Mutations in *IL7R* appear to influence the expression of CD117 in accordance with the already described cross talk between these receptors [35].

Another point that should be raised is the different outcomes of two patients with *FLT3-ITD*; one relapsed 17 months after initial diagnosis with no wild-type *FLT3* allele and only mutated alleles, probably due to loss of heterozygosity. Conversely, another patient showed no *FLT3/ITD* mutation at relapse, consistent with suggestions by Van Vlierberghe et al. (2005) that the loss of the mutated allele occurred during therapy or that the clone positive for *FLT3-ITD* was eliminated during chemotherapy with a relapse from an *FLT3 WT* parental clone [6].

## 5. Conclusion

*FLT-ITD* in children with T-ALL can be predicted with the addition of CD135 and CD117 in the M-FCM panel of monoclonal antibodies, taking into account that MFI-r values are better than the percentage of positivity. Although this mutation occurs at a low frequency, the identification of *FLT3-ITD* can segregate patients who would benefit from treatment with inhibitors of tyrosine kinase.

## Conflict of interests

The authors have no competing interests.

## Authors' contributions

Eugenia Terra Granado, Francianne Gomes Andrade, Carolina Zampier, Camila Andrade, Elda Pereira Noronha and Maria S. Pombo-de-Oliveira wrote the manuscript. EN and ETG performed immunophenotype. EN, FGC, CZ and CA performed cytogenetic and molecular assays. MSPO contributed to the conception of the study, writings and critical analysis of the data. All co-authors from the BSGCL contributed with clinical and demographical data.

## Acknowledgements

We are grateful to Dr. Mariana Emerenciano and Julio Cesar Santoro for molecular technical advices. Gisele Olinto for help in analyses of sequence of *IL7R*. This investigation was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq) and Instituto Nacional de Câncer (INCA). The project was partially funded by grants from INCT-Controle do Cancer (CNPq #573806/2008-0; FAPERJ#E-26/110.823/2012). MSPO has been supported by CNPq research scholarships (#302432/2010) and FAPERJ (#E026/102.337/2013). ME has been supported by Brazilian Ministry of Health through the Institutional Development Program Scholarship.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.12.003>.

## References

- C.H. Pui, M.V. Relling, J.R. Downing, Acute lymphoblastic leukemia, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 1535–1548.
- J.P. Meijerink, Genetic rearrangements in relation to immunophenotype and outcome in T-cell acute lymphoblastic leukaemia, *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 23 (2010) 307–318.
- K. Masson, L. Ronnstrand, Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3, *Cell. Signal.* 21 (2009) 1717–1726.
- D.G. Gilliland, J.D. Griffin, The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia, *Blood* 100 (2002) 1532–1542.
- A. Staffas, M. Kanduri, R. Hovland, R. Rosenquist, H.B. Ommen, J. Abrahamsson, E. Forestier, K. Jahnukainen, O.G. Jonsson, B. Zeller, J. Palle, G. Lonnerholm, H. Hasle, L. Palmqvist, H. Ehrencrona, Presence of FLT3-ITD and high BAALC expression are independent prognostic markers in childhood acute myeloid leukemia, *Blood* 118 (2011) 5905–5913.
- P. Van Vlierberghe, J.P. Meijerink, R.W. Stam, W. van der Smissen, E.R. van Wering, H.B. Beverloo, R. Pieters, Activating FLT3 mutations in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias, *Blood* 106 (2005) 4414–4415.
- A. Andersson, K. Paulsson, H. Lilljebjorn, C. Lassen, B. Strombeck, J. Heldrup, M. Behrendtz, B. Johansson, T. Fioretos, FLT3 mutations in a 10 year consecutive series of 177 childhood acute leukemias and their impact on global gene expression patterns, *Genes Chromosom. Cancer* 47 (2008) 64–70.
- M.D. Kraszczyk, M. Dawidowska, M. Kosmalka, L. Sedek, W. Grzeszczak, J.R. Kowalczyk, T. Szczepanski, M. Witt, BCL11B, FLT3, NOTCH1 and FBXW7 mutation status in T-cell acute lymphoblastic leukemia patients, *Blood Cells Mol. Dis.* 50 (2013) 33–38.
- L. Lhermitte, R. Ben Abdelali, P. Villarese, N. Bedjaoui, V. Guillemot, A. Trinquand, M. Libura, A.S. Bedin, A. Petit, H. Dombret, G. Leverger, N. Ifrah, O. Hermine, E. Macintyre, V. Asnafi, Receptor kinase profiles identify a rationale for multitarget kinase inhibition in immature T-ALL, *Leukemia* 27 (2013) 305–314.
- K.G. Roberts, Y. Li, D. Payne-Turner, R.C. Harvey, Y.L. Yang, D. Pei, K. McCastlain, L. Ding, C. Lu, G. Song, J. Ma, J. Becksfors, M. Rusch, S.C. Chen, J. Easton, J. Cheng, K. Boggs, N. Santiago-Morales, I. Iacobucci, R.S. Fulton, J. Wen, M. Valentine, C. Cheng, S.W. Paugh, M. Devidas, I.M. Chen, S. Reshmi, A. Smith, E. Hedlund, P. Gupta, P. Nagahawatte, G. Wu, X. Chen, D. Yergeau, B. Vadodaria, H. Mulder, N.J. Winick, E.C. Larsen, W.L. Carroll, N.A. Heerema, A.J. Carroll, G. Grayson, S.K. Tasian, A.S. Moore, F. Keller, M. Frei-Jones, J.A. Whitlock, E.A. Raetz, D.L. White, T.P. Hughes, J.M. Guidry, Auvil, M.A. Smith, G. Marcucci, C.D. Bloomfield, K. Mrozek, J. Kohlschmidt, W. Stock, S.M. Kornblau, M. Konopleva, E. Paietta, C.H. Pui, S. Jeha, M.V. Relling, W.E. Evans, D.S. Gerhard, J.M. Gastier-Foster, E. Mardis, R.K. Wilson, M.L. Loh, J.R. Downing, S.P. Hunger, C.L. Willman, J. Zhang, C.G. Mullighan, Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia, *N. Engl. J. Med.* 371 (2014) 1005–1015.
- A. Moricke, A. Reiter, M. Zimmermann, H. Gadner, M. Stanulla, M. Dordelmann, L. Loning, R. Beier, W.D. Ludwig, R. Ratei, J. Harbott, J. Boos, G. Mann, F. Niggli, A. Feldges, G. Henze, K. Welte, J.D. Beck, T. Klingebiel, C. Niemeier, F. Zintl, U. Bode, C. Urban, H. Wehinger, D. Niethammer, H. Riehm, M. Schrappe, Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95, *Blood* 111 (2008) 4477–4489.
- S.R. Brandalise, V.R. Pinheiro, S.S. Aguiar, E.I. Matsuda, R. Otubo, J.A. Yunes, W.V. Pereira, E.G. Carvalho, L.M. Cristofani, M.S. Souza, M.L. Lee, J.A. Dobbins, M.S. Pombo-de-Oliveira, L.F. Lopes, K.N. Melnikoff, A.L. Brunetto, L.G. Tone, C.A. Scrideli, V.L. Morais, M.B. Viana, Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: randomized trial from the Brazilian Childhood Cooperative Group-protocol ALL-99, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28 (2010) 1911–1918.
- M.C. Bene, G. Castoldi, W. Knapp, W.D. Ludwig, E. Matutes, A. Orfao, M.B. van't Veer, Proposals for the immunological classification of acute leukemias, European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL), *Leukemia* 9 (1995) 1783–1786.

- [14] W. Gorczyca, J. Weisberger, Z. Liu, P. Tsang, M. Hossein, C.D. Wu, H. Dong, J.Y. Wong, S. Tugulea, S. Dee, M.R. Melamed, Z. Darzynkiewicz, An approach to diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders by flow cytometry, *Cytometry* 50 (2002) 177–190.
- [15] J.K.C.C., M.J. Borowitz, T Lymphoblastic Leukaemia/Lymphoma, Fourth Edition ed. International Agency for Research on Cancer, Lyon:France, 2008.
- [16] M.B. Mansur, M. Emerenciano, L. Brewer, M. Sant'Ana, N. Mendonca, L.C. Thuler, S. Koifman, M.S. Pombo-de-Oliveira, SIL-TAL1 fusion gene negative impact in T-cell acute lymphoblastic leukemia outcome, *Leuk. Lymphoma* 50 (2009) 1318–1325.
- [17] M. Emerenciano, J. Menezes, M.L. Vasquez, I. Zalberg, L.C. Thuler, M.S. Pombo-de-Oliveira, Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia, *Leuk. Lymphoma* 49 (2008) 2291–2297.
- [18] M. Nakao, S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, Y. Sonoda, T. Fujimoto, S. Misawa, Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia, *Leukemia* 10 (1996) 1911–1918.
- [19] P.P. Zenatti, D. Ribeiro, W. Li, L. Zuurbier, M.C. Silva, M. Paganin, J. Tritapoe, J.A. Hixon, A.B. Silveira, B.A. Cardoso, L.M. Sarmiento, N. Correia, M.L. Toribio, J. Kobarg, M. Horstmann, R. Pieters, S.R. Brandalise, A.A. Ferrando, J.P. Meijerink, S.K. Durum, J.A. Yunes, J.T. Barata, Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Nat. Genet.* 43 (2011) 932–939.
- [20] O. Hrusak, A. Porwit-MacDonald, Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias, *Leukemia* 16 (2002) 1233–1258.
- [21] M. van Grotel, J.P. Meijerink, E.R. van Wering, A.W. Langerak, H.B. Beverloo, J.G. Buijs-Gladdines, N.B. Burger, M. Passier, E.M. van Lieshout, W.A. Kamps, A.J. Veerman, M.M. van Noesel, R. Pieters, Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences, *Leukemia* 22 (2008) 124–131.
- [22] E. Coustan-Smith, C.G. Mullighan, M. Onciu, F.G. Behm, S.C. Raimondi, D. Pei, C. Cheng, X. Su, J.E. Rubnitz, G. Basso, A. Biondi, C.H. Pui, J.R. Downing, D. Campana, Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia, *Lancet Oncol.* 10 (2009) 147–156.
- [23] T. Inukai, N. Kiyokawa, D. Campana, E. Coustan-Smith, A. Kikuchi, M. Kobayashi, H. Takahashi, K. Koh, A. Manabe, M. Kumagai, K. Ikuta, Y. Hayashi, M. Tsuchida, K. Sugita, A. Ohara, Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15, *Br. J. Haematol.* 156 (2012) 358–365.
- [24] E. Paietta, A.A. Ferrando, D. Neuberg, J.M. Bennett, J. Racevskis, H. Lazarus, G. Dewald, J.M. Rowe, P.H. Wiernik, M.S. Tallman, A.T. Look, Activating FLT3 mutations in CD117/KIT(+) T-cell acute lymphoblastic leukemias, *Blood* 104 (2004) 558–560.
- [25] H.G. Drexler, Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells, *Leukemia* 10 (1996) 588–599.
- [26] E.A. Macintyre, L. Smit, J. Ritz, I.R. Kirsch, J.L. Strominger, Disruption of the SCL locus in T-lymphoid malignancies correlates with commitment to the T-cell receptor alpha beta lineage, *Blood* 80 (1992) 1511–1520.
- [27] M. Neumann, S. Heesch, N. Gokbuget, S. Schwartz, C. Schlee, O. Benlasfer, N. Farhadi-Sartangi, J. Thibaut, T. Burmeister, D. Hoelzer, W.K. Hofmann, E. Thiel, C.D. Baldus, Clinical and molecular characterization of early T-cell precursor leukemia: a high-risk subgroup in adult T-ALL with a high frequency of FLT3 mutations, *Blood Cancer J.* 2 (2012), e55.
- [28] J. Zhang, L. Ding, L. Holmfeldt, G. Wu, S.L. Heatley, D. Payne-Turner, J. Easton, X. Chen, J. Wang, M. Rusch, C. Lu, S.C. Chen, L. Wei, J.R. Collins-Underwood, J. Ma, K.G. Roberts, S.B. Pounds, A. Ulyanov, J. Becksfort, P. Gupta, R. Huether, R.W. Kriwacki, M. Parker, D.J. McGoldrick, D. Zhao, D. Alford, S. Espy, K.C. Bobba, G. Song, D. Pei, C. Cheng, S. Roberts, M.I. Barbato, D. Campana, E. Coustan-Smith, S.A. Shurtleff, S.C. Raimondi, M. Kleppe, J. Cools, K.A. Shimano, M.L. Hermiston, S. Doulatov, K. Eppert, E. Laurenti, F. Notta, J.E. Dick, G. Basso, S.P. Hunger, M.L. Loh, M. Devidas, B. Wood, S. Winter, K.P. Dunsmore, R.S. Fulton, L.L. Fulton, X. Hong, C.C. Harris, D.J. Dooling, K. Ochoa, K.J. Johnson, J.C. Obenauer, W.E. Evans, C.H. Pui, C.W. Naeve, T.J. Ley, E.R. Mardis, R.K. Wilson, J.R. Downing, C.G. Mullighan, The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia, *Nature* 481 (2012) 157–163.
- [29] M. Neumann, E. Coskun, L. Fransecky, L.H. Mochmann, I. Bartram, N.F. Sartangi, S. Heesch, N. Gokbuget, S. Schwartz, C. Brandts, C. Schlee, R. Haas, U. Duhrsen, M. Griesshammer, H. Dohner, G. Ehninger, T. Burmeister, O. Blau, E. Thiel, D. Hoelzer, W.K. Hofmann, C.D. Baldus, FLT3 mutations in early T-cell precursor ALL characterize a stem cell like leukemia and imply the clinical use of tyrosine kinase inhibitors, *PLoS One* 8 (2013), e53190.
- [30] C.M. Zaremba, D. Oliver, M. Cavalier, F. Fuda, N.J. Karandikar, W. Chen, Distinct immunophenotype of early T-cell progenitors in T lymphoblastic leukemia/lymphoma may predict FMS-like tyrosine kinase 3 mutations, *Ann. Diagn. Pathol.* 16 (2012) 16–20.
- [31] D. Hoehn, L.J. Medeiros, S.S. Chen, T. Tian, J.L. Jorgensen, Y. Ahmed, P. Lin, CD117 expression is a sensitive but nonspecific predictor of FLT3 mutation in T acute lymphoblastic leukemia and T/myeloid acute leukemia, *Am. J. Clin. Pathol.* 137 (2012) 213–219.
- [32] C. Sperling, S. Schwartz, T. Buchner, E. Thiel, W.D. Ludwig, Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias, *Haematologica* 82 (1997) 617–621.
- [33] M.C. Bene, M. Bernier, R.O. Casasnovas, G. Castoldi, W. Knapp, F. Lanza, W.D. Ludwig, E. Matutes, A. Orfao, C. Sperling, M.B. van't Veer, The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias, *The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL), Blood* 92 (1998) 596–599.
- [34] P. Van Vlierberghe, A. Ambesi-Impimbato, K. De Keersmaecker, M. Hadler, E. Paietta, M.S. Tallman, J.M. Rowe, C. Forne, M. Rue, A.A. Ferrando, Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 122 (2013) 74–82.
- [35] T. Jahn, S. Sindhu, S. Gooch, P. Seipel, P. Lavori, E. Leifheit, K. Weinberg, Direct interaction between Kit and the interleukin-7 receptor, *Blood* 110 (2007) 1840–1847.