



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

PRISCILLA MONIZ SODRÉ FERREIRA

CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA NA DETERMINAÇÃO
DA EXPRESSÃO PROTEICA E TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE *CRLF2* NA
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS PRECURSORAS B

Orientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Eugênia Terra Granado Pina

Rio de Janeiro

2017



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

PRISCILLA MONIZ SODRÉ FERREIRA

Citometria de fluxo multiparamétrica na determinação da expressão proteica e transcrição gênica de *CRLF2* na leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Co-orientador: Dra. Eugênia Terra Granado Pina

Rio de Janeiro

2017



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

PRISCILLA MONIZ SODRÉ FERREIRA

Orientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Eugênia Terra Granado Pina

Citometria de fluxo multiparamétrica na determinação da expressão proteica e transcrição gênica de *CRLF2* na leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dra. Sheila Coelho Soares Lima (INCA)

Dra. Elaine Sobral da Costa (UFRJ)

Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos (FIOCRUZ)

Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba (INCA) – Suplente interno

Dra. Daniella Arêas Mendes da Cruz (FIOCRUZ) – Suplente externo

Rio de Janeiro

2017

F383c Ferreira, Priscilla Moniz Sodré.

Citometria de fluxo multiparamétrica na determinação da expressão proteica e transcrição gênica de CRLF2 na leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B / Priscilla Moniz Sodré Ferreira. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

103 f. il.

Tese (Dissertação em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.

Orientador: Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira.
Coorientador: Eugênia Terra Granado Pina.

1. Citometria de Fluxo. 2. Leucemia Aguda Bifenotípica.
3. CRLF2. I. Pombo-de-Oliveira, Maria do Socorro (Orient.). II. Pina, Eugênia Terra Granado (Coorient.). III. Título.

CDD
616.07582

AGRADECIMENTOS

É neste momento que começo a reflexão de todas as pessoas que conviveram comigo nesses dois anos, que estiveram do meu lado nesta fase tão cheia de aprendizado e compromissos sem fim. Agradeço a Deus pelos dias vividos e por conseguir então finalizar mais uma etapa de formação.

À minha orientadora Dra. Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira por me permitir fazer parte do laboratório e por me transmitir toda a sua sabedoria. Foi um aprendizado muito importante para a minha formação, não só como profissional, mas como pessoal também. Entrei no INCA como uma aluna recém graduada, com pouca experiência e hoje tenho certeza que aprendi com cada reunião, com cada correção e com cada “puxão de orelha”.

À minha co-orientadora Dra. Eugênia Terra Granado Pina por cada ensinamento antes mesmo de ser sua aluna. Obrigada por me orientar, pelas críticas construtivas à minha formação, por me ensinar com toda paciência em cada detalhe, pelas dúvidas esclarecidas. Por arranjar tempo em meio a toda a confusão, por abrir as portas da sua casa para as discussões de trabalhos/dissertação. Não posso deixar de agradecer por todas as horas de descontração, pelas risadas e também choros. Pelos cuidados que você tem comigo, pelos conselhos de mãe e principalmente por ser tão especial.

Ao Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico (PHOP) por todo apoio nesses anos, pelo suporte a me aprimorar no meio científico. Agradeço a todos do grupo pelo crescimento pessoal e profissional. Em especial não posso deixar de mencionar algumas pessoas muito especiais que fizeram do meu dia-a-dia melhor. A nova Dra. do PHOP, Dra. Elda Pereira Noronha por não medir esforços para me ajudar, por todas as críticas construtivas nas prévias dos meus trabalhos, por todas as horas que você se dedicou a mim. Por ser essa pessoa tão especial, carinhosa, agregadora, com a risada mais peculiar do laboratório que faz todo mundo rir junto. Obrigada pelas horas de descontração e pelos conselhos. À Carolina Zampier, pela grande amizade, por sempre me entender, por conseguir tirar risadas de mim nos dias que estava super estressada e cansada. Pelas melhores horas de descontração dentro e fora do laboratório, por aceitar minhas “gordices” e companhia para tudo. Por ser a faz tudo do PHOP, que sempre arrumava um jeito de consertar seja lá os aparelhos, centrifugas, computadores, inclusive o meu pessoal enquanto eu só surtava. À Rafaela Montalvão, por todas as risadas maravilhosas, por todas histórias engraçadas, por sempre poder desabafar e ela sempre pronta para ouvir. Muito obrigada pela amizade e estou morrendo de saudade de você. Volte logo! À Ingrid pela amizade e pelo apoio de todos os dias, por me ajudar na parte prática da biologia molecular, que várias vezes me socorreu e por ser essa menina fofa e super

engraçada. Obrigada pelos conselhos, por rir e chorar junto comigo. À Luísa, nossa menina do laboratório que ama abraçar, pela superajuda no trabalho, pelas dicas em estatística. Sempre está disposta a me ajudar no que for preciso, obrigada por tudo. À Fran, que me deu vários conselhos, dicas e críticas construtivas durante todo o período do mestrado. Pela ajuda na parte do RTq-PCR, que soluciona todas as minhas dúvidas e que explicando na maior paciência.

A todos que colaboram para o funcionamento do laboratório, vocês foram muito importantes para o meu projeto: Rosângela Esposito, Eugênia Granado, Gisele Moledo, Bruno Aguiar, Carolina Zampier Ingrid Koster e pessoas que já nos deixaram, mas que muito contribuíram, Camila Andrade e Bruna Souza. Obrigada Bruna por essa amizade cheia de cuidado e carinho, pela sinceridade, pelas risadas e pelos inúmeros conselhos, a amizade continua mesmo fora do laboratório.

Ao nosso grupo de reunião, Eugênia, Elda, Fran, Ingrid, Filipe, Gisele B., Luísa, Thon e Tállita. Obrigada por todas as reuniões que só me acrescentaram.

À Tállita, que sempre me tratou com muito carinho, desde o início, sempre disposta a ajudar mesmo sem me conhecer direito, ensinou, deu dicas e milhões de conselhos. Sentirei muita saudade de você, fará muita falta no laboratório. Meu almoço fora, nosso japa de cada dia, não será mais igual. Torço pela sua felicidade e sucesso. Irei te visitar!

Ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer, pela oportunidade e pela alta qualidade.

À CAPES pela bolsa de pós-graduação concedida.

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

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

Aos meus amigos fora do INCA, Kelly, Mari, Luã, Guilherme, Bruna, Bruno, Carol H., Rodrigo, Camila, Henrique, Pedro Z. que entenderam todas as minhas ausências, que estão por perto quando eu mais preciso e que mesmo não nos falando todos os dias, a amizade não diminuiu. Obrigada amigos por tudo, principalmente por torcerem sempre por mim.

Aos meus sogros, Beth e Maurício, não teria tanto espaço para agradecer por vocês serem tão especiais. Obrigada por sempre estarem presentes, pela ajuda quando necessário, pela paciência, por me aceitarem em sua casa quando eu mais precisei, pelos ensinamentos passados em tantas conversas, pelos diversos abraços, por chorarem e rirem comigo, por sempre estarem perto na alegria ou na tristeza, por nunca medirem esforços para me ver feliz. Obrigada pelas milhares de horas de descontração, de risadas ilimitadas, pelos jantares

maravilhosos, pela convivência gostosa. Não posso deixar de agradecer por terem um filho tão especial, com qualidades maravilhosas por quem me apaixonei.

Aos meus pais, Pedro e Cláudia que apesar de não conseguirem entender muito bem sobre minha profissão, sobre minhas horas de estudo, sempre me apoiaram. Ao meu irmão Alexandre, que tenho um amor incondicional, um cuidado especial. Obrigada pelas horas de conversas, pelos ensinamentos, pela paciência. Obrigada a Jú, minha cunhada que faz meu irmão extremamente feliz e meu sobrinho Mateus, o menino mais lindo, fofo e educado. Minha referência de quanto tiver meu filho “rs”.

Aos meus maravilhosos avós, Antônio *in memoriam* e Glória, obrigada por vocês sempre priorizarem minha educação, por me ensinarem sobre respeito ao próximo, ética, por me ensinaram nunca baixar a cabeça e desanimar. Obrigada pela convivência de anos. Meu avô que choro só de escrever pois sinto muita saudade, de todas histórias de viagens (que infelizmente não tive oportunidade de contar as minhas) e de sua experiência de vida que você sempre compartilhou, muita saudade do seu abraço de urso. Minha vizinha que faço questão de ligar só para dizer que eu amo muito, minha vó coruja que sempre me “paparica”, que faz todas as minhas vontades, que me ensinou a importância da família reunida. Serei grata para sempre e irei passar seus ensinamentos a diante. Amo vocês e serei eternamente agradecida pelos maravilhosos avós!

Ao meu noivo Marcelo Menasce, pela sua dedicação e apoio incondicional, por me entender nos momentos mais estressantes (como esse rs), você me ajudou muito na parte emocional, de como passar por esta fase da maneira mais leve, por fazer todas as funções de casa sem reclamar. Obrigada por me mostrar o que é felicidade nesses quase 6 anos de relacionamento. Por você ser essa pessoa tão especial, tão carinhoso, que sempre me surpreende. Meu príncipe, obrigada por me proporcionar momentos maravilhosos e únicos. Te amo muito!

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.

Roger Von Oech

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

RESUMO

Citometria de fluxo multiparamétrica na predição da alta expressão celular e molecular de *CRLF2* na leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B

Introdução: A leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLA-cpB) apresenta biomarcadores citogenético-moleculares clássicos com prognóstico bem definidos. Trinta por cento desses casos não possuem nenhuma dessas anormalidades e são referidas como B-others e 50% desse subgrupo possui perfil de expressão gênica semelhante a *BCR-ABL1*, sendo chamados então, de *BCR-ABL1-like*. Este subgrupo possui diferenças genéticas características como mutações nos genes *JAK1/2*, *IL7R α* , e *CRLF2*, além da expressão gênica aumentada deste último. O *CRLF2* forma um heterodímero com a cadeia alfa do receptor de Interleucina 7 (*IL-7R α*) ou *CD127* formando o receptor da citocina TSLP. Estudos envolvendo o *CRLF2* têm apresentado resultados controversos, devido a não utilização de técnicas padronizadas para sua detecção. **Objetivo:** Estabelecer um algoritmo de testes combinados imunofenotípicos e moleculares capazes de predizer o *status* do *CRLF2* e sua associação com subtipos moleculares e celulares em amostras de crianças com LLA-cpB. **Métodos:** Análise do painel de anticorpos monoclonais *CD10FITC/CD127PE/CD45PerCP-CY5.5/CD19PE-CY7/CRLF2APC* em 138 amostras de LLA-cpB ao diagnóstico (≤ 18 anos), quanto à expressão celular de *CRLF2* e *CD127* em blastos leucêmicos, avaliando percentual e intensidade mediana de fluorescência (IMF). Para avaliar a ploidia desses casos foi utilizado o índice de DNA por citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) e a expressão gênica do *CRLF2* foi avaliada por RTq-PCR. Já as alterações moleculares *ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1*, *BCR-ABL1*, *r-KMT2A* foram avaliadas por RT-PCR. Para a avaliação da distribuição das variáveis categóricas foram aplicados os testes Exato de Fisher e 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 análise de correlação entre os dados foi utilizado o teste de *Spearman* e para análises pareadas entre as amostras de diagnóstico e recaída foi utilizado o teste *Wilcoxon*. Para todos os testes foi considerado o nível mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** A mediana de expressão do *CRLF2* foi 3,5% (0,07-99,7). Os pacientes foram divididos quanto ao percentual de expressão de *CRLF2* nos seguintes grupos: $<20\%$, $\geq 20\%$ e $<70\%$ e $\geq 70\%$. Cento e nove pacientes (85,2%) tiveram $<20\%$ de células positivas, enquanto 8 (6,2%) tiveram entre $\geq 20\%$ e $<70\%$ e 11 (8,6%) $\geq 70\%$. O subtipo Pré-B (B-III) apresentou maior percentual de células positivas para o *CRLF2* (mediana 6,7%) do que o subtipo Pró-B (B-I) (mediana 1,2%) ($p=0,02$). Casos *ETV6-RUNX1* positivos apresentaram menor percentual de células positivas (mediana 0,95%) do que *ETV6-RUNX1* negativos (mediana 4,1%) ($p=0,0298$). Não foi encontrado alterações *ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1*, *BCR-ABL1* e *KMT2A-r* no grupo de alto percentual do *CRLF2* ($p=0,02$), além disso, neste grupo foi encontrado um aumento nos pacientes com idade > 10 anos ($p=0,04$). Em relação a expressão do *CD127* não foram encontradas diferenças estatísticas entre variáveis analisadas, além de não ter sido visto associação com a expressão do *CRLF2*. A expressão gênica do *CRLF2* foi realizada em 45 casos com o intuito avaliar a correlação molecular e celular. Foi observada uma correlação fraca positiva ($r=0,362$)($p=0,014$) entre a expressão gênica do *CRLF2* e a expressão celular avaliada por CFM. **Conclusão:** Foi possível identificar através da expressão celular por CFM casos com expressão diferencial do *CRLF2* nas amostras de LLA-cpB. Desta forma a CMF pode ser uma ferramenta prática e rápida para avaliação do *CRLF2* e que possa ser introduzida no diagnóstico clínico.



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

ABSTRACT

Multiparametric flow cytometry in the determination of protein expression and gene transcription of CRLF2 in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia

Introduction: B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) presents classical cytogenetic molecular biomarkers with well-defined prognosis. Thirty percent of these cases do not have any of these abnormalities and are referred to as B-others and 50% of this subgroup has a *BCR-ABL1* similar gene expression profile, then called *BCR-ABL1-like*. This subgroup has characteristic genetic differences as mutations in the *JAK1 / 2*, *IL7R α* , and *CRLF2* genes, as well as increased gene expression of the latter. *CRLF2* forms a heterodimer with the alpha chain of the Interleukin 7 receptor (*IL-7R α*) or CD127 forming the TSLP cytokine receptor. Studies involving the *CRLF2* have presented controversial results due to the use of non-standardized techniques for their detection. **Objective:** To establish an algorithm of combined immunophenotypic and molecular tests capable of predicting the *CRLF2* status and its association with molecular and cellular subtypes in children samples with BCP-ALL. **Methods:** Analysis of the monoclonal antibodies panel CD10FITC/CD127PE/CD45PerCP-CY5.5 /CD19PE-CY7/CRLF2APC in 138 samples of diagnostic-ALL (≤ 18 years) on cell expression of *CRLF2* and CD127 in leukemic blasts, evaluating percentage and median intensity of fluorescence (MIF). To evaluate the ploidy of these cases the DNA index was used by multiparametric flow cytometry (MFC) and the *CRLF2* gene expression was evaluated by RTq-PCR. The molecular alterations *ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1*, *BCR-ABL1*, *r-KMT2A* were evaluated by RT-PCR. For the evaluation of the categorical variables distribution, Fisher's Exact and Qui-Square tests were applied. For the comparison of continuous variables, the non-parametric Mann-Whitney test (comparison of two groups) or Kruskal wallis (more than two groups) was used. For the analysis of correlation between the data the Spearman test was used, for paired analyzes between the diagnostic and relapse samples the Wilcoxon test was used. For all tests, a minimum significance level of 5% ($p < 0.05$) was considered. **Results:** The median *CRLF2* expression was 3.5% (0.07-99.7). Patients were divided according to the percentage of *CRLF2* expression in the following groups: $<20\%$, $\geq 20\%$ and $<70\%$ and $\geq 70\%$. One hundred and nine patients (85.2%) had $<20\%$ of positive cells, while 8 (6.2%) had between $\geq 20\%$ and $<70\%$ and 11 (8.6%) $\geq 70\%$. The pre-B subtype (B-III) had a higher percentage of *CRLF2* positive cells (median 6.7%) than the Pro-B (BI) subtype (median 1.2%) ($p = 0.02$). *ETV6-RUNX1* positive cases had a lower percentage of positive cells (median 0.95%) than *ETV6-RUNX1* negative (median 4.1%) ($p = 0.0298$). *ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1*, *BCR-ABL1* and *KMT2A-r* were not found in the high percentage group of *CRLF2* ($p = 0.02$). In addition, such high percentage group presented an increased number of patients aged > 10 years presented overexpression of the molecule ($p = 0.04$). Regarding the expression of CD127, no statistical differences were found between analyzed variables, and no association with *CRLF2* expression was observed. The *CRLF2* gene expression was performed in 45 cases in order to evaluate the molecular and cellular correlation. A weak positive correlation ($r = 0.362$) ($p = 0.014$) between the *CRLF2* gene expression and the cellular expression evaluated by MFC was observed. **Conclusion:** It was possible to identify cases with cellular differential expression of *CRLF2* in the BCP-ALL samples by MFC. In this way the MFC can be a practical and fast tool for the evaluation of *CRLF2* and that can be introduced in clinical diagnosis.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leucemia Linfoblástica aguda: aspectos clínicos-epidemiológicos	1
1.2. Citometria de fluxo multiparamétrica	4
1.3. Marcadores celulares e moleculares em leucemias linfoblásticas de células precursoras B que definem prognóstico	9
1.4. Desafio de identificação de marcadores fenótipos na era genômica	13
1.5. Superexpressão <i>CRLF2</i>	15
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	19
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Desenho de estudo	22
4.2. Casuística	23
4.3. Ética	24
4.4. Métodos	24
4.4.1. Marcação imunofenotípica	24
4.4.2. Processamento da amostra	27
4.4.3. Descongelamento das células em DMSO	27
4.4.4. Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo	28
4.4.5. Citometria de fluxo para análise da ploidia celular	30
4.4.6. Extração de RNA	33
4.4.7. Tratamento com DNase e transcrição de RNA em cDNA	33
4.4.8. Reação em cadeia da polimerase por transcriptase-reversa gene <i>GAPDH</i>	34
4.4.9. Reação em cadeia da polimerase para teste de amplificação do gene <i>CRLF2</i>	34

4.4.10. Reação em cadeia da polimerase em tempo real	35
4.4.11. Análise estatística	36
5. RESULTADOS	36
5.1. Características clínico-demográficas das amostras	37
5.2. Análises de imunofenotipagem para CRLF2 e perfil de expressão celular	39
5.2.1. Distribuição de frequência do percentual e intensidade mediana de fluorescência do CRLF2	42
5.2.2. Perfil de expressão celular do CRLF2 de acordo com o percentual e a intensidade mediana de fluorescência nas variáveis clínico-demográficas	43
5.2.3. Correlação entre o percentual e a intensidade mediana de fluorescência	49
5.2.4. Expressão celular e os subtipos maturativos	49
5.2.5. Avaliação imunofenotípica do CD66c com a expressão diferencial do CRLF2	51
5.2.6. Análises da expressão celular de CRLF2 de acordo com subtipo de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B com alterações fundadoras da leucemogênese	52
5.2.7. Expressão celular do CRLF2 em leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B nas crianças com Síndrome de Down	56
5.2.8. Níveis de expressão celular do CRLF2 entre pacientes com recaída de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B	56
5.3. Análise de expressão gênica do <i>CRLF2</i>	57
5.4. Análises de imunofenotipagem para CD127	60
5.4.1. Distribuição de frequência do perfil de expressão do CD127 em relação ao percentual e intensidade mediana de fluorescência	60
5.4.2. Correlação entre o percentual e a intensidade mediana de fluorescência	61
5.4.3. Perfil de expressão celular do CD127 de acordo com as variáveis clínico-demográficas	62

5.4.4. Correlação entre os níveis de expressão das moléculas CRLF2 e CD127	66
Quadro 1.1. Marcadores específicos que estabelece a classificação EGIL(1995)/OMS(2008) dos subtipos celulares nas LLA-cpB	8
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÃO	78
8. REFERÊNCIAS	79
9. ANEXOS	92
9.1. Instituições colaboradoras	92
9.2. Ficha de cadastro do paciente	93
9.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	95
9.4. Produções durante o período do mestrado	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Marcadores específicos que estabelece a classificação EGIL(1995)/OMS(2008) dos subtipos celulares nas LLA-cpB	8
---	---

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.	Variáveis importantes para estratificação de risco em LLA-cpB	13
Tabela 4.1.	Painéis para caracterização das LLA-cpB no estudo	25
Tabela 4.2.	Anticorpos monoclonais para caracterização das leucemias linfoblásticas de células precursoras B.	26
Tabela 5.1.	Características clínico-demográficos dos casos ao diagnóstico	38
Tabela 5.2.	Características clínico-demográficas das amostras de recaída	39
Tabela 5.3.	Comparação das variáveis clínico-demográficas de acordo com o perfil de expressão celular em percentual do CRLF2	47
Tabela 5.4.	Comparação das variáveis clínico-demográficas de acordo com o perfil de expressão celular em IMF do CRLF2	48
Tabela 5.5.	Perfil de expressão do CRLF2 em LLA-cpB de acordo com o percentual entre os subtipos maturativos	50
Tabela 5.6.	Perfil de expressão do CRLF2 em LLA-cpB de acordo com a IMF entre os subtipos maturativos	51
Tabela 5.7.	Marcação do CD66c em baixo, intermediário e alto percentual de expressão do CRLF2	52
Tabela 5.8.	Marcação do CD66c em baixo, intermediário e alto IMF de expressão do CRLF2	52
Tabela 5.9.	Presença das alterações moleculares mais frequentes em LLA-cpB de acordo com o percentual de expressão de CRLF2	54
Tabela 5.10.	Características clínico-demográficas nos casos com identificação da ploidia	55
Tabela 5.12.	Comparação das variáveis clínico-demográficas de acordo com o perfil de expressão celular em percentual do CD127.	65
Tabela 5.13.	Comparação das variáveis clínico-demográficas de acordo com o perfil de expressão em IMF do CD127	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Desenvolvimento de células B normais na MO	6
Figura 1.2.	Frequência estimada dos genótipos específicos em LLA	15
Figura 1.3.	Vias de sinalizações e aberrações em IL7-R α e CRLF2	17
Figura 4.1.	Fluxograma dos procedimentos laboratoriais realizados no estudo de acordo com os critérios de inclusão	23
Figura 4.2	Esquema de análise para avaliação de CRLF2 e CD127	29
Figura 4.3.	Análise do índice de DNA	32
Figura 4.4.	Gel de agarose revelando PCR do gene <i>GAPDH</i> em amostras de pacientes de LLA-cpB	34
Figura 4.5.	O <i>plot</i> de amplificação do <i>CRLF2</i> e <i>GAPDH</i>	36
Figura 5.1.	Representação esquemática dos casos do estudo	37
Figura 5.2.	Esquema de análise do CRLF2 através de <i>dotplot</i> com CD45xCD19	40
Figura 5.3.	Perfil de expressão dos casos analisados para CRLF2	41
Figura 5.4.	Distribuição de frequência do CRLF2 em blastos leucêmicos de LLA-cpB	43
Figura 5.5.	Análise do percentual do CRLF2 de acordo com as variáveis	45
Figura 5.6.	Análise da IMF do CRLF2 de acordo com as variáveis	46
Figura 5.7.	Correlação entre o percentual e a IMF do CRLF2	49
Figura 5.8.	Perfil de expressão de células positivas para o CRLF2 em subtipos de LLA-cpB	50
Figura 5.9.	Perfil de expressão do CRLF2 nos casos com percentual positivo e negativo do CD66c	51
Figura 5.10.	Comparação do percentual de células positivas para o CRLF2 em casos com a presença e ausência de alterações moleculares mais frequentes.	53

Figura 5.11.	Comparação da IMF de células positivas para o CRLF2 em casos com a presença ou ausência das alterações moleculares e índice de DNA	54
Figura 5.12.	Análise de expressão de CRLF2 em amostras de diagnóstico e recaída em relação aos níveis de expressão em percentual e IMF	57
Figura 5.13.	Distribuição de frequência da expressão gênica do CRLF2 nos casos de LLA-cpB	58
Figura 5.14.	Perfil de expressão gênica do <i>CRLF2</i> em subtipos de LLA-cpB	59
Figura 5.15.	Correlação da expressão gênica com os níveis de expressão celular do CRLF2	59
Figura 5.16.	Distribuição de frequência do CD127 em relação ao percentual e IMF em blastos linfoides de pacientes com LLA-cpB	61
Figura 5.17.	Análise do percentual do CD127 de acordo com as variáveis	63
Figura 5.18.	Análise da IMF do CD127 de acordo com as variáveis	64
Figura 5.19.	Correlação entre a expressão dos marcadores CRLF2 e CD127	67
Figura 5.20.	Algoritmo de testes para a identificação da alta expressão do CRLF2	68
Figura 6.1.	Expressão do CD66c e correlação com anormalidades genéticas	71

ABREVIATURAS

- AcMo: anticorpos monoclonais
- APC: alofocianina
- BFM: Berlim-Frankfurt-Munique
- CCG: *Children's Cancer Group*
- CD : *cluster of differentiation* (grupamentos de diferenciação)
- cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar
- CEP: Comitê de ética em pesquisa
- CFM: citometria de fluxo multiparamétrica
- CN: controle negativo
- CNA: alterações no número de cópias
- CONEP: Comissão nacional de ética em pesquisa
- CRLF2: *Cytokine receptor-like factor 2*
- CV: Coeficiente de variação
- DMSO: dimetilsulfóxido
- dNTP: desoxinucleotídeos
- DRM: Doença residual mínima
- EGIL: *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (Grupo europeu para caracterização imunológica das leucemias agudas)
- FISH: Hibridização fluorescente *in situ*
- FITC: isotiocianato de fluoresceína
- FSC: *forward scatter*
- GAPDH: gliceraldeído -3- fosfato desidrogenase
- iAMP21: Amplificação intra cromossômica do cromossomo 21
- IKZF1: *IKAROS Family zinc finger 1*
- ID: Índice de DNA
- IgM: Imunoglobulina M
- IL: interleucina
- IL-2R α : cadeia alfa do receptor de Interleucina-2
- IL-7R α : cadeia alfa do receptor de Interleucina-7
- IMF: intensidade mediana de fluorescência
- LLA: leucemia linfoblástica aguda
- LLA-cpB: Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B
- LMA: leucemia mielóide aguda

MO: medula óssea
MPO: mieloperoxidase
NCI: *National Cancer Institute*
NGS: Sequenciamento de nova geração
NK: *natural killer*
OMS ou WHO: Organização mundial de saúde ou *World Health Organization*
PBS: tampão fosfato
PE: ficoeritrina
PerCP- Cy 5.5: Complexo-piridina-clorofil-proteína cianina
Ph: *Philadelphia*
RAG: *recombinase activating gene* (recombinase ativadora de genes)
RCBP: Registro de Câncer de Base Populacional
RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa
RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
SD: Síndrome de Down
SFB: soro fetal bovino
SNC: Sistema nervoso central
SP: sangue periférico
SSC: *side scatter*
TA: temperatura ambiente
TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido
TdT: desoxinucleotidil-transferase terminal
TSLP: *Thymic stromal lymphopoietin*
TSLPR: *Thymic stromal lymphopoietin receptor*

1.INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Linfoblástica aguda: aspectos clínicos-epidemiológicos

A leucemia linfóide aguda (LLA) é a neoplasia maligna mais comum nas crianças. É uma doença heterogênea que consiste em uma desordem do sistema hematopoiético caracterizada pela proliferação de células linfóides de fenótipos imaturos denominados blastos que podem ser identificados tanto na medula óssea (MO) como no sangue periférico (SP). É resultado de um processo multifatorial, por associação de fatores genéticos, ambientais e de susceptibilidade individual (POMBO-DE-OLIVEIRA, *et al.* 1986; PERERA, 1996; BELSON, 2007). Esta neoplasia é predominante em crianças menores de 15 anos e correspondem 25%-35% de todas as neoplasias malignas deste grupo de idade. O pico de incidência na faixa de 2 e 5 anos é basicamente decorrente da maior frequência de LLA neste grupo. É um pouco mais frequente entre meninos do que meninas (LINET, *et al.* 1999; REIS, *et al.* 2011). Um estudo feito no Brasil, por pesquisadores de nosso grupo, mostrou que a mediana das taxas de incidência específicas por idade para LLA é maior em crianças entre 3-6 anos de idade sendo semelhantes em ambos sexos. A variação entre as leucemias correspondeu a 61-87,5% de todos os casos de leucemia de acordo com o Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP). Nesta análise observou que há diferenças regionais de incidências entre as cidades brasileiras (REIS, *et al.* 2011).

Clinicamente, os sintomas mais comuns ao diagnóstico em crianças com LLA ao diagnóstico são cansaço, febre, palidez, dor óssea e nas articulações, perda de peso que são explicados pela supressão da hematopoese normal devido a proliferação dos blastos na MO. Ao exame físico dos pacientes pode-se observar hepatoesplenomegalia e linfonodomegalia. Os exames laboratoriais podem demonstrar trombocitopenia e anemia, além da leucocitose. Manifestações menos frequentes são infiltração testicular e infiltração de células leucêmicas no sistema nervoso central (SNC) (ONCIU, 2009). Esses sintomas clínicos evidentes de LLA geralmente estão presentes apenas algumas semanas antes do diagnóstico e raramente por vários meses. O desenvolvimento da LLA, portanto, provavelmente envolve uma fase oculta ou clinicamente silenciosa entre as primeiras etapas da leucemogênese e o início dos sintomas da doença.

Dada ao curto período de latência conferido pela idade da maioria das crianças que tem LLA (< 5 anos) e a latência mais longa esperada para a evolução clonal do câncer em adultos (>10 anos), é aceito que a leucemogênese se origine antes do nascimento, durante a vida intra-uterina (WIEMELS, 1999).

As causas ainda são enigmáticas, porém alguns estudos apontam para fatores etiológicos postulados que estariam associados com a leucemogênese (GREAVES, 2002). Este processo é improvável que seja o resultado de um único evento, mas sim de múltiplos eventos com uma interação complexa entre susceptibilidade do indivíduo (grupo étnico, idade, sexo, fatores nutricionais e de saúde), danos cromossômicos secundários à exposição física ou química e o acaso (PERERA, 1996; GREAVES, 1999; KEBRIEAEI, 2003). Há evidências que a LLA resulta de alterações cromossômicas e mutações que interrompem o processo normal das células progenitoras linfoides (Revisão em PUI, 1995). No entanto, foi proposto que essas mutações e alterações ocorram na fase intrauterina e que seria necessário um segundo evento pós-natal para que ocorresse a proliferação de células leucêmicas (GREAVES, 1999). A partir desta hipótese, foram feitos estudos epidemiológicos para identificar os fatores associados ao segundo evento, dentre estes destacam-se a exposição materna durante a gestação como substâncias químicas (POMBO-DE-OLIVEIRA, 2006), radiações ionizantes e não-ionizantes e hiper higienização durante os primeiros anos de vida da criança (GREAVES, 1999; BELSON, 2007).

Além dos fatores de riscos ambientais, pacientes com distúrbios genéticos hereditários associados a anormalidades cromossômicas estão associadas a uma maior susceptibilidade à leucemias, como a Síndrome de Down (SD), síndrome de Bloom, anemia de Fanconi e ataxia-telangiectasia (T-A) (KEBRIEAEI, 2003; SCHMIEGELOW, *et al.* 2006; SEIF, 2011).

Schmiegelow e colaboradores publicaram uma proposta hipotética sobre os níveis de cortisol plasmático na etiopatologia de Leucemia linfoblástica de células precursoras B (LLA-cpB) ("hipótese adrenal"), baseado nas linhas de evidência biológicas e perfil epidemiológico obtido a partir estudos de bases-populacionais em todo o mundo (EDGAR, 2008; SCHMIEGELOW, *et al.* 2008). Esta hipótese adrenal é substanciada pelo papel do sistema imune e das infecções na patogênese da LLA-cpB (GREAVES, 1999). A grande maioria das taxas atuais de incidência de LLA demonstram a presença de um pico mais elevado na incidência de LLA-cpB em crianças entre 2-4 anos de idade de países desenvolvidos com elevados padrões de higiene e vacinações de 3-6 anos nos países com menores índices de desenvolvimento. A combinação de homogeneidade étnica, saúde pública gratuita com fácil acesso a assistência médica especializada, e registros de base-populacional abrangente com todas as crianças diagnosticadas com LLA-cpB, tornaram os países nórdicos modelos de excelência para testar esta hipótese adrenal (HJALGRIM, *et al.* 2003). Os autores argumentam que a higienização elevada favorece através de mecanismos imunes uma vantagem proliferativa às células com fenótipos leucêmicos, enquanto, as constantes

infecções virais da primeira infância (≤ 5 anos) estimulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, elevando níveis de cortisol plasmático suficientes para eliminar estas células com fenótipos leucêmicos originadas durante a vida fetal (SCHMIEGELow, 2008). Esta hipótese tem fundamentos biológicos já demonstrados (GREAVES, 2006) porém, poucas pesquisas e estudos epidemiológicos com base-populacional foram realizados em países pobres. Um cenário diferente, vem surgindo, desde o início do ano 2000, com a participação de coortes de estudos em países como o Argentina, Chile, Brasil México e Turquia, permitindo comparações internacionais (POMBO-DE- OLIVEIRA, 2009). No Brasil, em particular, o desenvolvimento dos RCBP, incluindo a classificação imunofenotípica das LLA vem melhorando os dados com estatísticas confiáveis. Em uma série de 1690 casos de LLA (período de 2000-2007) foi observado que as frequências de LLA-cpB são semelhantes ao que foram descritos no México e na Argentina com a maior incidência nas crianças com idades entre 3-6 anos (BERNALEZ-RIOS, *et al.* 2008; AZEVEDO-SILVA, 2010). Para explorar e testar a hipótese adrenal, foram analisados os dados de áreas endêmicas para Calazar no Brasil como, Bahia (Salvador), Pernambuco (Recife) e Paraíba (João Pessoa), (AZEVEDO-SILVA, 2009) além de analisar as associações serológicas positivas para *L. chagasi*, como *proxy* da exposição e avaliar a diferença na frequência de LLA com *ETV6/RUNX1* nas regiões endêmicas como Paraíba e Bahia. Os dados científicos existentes sugerem que a infecção desempenha um papel crítico no desenvolvimento de LLA-cpB, embora nenhum agente infeccioso em particular esteja diretamente implicado.

É plausível que uma carga elevada de episódios infecciosos graves e contínuos possa contribuir para reduzir a taxas de LLA devido à secreção endógena de cortisol. A compreensão das implicações de tais doenças infecciosas em relação à leucemia aguda, com intensa estimulação do sistema imunológico e outras exposições ambientais de células linfóides, ajudaria a testar a hipótese de Schmiegelow no Brasil. Uma vez a doença clinicamente instalada são necessárias as investigações referentes a fatores preditivos de prognósticos e tratamentos adequados aos diferentes subtipos de variáveis importantes para sobrevida.

Com estas evidências é muito importante diferenciar e diagnosticar precisamente as LLAs pediátricas. Fatores de prognóstico foram identificados e incorporados ao diagnóstico, e indicações terapêuticas. A estratificação de risco utilizando marcadores específicos com determinados fenótipos é fundamental para o sucesso do tratamento. Dessa forma abordagem uniforme para a estratificação de risco vem hoje. Hoje, os critérios mais utilizados são do *National Cancer Institute* (NCI) que são baseados na idade e leucometria do paciente ao

diagnóstico, no qual pacientes são considerados de risco padrão entre a idade 1-9 anos e leucometria menor que $50 \times 10^9/L$ e pacientes caracterizados como de alto risco possuem idade menor do que 1 ano ou maior ou igual a 10 anos ou leucometria maior ou igual a $50 \times 10^9/L$ (SMITH, *et al.* 1996).

O tratamento para LLA compreende três fases: indução da remissão, intensificação ou consolidação e manutenção. A maioria dos medicamentos utilizados foram desenvolvidos antes de 1970, no entanto, suas doses e combinações foram otimizadas utilizando-se conhecimentos mais recentes como características biológicas dos blastos leucêmicos, além da resposta ao tratamento utilizando a citometria de fluxo e técnica de biologia molecular na identificação da doença residual mínima (DRM) resultando em uma alta taxa de sobrevida (STANULLA, 2009).

1.2. Citometria de fluxo multiparamétrica

A citometria de fluxo é uma metodologia direcionada à caracterização fenotípica de células podendo também ser utilizada para outros fins, como conteúdo de DNA, produção de citocinas, DRM, entre outros. Tem como fundamento a mensuração de parâmetros morfológicos e funcionais de células, por meio da detecção da dispersão da luz e fluorescência emitidas por fluorocromos ligadas à superfície ou no citoplasma dessas células, quando interceptadas individualmente por um laser. Estes componentes podem ser mensurados simultaneamente e avaliados célula a célula. Dessa forma, o uso desta ferramenta tem se tornado a escolha para análises multiparamétricas de populações celulares (SALES, 2013).

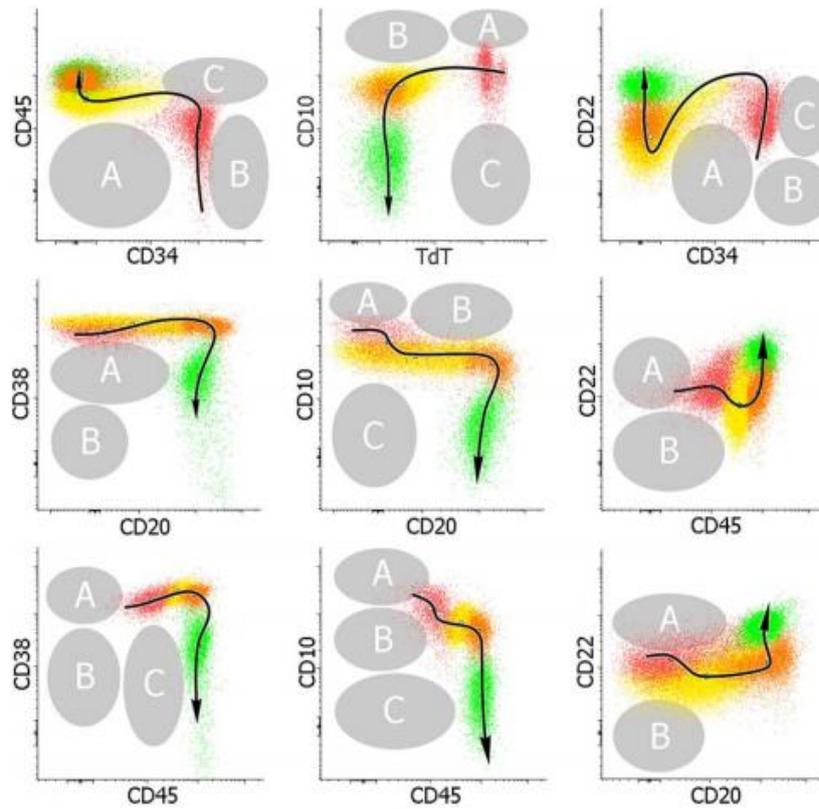
No sistema ótico do citômetro duas lentes são importantes para avaliar características morfológicas das células, uma de captação frontal e a outra de captação lateral, a dispersão da lente frontal (*forward scatter* – FSC) é proporcional ao tamanho das células, enquanto a dispersão lateral (*side scatter* – SSC) é usada para diferenciar populações celulares com base em sua granularidade intracelular. Além da dispersão de luz, também é utilizada na citometria a análise de moléculas através da marcação com AcMo ligados a fluorocromos em diferentes comprimentos de ondas (SALES, 2013). Portanto, os novos equipamentos têm configurações com 2-3 fontes de laser que capacitam a detecção de vários parâmetros de análises com maior sensibilidade e resolução.

Os fluorocromos absorvem uma energia luminosa em determinado comprimento de onda e emitem luz em um comprimento de onda maior. Assim, a cor da fluorescência normalmente se refere à cor da luz que um fluorocromo emite no seu mais elevado estado eletrônico de excitação, como por exemplo o isotiocianato de fluorescína (FITC) que possui espectro de luz verde. No entanto pode ocorrer sobreposição das cores emitidas, por isso é importante a compensação das fluorescências para evitar análise equivocada dos resultados (SALES, 2013).

A imunofenotipagem é o teste inicial e mais eficiente no diagnóstico e prognóstico de leucemias agudas. O uso de painéis de anticorpos monoclonais (AcMo) permitem classificar as LLA conforme seus antígenos celulares. Em 1995, o grupo europeu EGIL propôs que a classificação imunofenotípica para as LLAs fosse padronizada de acordo com o perfil de expressão antigênico associado a linhagens e estágios de diferenciação celulares utilizados nos painéis de AcMo (BENE, *et al.* 1995).

As expressões celulares podem prever algumas alterações moleculares e associadas à resposta terapêutica, doença residual mínima (DRM) e estratificação de risco do paciente (BENE, *et al.* 1995). A imunofenotipagem por citometria de fluxo tem papel fundamental no diagnóstico da LLA-cpB, uma vez que permite identificar o subclones celulares a partir do nível de expressão de alguns marcadores importantes no compartimento medular, permitindo também diferenciar os blastos leucêmicos de hematogônias, como observado na figura 1.1. sendo de grande relevância para o diagnóstico. Este perfil com distinção de fenótipos celulares anormais permite o seguimento do paciente para avaliação da resposta terapêutica (VAN LOCHEM, 2004; BENE, 2005; ALVES, *et al.* 2012; SEDEK, 2014).

As hematogônias são células linfoides B normais em desenvolvimento e podem ser classificadas como H1, H2 e H3. As hematogônias do tipo H1 expressam um nível elevado de TdT, CD34, CD38 e também um nível muito elevado de CD10. Os níveis de expressão de CD45 e CD22 são baixos. Na fase H2 a expressão de TdT e CD34 se extingue e a expressão CD10 e CD22 diminui ligeiramente e os níveis de CD20, CD45 e CD38 aumentam. Já na fase H3 há um aumento adicional da expressão de CD20, CD45 e CD38, enquanto que a expressão CD10 diminui. Nas células B maduras, o antígeno CD10 desaparece, o CD38 diminui consideravelmente, o CD20 diminui ligeiramente, enquanto o CD22 aumenta. (LUCIO, *et al.* 2001; VAN LOCHEM, 2004; SEDEK, *et al.* 2014). Estes perfis de expressões podem ser visualizados também na figura 1.1



-  Células Pré-B-I (H1)
-  Células Pré-B-II (H2)
-  Células B imaturas (H3)
-  Células B maduras

Figura 1.1. Desenvolvimento de células B normais na MO. Estágios de diferenciação de hematogônias (H1/H2/H3) e células B maduras podem ser identificadas pelos principais marcadores na imunofenotipagem. Os campos cinzentos marcados com letras A-C representam espaços onde normalmente estas células (normais) não estariam localizadas, sendo possível identificar os blastos leucêmicos nesses campos. As setas mostram a direção da via de maturação nas células normais. (Adaptado Sedek, 2014)

De acordo com a linhagem celular, B ou T, aproximadamente 20% dos casos são de LLA de linhagem T, 75% de precursores de células B e 5% células B maduras (BENE, *et al.* 1995; KEBRIA EI, 2003; BELSON, 2007).

A LLA-cpB é uma desordem hematológica clonal que se origina a partir de uma única célula linfocitária e é caracterizada pelo acúmulo de blastos de fenótipo B que então suprimem a hematopoiese normal (PUI, 1998).

A LLA-cpB é classificada em quatro grupos de acordo com a sequência de maturação e diferenciação das células B e segundo a proposta de classificação pelo Grupo Europeu para a caracterização imunofenotípica das leucemias agudas (EGIL) (BENE, 2005, PUI, 2008), como mostrado na tabela 1.2. O diagnóstico inclui a classificação morfológica e a classificação imunofenotípica, de acordo com a recomendação recente publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e a determinação da doença residual mínima (DRM) que é um marcador prognóstico altamente informativo (HARRISON, *et al.* 2010). Em LLA-cpB a translocação tem sido incorporado na estratificação de risco para escolha do tratamento (SCHULTZ, *et al.* 2009; IZRAELI, 2010;) Recentemente, estudos tem mostrado importante avanço nas investigações genéticas, moleculares, cariótipos e anormalidades fenótipos prevalente na LLA-cpB (MOORMAN, 2016).

Baseado na reatividade com antígenos presentes na superfície ou no citoplasma de células leucêmicas, a LLA-cpB é classificada pela expressão nos blastos leucêmicos de antígenos de elevada especificidade para a linhagem B e dessa forma podem ser divididas em quatro subtipos de acordo com o estágio de diferenciação e de acordo com a classificação EGIL: LLA-pró B (B-I), LLA-B comum (B-II), LLA-pré B (B-III), LLA-B madura (B-IV) (BENE, 2005; PUI, 2008; COBALEDA, 2009; YU, *et al.* 2013), como visualizado no quadro 1.1.

A LLA-pró B ou de acordo com a classificação EGIL B-I, é caracterizada pela ausência da expressão do marcador CD10 e da IgM intracitoplasmática. Presença do marcador de imaturidade CD34, além da marcação de CD19 e CD79a intracitoplasmático. Este subtipo representa cerca de 5% dos casos de LLA e é mais frequente em pacientes ≤ 12 meses, também está associado com alta incidência do rearranjo do KMT2A (*r-KMT2A*) o qual é um biomarcador de pior prognóstico (BENE, *et al.* 1999; SALES, 2013; EMERENCIANO, *et al.* 2013).

A LLA-B comum ou B-II é caracterizada pela expressão do antígeno CD10 pelas células B anômalas, além da expressão de CD19, CD79a intracitoplasmático, CD22, TdT nuclear e o antígeno CD45 pode apresentar intensidade diminuída. Este subtipo é o mais frequente, representando a maioria dos casos de LLA-cpB, cerca de 60%. Além disso, é recorrente a fusão gênica *ETV6-RUNX1* e a alta hiperdiploidia, que em muitos casos estão associados a um melhor prognóstico, chegando a 85% dos casos alcançando um longo tempo de remissão (BENE, 2005; YU, *et al.* 2013; SALES, 2013).

A LLA pré-B ou B-III, representa aproximadamente 25% dos casos de LLA-cpB. Possui um perfil imunofenotípico com elevada intensidade do CD10 e do antígeno IgM intracitoplasmático, além disso, expressa os antígenos CD19, CD79a intracitoplasmático e CD22 (BENE, *et al.* 1999; BENE, 2005; SALES, 2013).

A LLA-B madura ou B-IV representa 2 a 4% dos casos de LLA-cpB, é caracterizada pela expressão de cadeias leves de imunoglobulina na superfície da membrana (mIgM), ausência do marcador CD34 e presença ou ausência do antígeno CD10. Além disso, é descrita pela classificação da OMS como linfoma de Burkitt com translocações cromossômicas associadas a este. Apresenta prognóstico desfavorável, havendo elevada incidência de envolvimento no SNC, resposta deficiente ao tratamento e menor sobrevida (ALVES, *et al.* 2012; KEBRIAELI, 2003).

Além da identificação do subtipo celular do clone leucêmico predominante e presença de subclones celulares secundários, o algoritmo de testes necessários para caracterização das leucemias agudas se completa com a identificação de alterações genéticas somáticas associadas aos diversos subtipos de leucemias.

Quadro 1.1: Marcadores específicos que estabelece a classificação EGIL(1995)/OMS(2008) dos subtipos celulares nas LLA-cpB

Classificação EGIL	cyTdT	CD34	cyCD79a	CD19	CD10	cyIgM	sIgM	cyCD22
Pró-B (B-I)	+	+	+	+	-	-	-	+
B-comum (B-II)	+	-/+	+	+	+	-	-	+
Pré-B (B-III)	+	-/+	+	+	+	+	-	+
B-madura (B-IV)	+	-	+	+	-/+	-/+	+	+

Abreviações: Cy, citoplasma; s-superfície; os círculos indicam os eventos determinantes de cada estágio (Adaptado, Bene *et al.*, 2005)

1.3. Marcadores celulares e moleculares em leucemias linfoblásticas de células precursoras B que definem prognóstico

A categoria de risco de um paciente pode ser modificada por fatores prognósticos diferentes da idade e leucometria. As propriedades biológicas específicas das células blásticas leucêmicas (índice de DNA entre outras anormalidades genéticas) e a resposta precoce à terapia fornecem informações prognósticas adicionais que são incorporadas na avaliação global preditiva do risco de falha do tratamento (SMITH, *et al.* 1996). O prognóstico favorável associado às células blásticas altamente hiperdiploides (índice de DNA $\geq 1,16$ determinado por citometria de fluxo) foi visto pelo grupo alemão Berlim-Frankfurt-Munique (BFM), protocolos de maior notoriedade internacional que utiliza a estratificação dos pacientes conforme grupos de risco para ocorrência de recidiva. Independentemente da idade e leucometria, o paciente com alta hiperdiploidia no diagnóstico possui bom prognóstico (SMITH, 1996). Outros estudos observaram que as alterações cromossômicas primárias são marcadores genéticos de prognóstico independente, sendo assim a $t(12;21)/ETV6-RUNX1$ além da alta hiperdiploidia são caracterizados como bom prognóstico e inversamente o rearranjo do gene *KMT2A* como indicador independente de pior prognóstico (MOORMAN, *et al.* 2010; EMERENCIANO, *et al.* 2013; MOORMAN, 2016).

Aproximadamente 75% dos casos de LLA-cpB possuem aneuploidia ou rearranjos cromossômicos recorrentes. O rearranjo mais comum é a $t(12;21)(p13;q22)$ que dá origem a fusão gênica *ETV6-RUNX1* (SHURTLEFF, 1995). Esta fusão é detectada por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) ou por reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa

(RT-PCR), pois se trata de alteração cromossômica críptica. Ambos os genes *ETV6* e *RUNX1* são necessários para a hematopoiese normal, a fusão *ETV6-RUNX1* unicamente não é capaz de promover a leucemogênese sendo necessário a ocorrência de eventos secundários para conduzir a leucemia. Tem sido observado que há uma forte correlação entre as anormalidades cromossômicas primárias e as aberrações secundárias. Nos casos com a fusão *ETV6-RUNX1*, foram identificadas mutações ou deleções em genes como *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *TBLXR1*. Além disso, o perfil imunofenotípico demonstrou que a ausência ou a baixa expressão do marcador CD9 é um forte preditor da fusão *ETV6-RUNX1*. Esta fusão está associada com bom prognóstico apesar de muitos trabalhos estudarem relevância dessas anormalidades secundárias (BOROWITZ, *et al.* 1998; BENE, *et al.* 1999; WIEMELS, 1999; MULLIGHAN, 2012; BLUNCK, 2014; MOORMAN, 2016).

A alta hiperdiploidia a qual é caracterizada por apresentar entre 51-65 cromossomos, o que corresponde $ID \geq 1,16$ é reconhecida por muitos estudos como um biomarcador de bom prognóstico, possuindo uma excelente chance de cura em relação a outros pacientes com alterações já mencionadas de alto risco, portanto a identificação do fator de risco dentro deste subgrupo genético é prioritária. Frequentemente, o ganho cromossômico mais comum se caracteriza pelas adições dos cromossomos X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 e 21. A frequência da alta hiperdiploidia é de aproximadamente 35% dos casos de LLA-cpB. Controversamente ao bom prognóstico da alta hiperdiploidia, a *near*-haploidia (<30 cromossomos), a hipodiploidia (30 - 39 cromossomos) e *near*-triploidia (60 - 78 cromossomos) possuem um pior prognóstico estão classificados no subgrupo de alto risco. Ainda há um debate sobre o risco relacionado sobre o limite em termos de número de cromossomos, como nos casos entre 40 - 45 cromossomos ou índice de DNA entre 1,06 e 1,15, no qual é considerada zona cinza ou *near*-diploide. (HARRISON, *et al.* 2001; MOORMAN, *et al.* 2010; 2011; 2012; 2016; MULLIGHAN, 2012).

É possível utilizar metodologias diferentes para identificar anormalidades cromossômicas numéricas, como a citometria de fluxo, o cariótipo por bandeamento-G e hibridização genômica comparativa de alta resolução. Utilizando a citometria de fluxo com base na medição da marcação específica de DNA de células na fase G0/G1, é possível estabelecer parâmetro capazes de determinar os subtipos de alta diploidia (hiperdiploide), diploide (sem adição cromossômica) e hipodiploidia. O uso dessa metodologia é rápida dando uma estimativa do conteúdo do DNA sem a necessidade de estabelecimento da cultura de células. Dessa forma, foi mostrado que o uso da citometria para mensurar o índice DNA detecta com sucesso, não só clones majoritários como também os minoritários. O

bandeamento G por conta do crescimento da cultura de células pode selecionar erroneamente subclones. Sendo assim, o uso do índice de DNA por citometria de fluxo pode ser mais eficaz por identificar clones minoritários não detectáveis pelo bandeamento G e pela hibridação genômica comparativa. No entanto ainda permanece um desafio de determinar o impacto de prognósticos desses subclones (FRIEDMANN, 2000; NYGAARD, *et al.* 2006; RACHIERU-SOURISSEAU, *et al.* 2010).

As anormalidades cromossômicas, como as alterações *KMT2A*, *t(9;22)/BCR-ABL1*, *t(17;19)/TCF3-HLF*, são reconhecidamente marcadores de prognóstico de alto risco independentemente da idade do paciente (PIETERS, 2010; HARRISON, 2011; MULLIGHAN, 2012; MOORMAN, 2012a; 2016). O gene *KMT2A* que está localizado na região 11q23, geralmente sofre translocação com grandes quantidades de parceiros, no entanto, em 85% dos casos essas translocações com os parceiros *AFF1 (AF4)*, *MLLT1 (ENL)*, *MLLT4 (AF6)*, *MLLT3 (AF9)* e *MLL10 (AF10)*. Todas as translocações do *KMT2A*, bem como *BCR-ABL1* e *TCF3-HLF* são facilmente detectadas por citogenética, hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) ou por RT-PCR. A translocação *KMT2A* é altamente prevalente em crianças menores de 1 ano (80% dos pacientes nesta faixa de idade). Além disso, como a identificação dessa translocação é determinante para a estratificação da terapia, o uso da citometria de fluxo é amplamente utilizado para sugerir a presença desses rearranjos, já que foi demonstrada a expressão positiva do marcador NG2 em superfície celular, este marcador tem sido usado para prever a presença do *KMT2A-r*. Este marcador foi incorporado nos painéis de diagnóstico principalmente para lactentes. (EMERENCIANO, *et al.* 2011; MOORMAN, 2012a; MEYER, *et al.* 2013). No entanto é essencial a confirmação de *KMT2A-r* através de técnicas de citogenética molecular.

Cerca de 3% das LLA-cpB possuem a translocação *t(1;19)(q23;p13)*, o que em mais de 95% dos casos resulta na fusão de *TCF3-PBX1* (também conhecido como *E2A-PBX1*). Geralmente essa fusão é observada em casos com um imunofenótipo de pré-B e pode ser diagnosticada por FISH ou RT-PCR. Possui associação com a recaída no SNC e um desfecho ruim após a primeira recaída. Essa fusão está associada a um prognóstico ruim com doses convencionais de quimioterapia, porém, a recente intensificação da terapia demonstrou uma melhora na sobrevida desses pacientes (PUI, 2008; MOORMAN, *et al.* 2010; 2016). O marcador preditivo desta alteração através de citometria de fluxo é a presença da cadeia IgM intra-citoplasmático.

A LLA-cpB com a presença da translocação t(9;22)(q34;q11), que resulta no gene de fusão *BCR-ABL1*, foi considerada como sendo de altíssimo risco até recentemente. Com o advento da terapia com inibidores tirosina-quinase este grupo foi reclassificado com alto risco/ dependente do tratamento. A presença de *BCR-ABL1* está associada à idade mais avançada, maior contagem de leucócitos e leucemia mais frequente no SNC ao diagnóstico. A proteína híbrida *BCR-ABL1* é uma tirosina quinase constitutivamente ativa que sucessivamente ativa múltiplas vias de sinalização, aumenta a proliferação celular e desregula a diferenciação e adesão. Mais recentemente foi observado que pacientes que possuem o cromossomo *Philadelphia* (Ph), apresentam melhoria após tratamento com inibidor de tirosina quinase o que resulta na ativação do fator de transcrição BCL6, que pode influenciar diretamente à responsividade ao tratamento com esses agentes. Sendo assim, a fusão *BCR-ABL1* é um biomarcador preditivo para terapia dirigida por imatinib ou dasatinib (dois importantes inibidores de tirosina quinase) que impossibilitam diretamente o efeito leucemogênico da oncoproteína *BCR-ABL1* gerando resultados significativamente superior nestes pacientes (CHAPIRO, *et al.* 2010; MULLIGHAN, 2012; FIELDING, *et al.* 2014; MOORMAN, 2016). Os resultados de sobrevida atualmente atingem patamares de 75% de sobrevida livre de doença em 4 anos de seguimento (BIONDI, A.; CAZZANIGA, G., 2013).

Nos últimos anos, a amplificação intra cromossômica do cromossomo 21 (iAMP21) tornou-se desafio para comunidade científica por esta associado a recaídas precoces. Ocorre em 2% dos casos e foi originalmente diagnosticada utilizando a técnica do FISH, como um ganho de pelo menos três cópias do gene *RUNX* localizado em 21q22.12. Pacientes tratados como risco padrão apresentam uma taxa de recaída muito alta (>80%), mas que esta é significativamente reduzida (<20%) quando os pacientes são tratados intensivamente com UKALL2003 (regime C). O tratamento correto para este marcador e para tantos outros podem diminuir o risco de recidiva, por isso a necessidade de se identificar rapidamente ao diagnóstico esses biomarcadores (ROBINSON, *et al.* 2007; HARRISON, *et al.* 2010; MOORMAN, *et al.* 2010; 2016).

Atualmente, com mais de 70% dos pacientes com LLA-cpB apresentam uma anormalidade genética, os resultados de identificação das principais anomalias citogenéticas recorrentes foram incorporadas nas classificações de riscos conforme mostra a Tabela 1.2.

No entanto, aproximadamente 30% dos pacientes sem uma dessas anormalidades são categorizadas como *B-others*. Desvendar o panorama genético desse subgrupo tem sido o foco

principal de esforços de pesquisa nos últimos anos, afim de definir e avaliar possíveis marcadores dentro deste grupo.

Tabela 1.1: Variáveis importantes para estratificação de risco em LLA-cpB

	Baixo Risco (NCI)		Alto Risco (NCI)		LLA - Ph ⁺	Lactentes
Idade (anos)	≥ 1 - < 9,9		≥ 10 - 18		V*	≤ 12 meses
Leucometria	< 50 x 10 ³		≥ 50 x 10 ³		V	≥ 50.000* ^v
SNC (-3)	não		não		- ^v	- ^v
Sub-grupos Citogenéticos	Hiperdiploidia; <i>ETV6 - RUNX1</i>		Hipoploidia; Tetra Hiperdiploidia, <i>AFF1-KMT2A, BCR-ABL1</i>		<i>BCR-ABL1</i>	<i>r-KMT2A</i>
DRM - Sub-grupos	BRV	BRi	AR	ARV	Dois grupos são iguais	
					ARV	ARV
D8 morfologia (SP)	< 1000	> 1000	< 1000	≥ 1000	< 1000	≥ 1000
D15 (MO - CF= 0,1%)	M ₁ < 0,01	M ₁ /M ₂ ≥ 0,01 < 10	M ₁ /M ₂ < 10 - > 01	≥ 10	> 0,1 - < 10	≥ 10
D35	< 0,1	≥ 0,1 < 10				

Abreviações: BRV= baixo risco verdadeiro; BRi=intermediário; NCI= *National Cancer Institut*; AR= Alto risco verdadeiro; v*, variável verdadeira independente. M1 aspirado de medula óssea; Comunicação pessoal: encontro internacional BFM 2014

1.4. Desafio de identificação de marcadores fenótipos na era genômica

As correlações entre imunofenótipo-genótipo foram bem estabelecidos através dos amplos painéis de anticorpos utilizados na caracterização celular das leucemias de modo geral. Talvez um marco mais impactante tenha sido o trabalho do Hrusak que demonstrou as diferenças de expressões antigênicas celulares fortemente associadas aos principais subtipos citogenéticos de LLA-cpB (HRUSAK, 2002).

A predição de algumas alterações pela expressão de determinados marcadores, como por exemplo o CD25, também conhecido como receptor α de interleucina 2 (IL2R α) é expresso em diferentes malignidades linfoides e vem sendo incluído em casos de LLA-cpB. Foi visto que a expressão desse marcador foi significativamente mais alta em casos de *BCR-ABL1* positivos sugerindo que o CD25 poderia ser um possível marcador substituto para identificação da presença dessa alteração através de técnicas citogenética-moleculares (OWAIDAH, *et al.* 2008).

Outra molécula bastante estudada é o CD66c, também chamado de CEACAM6, antígeno KOR-SA3544 e NCA 90/50 é expresso apenas em granulócitos e seus precursores na hematopoese normal. É um marcador mielóide, porém é observada uma expressão aberrante em LLA-cpB. Em um estudo foi visto que todos os casos *BCR-ABL1* positivos foram também positivos para a marcação do CD66c e CD25 com sensibilidade de 100% e especificidade de 87% (OWAIDAH, *et al.* 2008).

Foi observado um número imenso de micro deleções que afetam os genes nas principais vias, incluindo a diferenciação linfóide, o ciclo celular e a proliferação. Muitos estudos estão avaliando o papel das alterações no número de cópias (CNA) como biomarcadores de prognóstico, estas são alterações secundárias, subclonais e podem ser adquiridas, perdidas ou enriquecidas entre o diagnóstico e a recaída. Além disso, esses estudos também dão foco ao perfil de expressão gênica, o qual tem sido usado para definir subgrupos citogenéticos e ao mesmo tempo identificar novos subgrupos de pacientes (MULLIGHAN, *et al.* 2007; MOORMAN, 2016).

As deleções de *IKZF1* (*IKAROS Family zinc finger 1*) ocorrem em cerca de 15% dos pacientes de LLA-cpB, mas são mais prevalentes entre pacientes com *BCR-ABL1* ocorrendo em mais de 50% desse subgrupo (MULLIGHAN, *et al.* 2008; VAN DER VEER, *et al.* 2014; MOORMAN, 2016). A deleção de *IKZF1* tem sido relacionada a fatores de pior prognóstico como idade avançada, alta leucometria e DRM persistente e pacientes com Síndrome de Down (SD) (BUITENKAMP, *et al.* 2012; SCHWAB, *et al.* 2013;). Inicialmente foi sugerido que pacientes com deleção de *IKZF1* tivessem um prognóstico ruim, entretanto, estudos mais recentes mostraram que as deleções envolvendo esse gene eram de prognóstico desfavorável entre pacientes de alto risco, ou seja, pacientes com idade superior a 10 anos e alta leucometria de acordo com o NCI. Além disso, estudos descobriram que a presença da deleção de *IKZF1* não anula o prognóstico associado a outras anormalidades genéticas que possuem baixo risco, como a fusão *ETV6-RUNX1* por exemplo (MULLIGHAN, *et al.* 2009a; ENSHAEL, *et al.* 2013; MOORMAN, *et al.* 2013). No entanto, no contexto de *BCR-ABL1*, parece que as deleções de *IKZF1* possuem um prognóstico ruim mesmo quando esses pacientes são tratados com regimes contendo imatinib (VAN DER VEER, *et al.* 2014). Portanto, é provável que anormalidades secundárias também tenham um resultado desfavorável secundário, em vez de ser um importante biomarcador prognóstico independente.

Outra anormalidade secundária foi observada em estudos recentes dentro do subgrupo das *B-others*, caracterizada por uma deleção monoalélica do gene *ERG*. A frequência é 10-15% dentre as *B-others*. Estes pacientes têm um resultado excelente de mais de 90% de sobrevida em cinco anos apesar de terem uma incidência muito elevada de deleções de *IKZF1* (cerca de 40%) (HARVEY, *et al.* 2010a; CLAPPIER, *et al.* 2014).

Entre todas as anormalidades presentes em LLA-cpB, possível visualizar a frequências das mesmas na figura 1.2, a superexpressão e os rearranjos envolvendo o gene *CRLF2* ocorrem em até 50% dos casos de *BCR-ABL1 like* e cerca de 6% dos pacientes de LLA-cpB, assim a definição de alterações de ativação de quinase neste subgrupo de *BCR-ABL1 like* é importante para identificação e tratamentos desses pacientes (HARVEY, *et al.* 2010b; PUI, *et al.* 2011; MULLIGHAN, 2012).

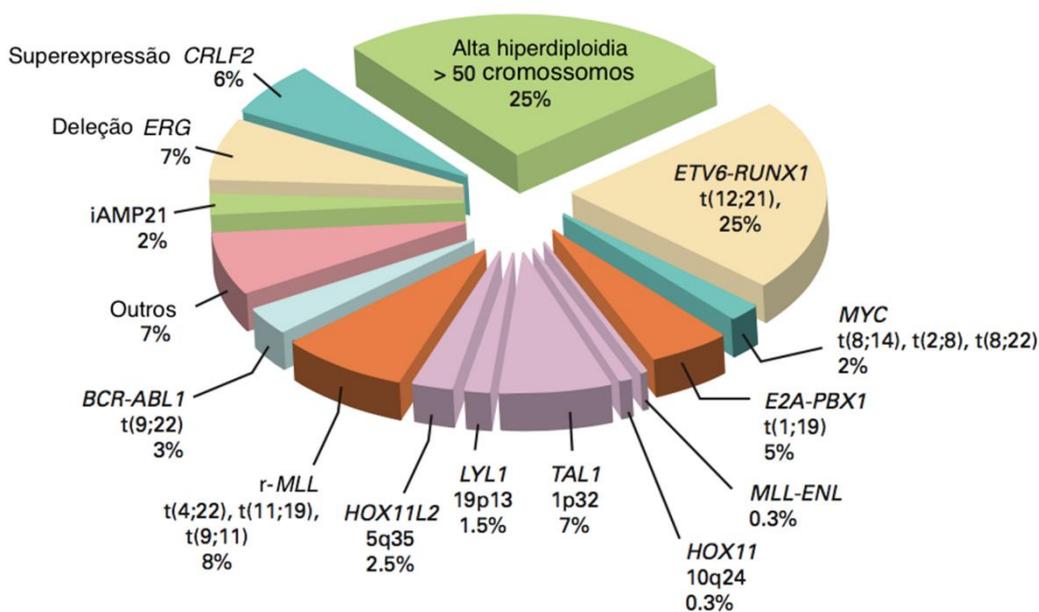


Figura 1.2. Frequência estimada dos genótipos específicos em LLA. Anormalidades genéticas em LLA-cpB com exceção da cor lilás que representam as alterações específicas presentes no grupo de LLA-T. A superexpressão do *CRLF2* ocorre em 6% de todos os casos de LLA-cpB. (Adaptado Pui, *et al.* 2011)

1.5. Superexpressão *CRLF2*

Dentre as novas anormalidades identificadas em LLA-cpB, foi descrita uma expressão aumentada do gene *CRLF2* sem a presença de alterações genéticas mais recorrentes (este subgrupo denominado B-*others*, aqui será denominado a partir deste ponto como LLA-cpB negativo) e somando a isto tem sido observado ausência dessa expressão nos outros grupos com alterações genéticas mais frequentes (RUSSELL, *et al.* 2009; YODA, *et al.* 2010).

O gene *CRLF2* está localizado na região pseudoautosômica (PAR1) dos cromossomos sexuais Xp22.3 / Yp11.3. O *CRLF2* ou também chamado de *thymic stromal lymphopoietin receptor* (TSLPR), é membro da superfamília do receptor de hematopoietina, forma um receptor heterodimérico com a cadeia alfa do receptor de Interleucina 7 (IL-7R α) ou CD127, para a citocina TSLP. Na presença do ligante TSLP há ativação da JAK1 e JAK2 e STAT 5 que está envolvido na ativação de células dendríticas, estimulando respostas inflamatórias de TH2 (Figura 1.3) (MULLIGHAN, *et al.* 2009b; RUSSELL, *et al.* 2009; COLLINS-UNDERWOOD, 2010; SHOCHAT, *et al.* 2011). Citocinas, incluindo IL7 e TSLP são importantes reguladores de desenvolvimento linfóide normal e, portanto, pode influenciar a proliferação e /ou sobrevivência de células de LLA (SIMS, *et al.* 2000; LEONARD, 2001; MILLER, *et al.* 2002).

Recentemente a mutação no IL-7R (ou CD127) tem sido identificado tanto em LLA-cpB, como em LLA-T, incluindo casos de alterações/superexpressão envolvendo o *CRLF2* (SHOCHAT, *et al.* 2011; ZENATTI, *et al.* 2011). A IL-7 é uma proteína reguladora imunitária pleiotrópica e a expressão de IL7-R α é fortemente regulada durante o desenvolvimento linfóide (CORCORAN, *et al.* 1996; TAL, *et al.* 2014). É expressa em todas as fases do desenvolvimento das células T, com exceção de células T ativadas (TAL, *et al.* 2014). O IL-7R heterodimeriza quer com IL-2R γ para formar um receptor para IL-7 ou com *CRLF2* no receptor para TSLP (NOGUCHI, *et al.* 1993; LIU, 2007). A transdução de sinal através tanto do complexo IL-7R como do *CRLF2* resulta na ativação de STAT5 e subsequente proliferação celular (NOSAKA, *et al.* 1999; SATO, *et al.* 2001; ISAKSEN, *et al.* 2002).

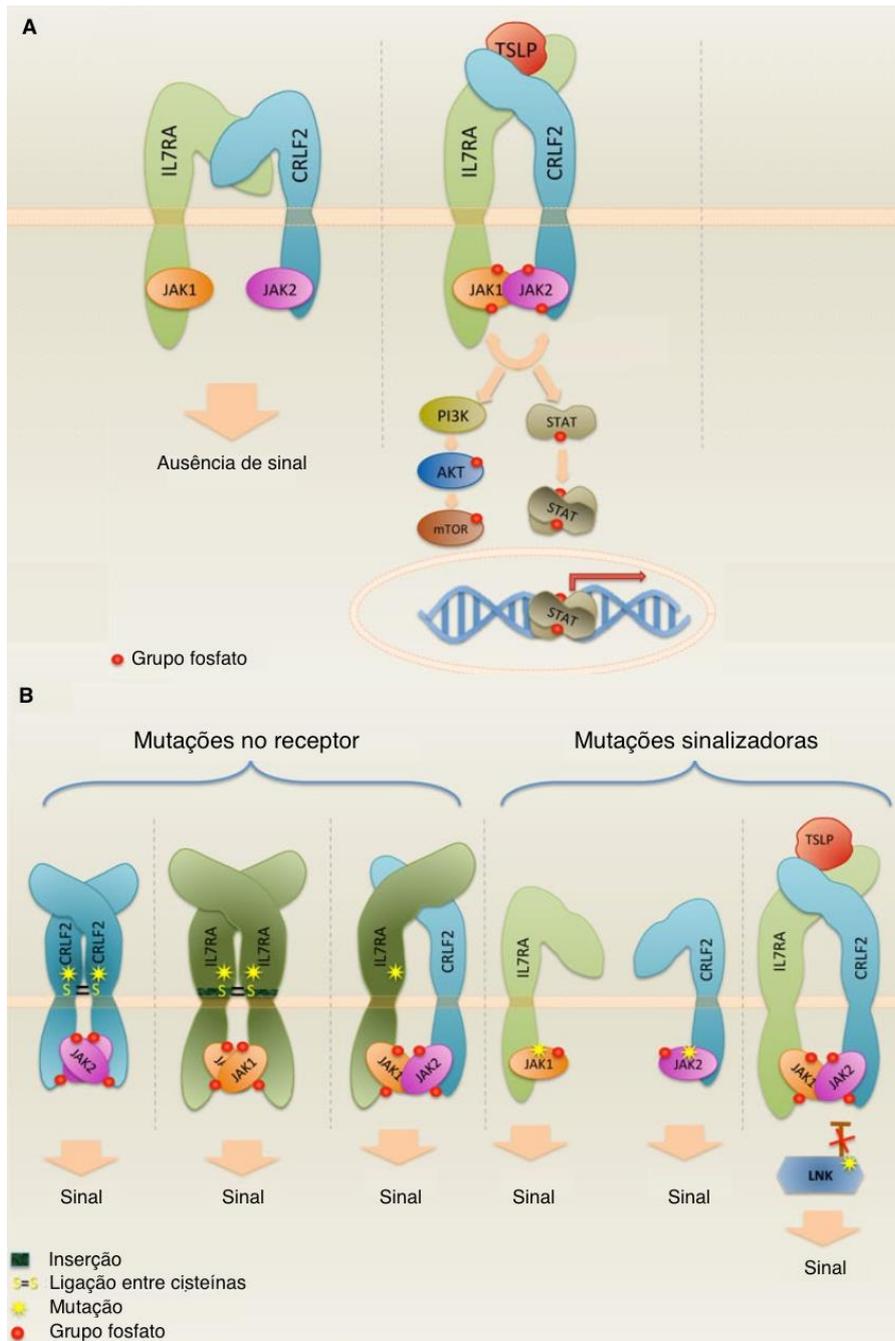


Figura 1.3. Vias de sinalizações e aberrações em IL7-R α e CRLF2. (A) O ligante TSLP induz a dimerização do receptor CRLF2 com IL-7R α . (B) Mutações que introduzem cisteína no domínio transmembranar foram encontradas em IL7RA e CRLF2. Estas mutações permitem a homodimerização de IL7RA ou CRLF2 resultando também em sinalização constitutiva (adaptado Tal, 2014).

Os rearranjos envolvendo o *CRLF2* resultam na expressão gênica aumentada do gene por mecanismos ainda desconhecidos, como translocação cromossômica críptica, que justapõe *CRLF2* ao *locus enhancer* da cadeia pesada da imunoglobulina (IGH) ocasionando em *IGH@-CRLF2* ou uma deleção intersticial de parte da região PAR1 resultando em *P2RY8-CRLF2* (RUSSELL, *et al.* 2009; CARIO, *et al.* 2010; YODA, *et al.* 2010; MOORMAN, *et al.* 2012b). A deleção envolvendo *P2RY8* são geralmente mais comuns que a translocação *IGH* (CARIO, *et al.* 2010; DYER, *et al.* 2010; HERTBERG, *et al.* 2010; ENSOR, *et al.* 2011). No entanto, pacientes que não possuem estas alterações podem mesmo assim apresentar a expressão aberrante do gene *CRLF2*. Sugere-se que na maioria dos casos de LLA-cpB com a superexpressão gênica do *CRLF2* ocorre mutações de ganho de função em um componente do complexo de sinalização TSLP, como mutação em *JAK2* e menos comum em *JAK1* e a substituição da cisteína em *IL-7R α* que promove a homodimerização ou a heterodimerização constitutiva com *CRLF2*. Outros mecanismos que conduzem a uma expressão elevada de *CRLF2* são a presença de cópias adicionais do *locus CRLF2* ou uma rara mutação pontual no códon 232 (F232C) (RUSSELL, *et al.* 2009; YODA, *et al.* 2010; CARIO, *et al.* 2010; CHAPIRO, *et al.* 2010; ENSOR, *et al.* 2011; SCHOCHAT, *et al.* 2011; MOORMAN, 2012a).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Conforme a revisão de literatura, a LLA-cpB é uma doença heterogênea e em 70% dos casos pode ser caracterizada por apresentar alterações citogenéticas-genômicas recorrentes com prognóstico bem definidos. No entanto ainda há um subgrupo de aproximadamente 30% dos casos que se destaca por não apresentar nenhuma das alterações capazes de justificar medidas para estratificação de risco denominadas como LLA-cpB ^{negativo} e temporariamente incluídas na categoria de risco intermediário. Para este subgrupo, a tecnologia molecular, como micro-arranjos e sequenciamento de nova geração (NGS) demonstraram que alguns destes pacientes têm um perfil de expressão semelhante a LLA-cpB com BCR-ABL1, denominado de *BCR-ABL1-like*. Tem sido observado que até 50% desses pacientes *BCR-ABL1-like* possuem alterações/expressão aumentada do gene *CRLF2*.

O *CRLF2* foi descrito pela primeira vez por RUSSEL, *et al*, 2009, e por ainda ter sido pouco explorado, existe algumas inconsistências de resultados em relação ao seu valor prognóstico. Alguns estudos sugerem que a expressão aumentada de *CRLF2* é um marcador de prognóstico desfavorável enquanto outros sugerem que o *CRLF2* não é um marcador relevante no contexto de estratificação de risco, como em relação a proporção desses pacientes que exibem essa alta expressão que pode variar de 4,7-62% (CARIO, *et al*. 2010; HARVEY, *et al*. 2010b; ENSOR, *et al*. 2011; ATTARBASCHI, *et al*. 2012; BUITENKAMP, *et al*. 2012; VAN DER VEER, *et al*. 2013). Muitos trabalhos identificaram que mais de 50% de pacientes com SD possuem expressão gênica aumentada do *CRLF2* ou rearranjos envolvendo este gene (MULLIGHAN, *et al*. 2009b; BUITENKAMP, *et al*. 2012b). Esses pacientes sofrem mais com os efeitos de toxicidade ao tratamento, assim é importante estudar melhor esses pacientes já que essa expressão aumentada do *CRLF2* também tem sido estudada como um possível marcador para alvo terapêutico com tirosina quinase. Sugere-se que a expressão aumentada do *CRLF2* ocorre em pacientes sem nenhuma das alterações mais frequentes frequentemente vistas em LLA-cpB, tais como *ETV6-RUNX1*, *r-KMT2A*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*. (RUSSELL, *et al*. 2009; YODA, *et al*. 2010).

A expressão de *CRLF2* pode ser aumentada por mutações de ganho de função no próprio *CRLF2* (CHAPIRO, *et al*. 2010), bem como no *IL7-R α* que forma um heterodímero com o *CRLF2*. (SHOCHAT, *et al*. 2011). Para compreender melhor os marcadores envolvidos na alta expressão do *CRLF2*, optamos por verificar também a expressão celular do CD127, sendo o receptor envolvido juntamente com o *CRLF2* e ativando vias importantes, como JAK/STAT. Vários estudos utilizaram diferentes critérios de inclusão dos casos

analisados e técnicas, como o RT-qPCR ou citogenética molecular para detectar a expressão gênica, no entanto não há definições padronizadas entre estudos. Diante disso, a identificação e a associação da expressão gênica (pela técnica RT-qPCR) e celular é de grande importância já que CFM é uma metodologia bastante utilizado para identificação e classificação dos diferentes subtipos da LLA-cpB além de identificar a expressão celular de vários marcadores imunofenóticos que tem a capacidade de refletir ou prever as características genóticas dentro deste grupo de leucemia. O desafio, portanto, é propor um conjunto de testes de baixo custo e de fácil manuseio que sejam capazes de identificar com segurança entre LLA-cpB negativos aqueles pacientes com alta expressão celular em *CRLF2*.

A técnica CFM é uma ferramenta de extrema importância no diagnóstico de LLA, na identificação de DRM, na identificação de clones celulares secundários e na avaliação dos marcadores que são alvos terapêuticos. As detecções das alterações gênicas por microarranjos ou por NGS ainda são de alto custo, são testes que podem ser demorados quanto aos resultados, e podem ter resultados equivocados devido a escassez de material genômico adequados. Portanto, a otimização da CFM na identificação de expressão celular de alguns antígenos de membrana, correspondentes ao *status* gênico, é extremamente relevante.

Para melhor consolidar o uso de CFM, é necessário validar o modelo preditivo do *CRLF2* associado com diversas alterações genéticas, como *ETV6-RUNX1*, *KMT2A*, *E2A-PBX1*, *BCR-ABL1* incluindo alterações em ploidia (através de índice de DNA).

Apesar das altas taxas de cura em LLA-cpB ainda há um grupo de aproximadamente 20% desses pacientes que possuem falha ao tratamento e conseqüentemente recorrência de recaída. Além disso pacientes sobreviventes muitas vezes sofrem com graves toxicidades, principalmente pacientes com SD, sendo assim é necessário identificar importantes biomarcadores que podem servir de fatores de prognóstico e estratificar diferentes grupos de risco para o melhor tratamento (SCHRAPPE, *et al.* 2000; JIA, *et al.* 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Estabelecer um algoritmo de testes combinados imunofenotípicos e moleculares capazes de prever o *status* do CRLF2 em amostras de crianças com LLA-cpB.

3.2. Objetivos específicos

- Testar um painel de anticorpos monoclonais através de citometria de fluxo multiparamétrica, incluindo CD66c e CD127 e identificar os casos de LLA-cpB com expressão celular diferencial do CRLF2 na superfície celular;
- Avaliar o índice de DNA das amostras de LLA-cpB, correlacionar a expressão do CRLF2 e/ou as alterações genéticas mais frequentes associadas aos diferentes níveis de ploidia celular;
- Correlacionar a expressão do gene *CRLF2* com seus níveis de expressão proteica e diferentes perfis imunofenotípicos de células precursoras B.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho de estudo

Foram incluídas no estudo, as amostras com diagnóstico de LLA-cpB enviados para o Programa de pesquisa Hematologia-Oncologia Pediátrico (PHOP) na Coordenação de Pesquisas no Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, entre o período de 2014-2016, para complementação e confirmação diagnóstica imuno-molecular.

As instituições que colaboram com este estudo são na maioria dos casos procedentes da região Centro-Oeste - Goiás e Mato Grosso do Sul (42,2%), do Nordeste - Alagoas, Bahia, Paraíba e Pernambuco (32%), do Sudeste - Rio de Janeiro e São Paulo (17,2%) e da região Sul - Santa Catarina e Rio Grande do Sul (8,6%) conforme listado em anexo 9.1.

As amostras de MO e/ou SP para caracterização imunofenotípica-molecular foram submetidas inicialmente as análises de imunofenotipagem através da citometria de fluxo multiparamétrica conforme os protocolos já bem estabelecidos vigentes (BENE, 2005; IKOMA, 2014). Uma vez no laboratório do PHOP o processamento destas amostras foram direcionados para os principais testes moleculares. Estas amostras foram enviadas juntamente com as informações demográficas e clínicos de cada paciente, bem como os resultados da imunofenotipagem de laboratórios locais.

Todas as informações pessoais foram mantidas em sigilo e utilizadas apenas pelos investigadores envolvidos no estudo.

Uma demonstração esquemática com as etapas do estudo foi sumarizada no fluxograma da Figura 4.1. Concomitantemente os testes moleculares para a identificação das principais alterações moleculares em LLA-cpB foram feitos a partir do RT-PCR para avaliação qualitativa das mesmas e assim para a caracterização completa das amostras e dessa forma foram utilizados neste estudo para correlação com as expressões celulares do CRLF2.

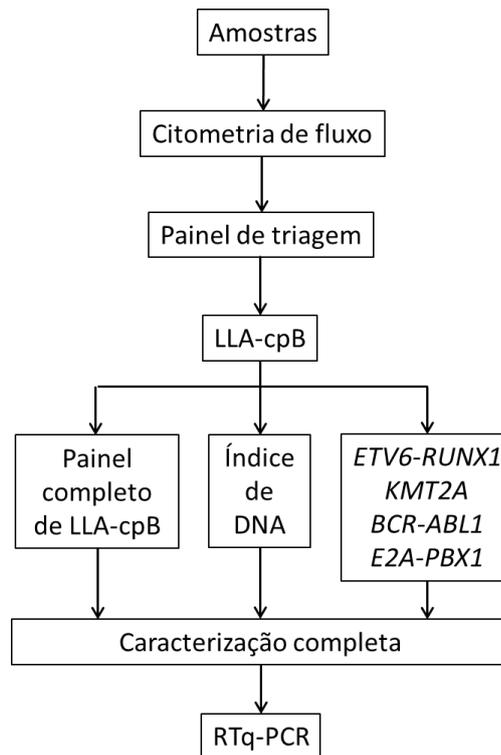


Figura 4.1. Fluxograma dos procedimentos laboratoriais realizados no estudo de acordo com os critérios de inclusão. Abreviações: RT-qPCR, PCR quantitativo em tempo real;

4.2. Casuística

Essas amostras são procedentes dos centros de tratamento oncológico situadas em cidades de 4 regiões brasileiras (nordeste, sudeste, centro-oeste e sul) e que colaboram com nosso grupo.

As variáveis relevantes para o estudo foram: idade ao diagnóstico; sexo; etnia; uso prévio de corticoides (ou tratamento quimioterápico); leucometria; percentual de blastos; presença ou não de síndrome genética e informações clínicas sobre recaída no qual foram também obtidas a partir do preenchimento de uma ficha de cadastro do paciente (anexo 9.2)

Critérios de inclusão: Foram incluídas amostras de MO e/ou SP de pacientes com idade inferior a 18 anos com diagnóstico de LLA-cpB; estar em conformidade com os procedimentos de coleta de amostra em tubo *vacutainer* com anticoagulante EDTA; amostras apresentando $\geq 20\%$ de blastos; Amostra de SD.

Critérios de exclusão: Casos previamente tratados com corticoide (> 3 dias) antes do diagnóstico. Pacientes em recaídas cujas amostras do diagnóstico que não foram enviadas ao

PHOP. Casos de leucemias com diagnósticos inconclusivos ou LLA-T, ou de origem mieloide.

4.3. Ética

Todas as Instituições que colaboram com nosso grupo recolheram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado pelos pais ou representantes legais da criança (anexo 9.4). Este trabalho faz parte de um estudo denominado “Estudos multi-institucional das leucemias infantis (EMILI): contribuição dos marcadores imuno-moleculares na distinção de seus subtipos e de fatores de riscos etiopatogênicos”. O projeto foi devidamente aprovado dentro da Plataforma Brasil pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do INCA e pela comissão nacional de ética em pesquisa (CONEP) no dia 25/01/2016. Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 33243214.7.0000.5274.

4.4. Métodos

4.4.1 Marcação imunofenotípica

Para caracterização imunofenotípica das leucemias agudas foram utilizados AcMo marcados com até 6 fluorocromos por tubo: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), complexo-piridina-clorofil-proteína cianina (PerCP-Cy5.5), ficoeritrina- cianina 7 (PE-Cy7), alofocianina (APC) e alofocianina hilite 7 (APC-H7). Os anticorpos utilizados foram adquiridos dos fabricantes Becton-Dickinson (BD) (Nova Jersey, EUA), Dako (Glostrup, Dinamarca) e Exbio (Vestec, República Checa). Os anticorpos CRLF2-APC (clone 1F11/TSLPR) e CD127-PE (clone HIL-7R-M21) foram utilizados da marca BD. A metodologia de marcação está descrita abaixo.

Para a marcação utilizando anticorpos de membrana foram utilizadas 50µL das amostras frescas de MO ou SP, incubadas por 20 minutos, com quantidade pré-estabelecida através da titulação de cada anticorpo (1µL e 2µL por teste para o CRLF2 e CD127 respectivamente), à temperatura ambiente (TA) e protegidos da luz. Em seguida, adicionou-se 2mL da solução de lise FACS *Lysing Solution*® (BD) diluída 1:10 em água Milli-Q e incubou-se por 10 minutos à TA. As células foram centrifugadas (*Jouan C422*, rotor fixo) a 1500 rotações por minuto (rpm) por 5 min, o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 2mL de solução tampão fosfato salino (PBS) 1X (Ph =7,4). As amostras foram centrifugadas novamente, o PBS descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 200µL de PBS. Como mostrado no fluxograma, foi

feito inicialmente o painel da triagem para identificar a presença de LLA-cpB e posteriormente foi feito o painel completo para caracterizar o subtipo dessa leucemia (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Painéis para caracterização das LLA-cpB no estudo

PAINEL DE TRIAGEM						
Tubo	FITC	PE	PerCP-CY.5.5	PE-CY7	APC	APC-H7
1	CONTROLE NEGATIVO					
2	cyMPO	cyCD79a + cyCD22	CD45	CD19	CD34	cyCD3
PAINEL COMPLETO						
Tubo	FITC	PE	PerCP-CY.5.5	PE-CY7	APC	APC-H7
1	CONTROLE NEGATIVO					
2	Nu TdT	CD20	CD45	CD19	CD10	CD38
3	CD9	CD22	CD45	CD19	CD34	-
4	-	cyIgM	CD45	CD19	CD10	-
5	CD58	CD66c	CD45	CD19	CD123	-
6	-	CD13 +CD33	CD45	CD19	CD34	-
7	CD10	CD127	CD45	CD19	CRLF2	-

Abreviações: MPO, Mieloperoxidase; Cy, citoplasmático; Nu, Nuclear; IgM, Imunoglobulina M.

Para a caracterização da LLA-cpB alguns AcMo intracitoplasmáticos são importantes, como a marcação do CD79a, MPO, CD22 e IgM, sendo com um painel completo com 21 AcMo conforme a tabela 4.2. Para a marcação intracitoplasmática foi utilizado o protocolo semelhante ao descrito anteriormente no entanto, na segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi mantido invertido em uma gaze para secar todo o volume residual. Posteriormente o *pellet* foi ressuscitado em 50µL de PBS/Tween20 0,5% para permeabilizar a membrana celular, e esta solução foi homogeneizada e incubada por 5 minutos. Em seguida, os anticorpos para antígenos intracelulares foram acrescentados em combinações de acordo com o fluorocromo conjugado, as amostras foram vortexadas e incubadas por mais 15 minutos. Para lavagem das células, foi acrescentado 2mL de Tween20 0,1%, centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* resuscitado em 200uL de PBS.

Tabela 4.2: Anticorpos monoclonais para caracterização das leucemias linfoblásticas de células precursoras B.

AcMo	Fluorocromo	Clone	Fabricante
MPO	FITC	5B8	BD
CD79a	PE	HM57	EXBIO
CD45	PerCP CY5.5	MEM-28	EXBIO
CD19	PE-Cy 7	4G7	EXBIO
CD34	APC	581	EXBIO
CD3	APC-H7	SK7	BD
CD20	PE	B-Ly1	DAKO
CD10	APC	MEM-78	EXBIO
CD38	APC-H7	HB7	BD
IgM	PE	G20-127	BD
CD66c	PE	B6.2/CD66	BD
CD58	FITC	1C3	BD
CD123	APC	7G3	BD
CD13	PE	WM-47	DAKO
CD33	PE	WM-54	DAKO
CD10	FITC	LT10	EXBIO
CD127	PE	HIL-7R-M21	BD
TSLP	APC	1F11/TSLPR	BD
TdT	FITC	HT-6	DAKO
CD22	PE	4KB128	DAKO
CD9	FITC	M-L13	BD

4.4.2. Processamento da amostra

Inicialmente de congelamento celular as amostras de MO e/ou SP foram depositadas em tubos falcon de 15mL onde acrescentou-se solução de lise de hemácias RBC na proporção três vezes o volume da amostra com incubação por 15 minutos, posterior centrifugação a 1500rpm por 5 minutos, descarte do sobrenadante e as células foram ressuspensas em até 5mL de solução de lise RBC. Novamente, a amostra foi centrifugada a 1500rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e ressuspendido em PBS + soro fetal bovino (SFB) 5% (SIGMA). A amostra foi centrifugada a 1500rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e ressuspendido em PBS + SFB 5% de acordo com o *pellet*.

Após essa fase, foi feita a contagem celular através do microscópio óptico, utilizando-se a câmara de Neubauer com células diluídas em azul de trypan 0,2% para avaliação de viabilidade celular. De acordo com contagem e com a viabilidade são separadas 10×10^6 células para ser colocado em Trizol para posteriormente avaliação molecular e o restante ressuspendido em solução de congelamento gelada SFB/Dimetilsufóxido (DMSO) 10%. Essas amostras foram mantidas no freezer de -80°C, para isto foi utilizado o Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific) para o congelamento gradativo das amostras no criotubo.

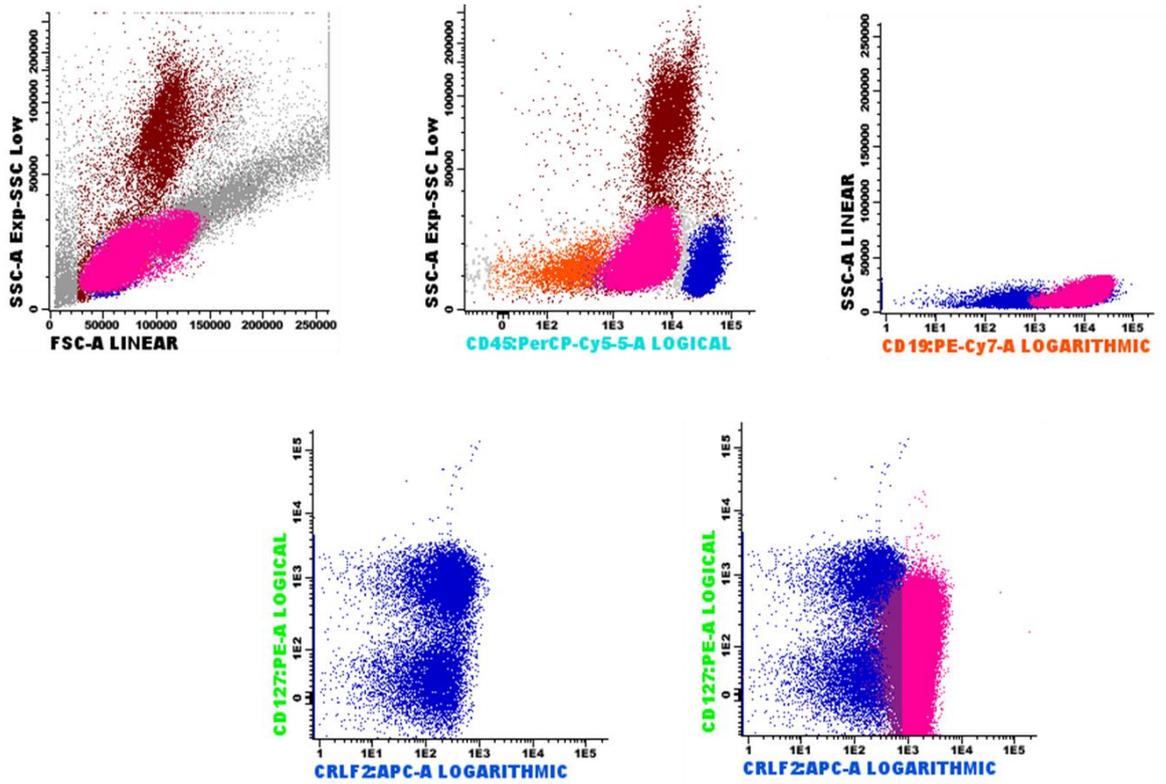
4.4.3. Descongelamento das células em DMSO

Foram descongeladas 38 amostras, nesse processo foi separado e nomeado os tubos falcon 15mL contendo 10mL de meio RPMI-1640 (Sigma) + 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma) a 37°C. Posteriormente o criotubo é retirado do freezer -80°C e transferido para o banho maria a 37°C por alguns segundos até descongelamento parcial da amostra. Esta é transferida para o falcon contendo RPMI + SFB e homogeneizado gentilmente. Subsequentemente centrifugou-se a suspensão por 1200rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e ressuspendido 1 a 3 mL de PBS + SFB5% de acordo com o *pellet*. Posteriormente avaliou-se a viabilidade e contagem das células em câmara de Neubauer e azul de trypan 0,2%. Utilizou-se um volume aproximado de 80µL da suspensão, contendo 1×10^6 células para realizar a marcação com os AcMo para antígenos presentes no estudo.

4.4.4. Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo

As aquisições das amostras foram feitas no citômetro de fluxo BD FACSCanto IITM, usando o programa BD FACSDivaTM v8.0.1. Foi utilizado beads (*Cytometer Setup and Tracking Beads* – BD Biosciences – San Jose – USA) validado pelo grupo Euroflow para a setagem diária e monitoramento da estabilidade para todos os parâmetros. Além disso, também foi realizado posteriormente ao CSeT o controle diário com as beads para verificar o limite de detecção dos fluorocromos para a maior sensibilidade dos sinais (valores de acordo com o fabricante e validado Euroflow) e ajustável a partir das voltagens de cada fluorocromo. Também, foi realizada a compensação utilizando-se sangue periférico e BD CompBeads (cat. 51-90-9001229, BD Biosciences) (KALINA, *et al.* 2012). As análises das amostras foram feitas com auxílio do programa InfinicytTM (Cytognos – Salamanca – Espanha), de onde foram gerados os dados analisados (Figura 4.1), como porcentagem e a intensidade mediana de fluorescência de eventos positivos para cada marcador. Inicialmente as células viáveis foram definidas no *dotplot* FCS x SSC. Utilizou-se então *dot plot* CD45 x SSC para delimitar a área específica dos blastos, este *dot plot* discrimina as células blásticas leucêmicas que se localizam na região de baixa complexidade, com intensidade moderada a negativa do CD45. Os linfócitos apresentam intensidade forte do CD45, os precursores eritróides são essencialmente negativos para CD45, os monócitos apresentam maior complexidade interna e intensidade forte do CD45 e os granulócitos possuem alta complexidade, com intensidade moderada do CD45 (CRAIG & FOON, 2008). Em seguida o *dotplot* CD19 x SSC foi utilizado para definir a população de blastos linfóides de linhagem B (representado em rosa), a população de linfóides maduros foi representado em azul (Figura 4.2a).

A



B

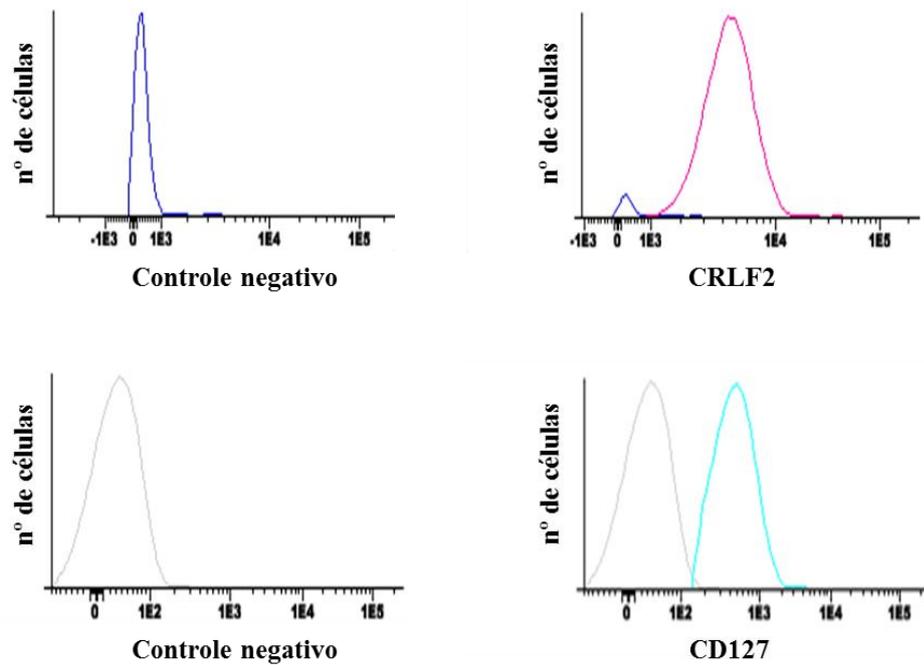


Figura 4.2: Esquema de análise para avaliação de CRLF2 e CD127. (A) Células viáveis definidas no primeiro *dotplot* de FSC x SSC. Populações de leucócitos definidas pela complexidade interna e marcação para CD45 (CD45 x SSC) e os blastos linfóides de linhagem B definidas pela marcação para

CD45 e CD19. (B) Expressão dos antígenos CRLF2 e CD127 em blastos leucêmicos e linfócitos. Os linfócitos foram usados como controles negativos para marcação do CRLF2 enquanto para o CD127 foi usado o tubo não marcado. No histograma do CRLF2, em azul são os linfócitos e em rosa os blastos positivos para o CRLF2. No histograma abaixo em cinza são células do tubo não marcado e em azul claro os blastos positivos para o CD127.

Para avaliação dos marcadores CRLF2 e CD127 os resultados foram expressos em porcentual de células positivas e em intensidade mediana de fluorescência (IMF) das células positivas. Para linfócitos maduros foram utilizados como controle negativo, enquanto que para o CD127 foi utilizado o tubo de células não marcadas (como observado na figura 4.2b).

Para descartar o *background* de marcação foi realizada a subtração do valor IMF dos marcadores CRLF2 e CD127 pela IMF dos linfócitos e do controle negativo, respectivamente. As expressões celulares dos antígenos foram determinadas como alta, intermediária ou baixa de acordo com a distribuição dos percentis ou perfil de expressão, após avaliação de distribuição de frequência. As análises desses marcadores também foram feitas através do programa Infinicyt (BD).

4.4.5. Citometria de fluxo para análise da ploidia celular

A citometria de fluxo também foi utilizada para determinação da ploidia celular através do índice de DNA. O resultado da quantidade de DNA foi apresentado em histogramas (Figura 4.3), onde foram utilizadas amostras frescas de SP EDTA de doadores saudáveis para identificar um pico diploide na fase G0/G1 e as amostras frescas de SP ou MO EDTA de pacientes para identificar a presença da aneuploidia na mesma fase.

Para o preparo de 40mL do tampão de iodeto de propídeo (PI), foi utilizado 136µL de Tris-HCl a 1,0M pH 7,6, 400µL de NaCl a 1,0M, 40µL de NP40, 112µL de RNase a 5mg/mL e 2,0mg de PI (VINDELOV, 1990).

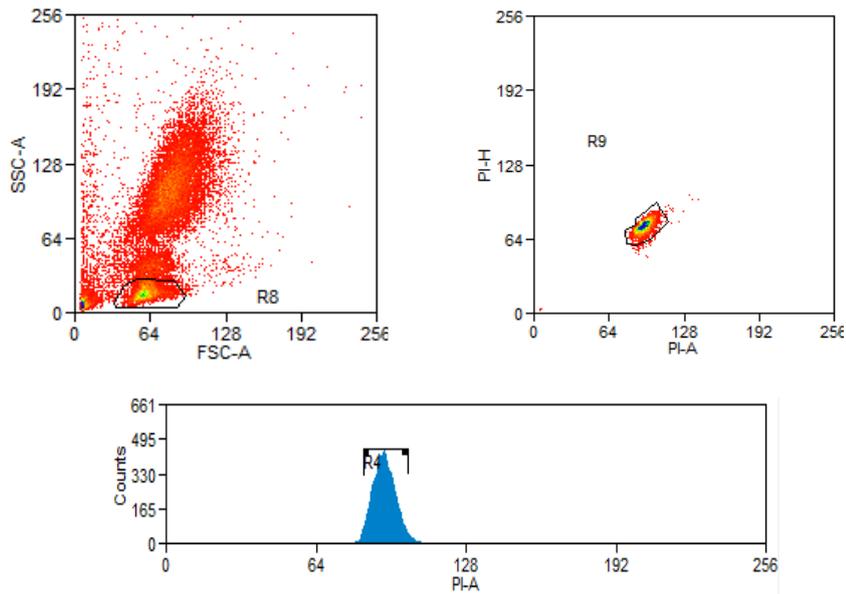
As amostras de doadores e de pacientes foram separadas em 2×10^5 céls/mL após a utilização do contador celular CELM CC 530 (Barueri, SP) e posteriormente utilizou-se 1mL de FacsLysing da BD diluída 1:10 em água milli-Q nas amostras e incubou-se por 10 min. Após esse tempo as amostras foram centrifugadas em 1500rpm por 5 min e subsequentemente descartado o sobrenadante e resuspendido em 2mL de solução PBS 1x e novamente centrifugado nas mesmas condições. Ao terminar, foi descartado o sobrenadante e

cuidadosamente a última gota foi descartada sobre uma gaze para retirar o máximo de PBS. Ao final foram adicionados 400µL da solução (mencionada acima) para cada tubo e o material prontamente adquirido no citômetro.

A aquisição foi feita no citômetro FACSCanto II, utilizando-se o programa FACSDiva e a análise foi feita no programa *Summit* versão 4.3 (DAKO). A análise foi feita a partir do *dotplot* FSC-A x SSC-A no qual foram identificados os blastos e linfócitos, posteriormente foi utilizado *dotplot* PI-A x PI-H para identificar a fase G0/G1. Através do histograma é possível quantificar essa análise. Foram adquiridos 10.000 mil eventos no *gate* de interesse. O índice de DNA foi calculado através da razão entre a mediana do conteúdo de DNA em G0/G1 dos blastos dos pacientes leucêmicos e de células de doadores (controle). Foi identificada aneuploidia quando o índice de DNA foi menor que 0,96 (hipodiploidia) ou maior que 1,15 (altamente hiperdiploide). Na faixa entre 1,06-1,15 é considerado “zona cinza” ou *near-diploide*.

Os casos que foram elegíveis para este estudo tiveram que obter na caracterização da imunofenotipagem mais de 30% de blastos para evitar falso-negativo do teste e o percentual de coeficiente de variação (CV) < 5 no pico G0/G1.

A



B

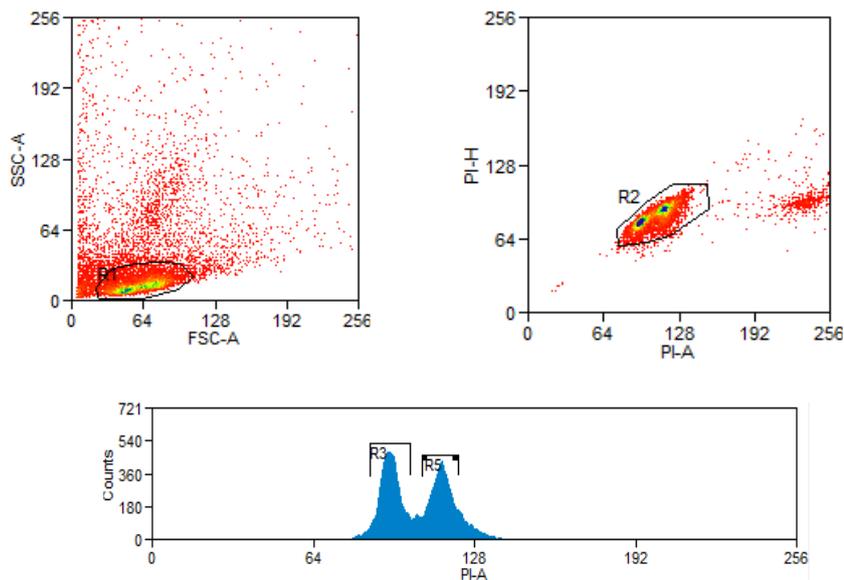


Figura 4.3. Análise do índice de DNA. (A) Análise de uma amostra representativa de células de doadores saudáveis. O *gate* feito no *dotplot* FSC-A x SSC-A identifica a região de blastos e linfócitos, posteriormente é visualizada essa mesma população no *dotplot* de acordo com a área e altura (PI-A x PI-H) para identificar a fase G0/G1, com essa fase já identificada foi realizada a análise através do histograma (quantificar os resultados). (B) Análise de uma amostra representativa de paciente aneuploide. Foram utilizadas as mesmas condições de análise sendo possível visualizar através do *dotplot* PI-A x PI-H duas populações na fase GO/G1. O *gate* posteriormente utilizado para a visualização em histograma, mostra dois picos, sendo o primeiro uma população diploide (R3) e a outra uma população aneuploide (R5).

4.4.6. Extração de RNA

Anteriormente à essa etapa, fez-se a lise de hemácias nas amostras em questão visto no tópico 4.4.2. Após a obtenção do *pellet* com 10×10^6 células, acrescentou-se 1000 μ L de Trizol ao *pellet* sendo então armazenado no freezer -80°C até a utilização. Para a extração de RNA destas amostras foi utilizado o protocolo descrito pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen). Foram adicionados 200 μ l de clorofórmio, pipetou-se vigorosamente por alguns segundos e incubou-se por 3 minutos à temperatura ambiente. Depois as amostras foram centrifugadas a 12000rpm por 15 minutos à 4°C . Após a centrifugação, retirou-se a fase de cima (transparente) que é onde está o RNA com cuidado para evitar contaminação por proteínas e DNA, e transferiu-se para um tubo novo de 1,5mL. A esse tubo novo com a solução contendo RNA adicionaram-se 500 μ l de álcool isopropílico e foi incubado por 30 min à temperatura ambiente. Depois se centrifugou a 12000 rpm por 10 minutos à 4°C e posteriormente o sobrenadante foi descartado por inversão até secá-lo totalmente. Ressuspendeu-se com 20 μ L de H₂O DEPC. Pipetou-se para homogeneizar e incubou-se por 10 minutos a 60°C .

O RNA extraído foi quantificado utilizando-se o espectrofotômetro (*NanoDrop 1000*) no programa específico para a quantificação de RNA. O fator de diluição foi ajustado e a unidade de concentração utilizada foi $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, as absorbâncias utilizadas foram de 260/280nm. Utilizou-se 1 μ L de RNA e a concentração do RNA foi dada automaticamente pelo aparelho. Após a quantificação, o RNA foi conservado a -80°C até o seu uso nas reações de síntese de cDNA.

4.4.7. Tratamento com DNase e transcrição de RNA em cDNA

O tratamento com DNase seguiu o protocolo do fabricante (BioLabs) no qual utilizou-se a concentração de 3 μg de RNA. Em um microtubo 0,2mL foi pipetado o RNA, sendo que o volume final desta solução tem que ser 7,5 μ l, assim, quando foi necessário, acrescentou-se água DEPC. Acrescentou-se 1 μ L de *Buffer* 10x e 1,5 μ L de DNase. Deixou-se na bancada à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente adicionou-se 1 μ l EDTA (25mM) e incubou-se à 75°C por 10 min. Subsequentemente o material foi resfriado no gelo por 1minuto e dado uma rápida centrifugação (spin). Após esse procedimento foi iniciada a síntese de cDNA.

O protocolo de síntese de cDNA segue o ensaio comercial da Invitrogen. Acrescentou-se 1 μ L de Oligo dT e 1 μ L de dNTP (10Mm). Incubou-se a 65°C por 5 minutos, posteriormente as amostras foram rapidamente passadas no gelo e dado um spin. Adicionou-se 4 μ L de tampão 5x, 2 μ L de DTT e 1 μ L de SuperScript II e para finalizar foi incubado a 42°C por 50 minutos e depois a 70°C por 15 minutos. Após a síntese, os cDNAs foram testados através de PCR para verificar a expressão do gene constitutivo *GAPDH*.

4.4.8. Reação em cadeia da polimerase por transcriptase-reversa gene *GAPDH*

Para testar a integridade dos cDNAs, realizou-se uma reação de RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase por transcriptase-reversa) para verificar a amplificação do gene constitutivo *GAPDH*. As condições da reação foram: 20 μ L de volume final; 3,5 μ L de cDNA; dNTP 0,2mM; tampão para PCR 10X; MgCl₂ 2,5mM; 0,2 μ M de oligonucleotídeos (*Senso* – 5' TGACCCCTTCATTGACCTCA 3' e *Anti-senso* – 5' AGTCCTTCCACGATACCAAA 3'); uma unidade da enzima Taq polimerase (Invitrogen - Califórnia, EUA) e H₂O estéril para completar o volume. Os ciclos e as temperaturas da reação foram: desnaturação inicial à 94°C por 1 minuto.; 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 55°C por 30 segundos; extensão a 68°C por 1 minuto; extensão final a 68°C por 3 minutos. Os transcritos amplificados foram visualizados através de gel de agarose corado com GelRed. Na figura 4.4, pode-se observar que o caso 5 não amplificou, o cDNA não foi considerado íntegro e dessa forma não foi utilizada para os testes posteriores.

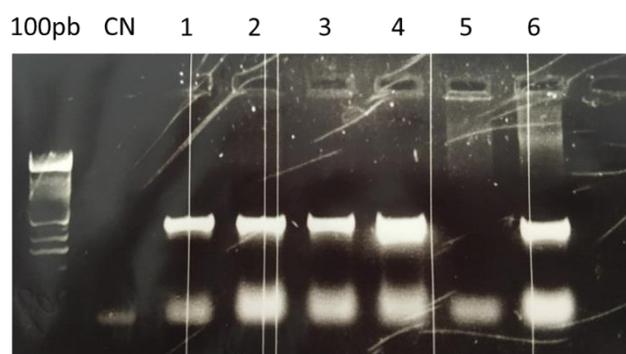


Figura 4.4. Gel de agarose revelando PCR do gene *GAPDH* em amostras de pacientes de LLA-cpB. O controle negativo (CN) é uma alíquota de água e a amostra 5 foi a única que não amplificou.

4.4.9. Reação em cadeia da polimerase para teste de amplificação do gene *CRLF2*

A sequência dos oligonucleotídeos do *CRLF2* utilizada foi de acordo com CHIARETTI, *et al.* 2016 sendo a seguinte: *Senso* – 5' ATACCCAAGCGACTGGTCAGA 3' e *Anti-senso* – 5' GGGAGGCGTTGGTGTCTCT 3'.

Foi realizada padronização das condições ideais para realização da técnica de PCR para verificar a amplificação do *CRLF2*, como temperatura de anelamento e ciclagem. A padronização final foi a seguinte: para o volume final de 25 μ L; 2 μ L de cDNA; 0,5 μ L de dNTP de concentração final 10mM; 0,5 μ L dos oligonucleotídeos; *Buffer* PCR 10X; 1 μ L de $MgCl_2$; 0,2 μ L da enzima Taq polimerase. Os ciclos e as temperaturas da reação foram: desnaturação inicial 94°C por 1 minuto; temperatura de desnaturação 94°C por 30 segundos; temperatura de anelamento 55°C por 30 segundos; temperatura de extensão 68°C por 1 minuto; e depois de 40 ciclos uma extensão final a 68°C por 3 minutos. A revelação da reação de PCR foi feita através de gel agarose 1,5g corado com GelRed.

4.4.10. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A expressão gênica do *CRLF2* foi testada através da reação de RT-qPCR no equipamento Viiia7 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) e calculada com auxílio do software v.1.1 ExpressionSuite (Thermo Fisher, Carlsbad, Califórnia, USA). Foram realizadas 49 amostras e todas testadas em triplicata e os valores quantitativos foram expressos utilizando-se a média do ΔCt (Figura 4.5). As amostras foram avaliadas pelo valor de ΔCt , sendo adotado o limite de até 0,2 do ΔCt entre as triplicatas. Além disso também foi avaliado a Curva de Melt, para *CRLF2* ficou em aproximadamente 83°C e para o *GAPDH* 85°C. O valor utilizado para a identificar a expressão foi através da subtração da média dos valores ΔCt do *CRLF2* pelo *GAPDH* e posteriormente $1/\Delta Ct$.

Para o volume final de 15 μ L para cada reação foram utilizados 7,5 μ L do corante SYBR green (Applied Biosystems, Foster City, CA); 0,75 μ L dos oligonucleotídeos (*GAPDH* ou *CRLF2*); 1,5 μ L do cDNA e H_2O para completar o volume. As condições da reação foram de acordo como descrito por CHIARETTI, *et al.* 2016. Um ciclo de 50°C por 2 minutos, 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, 1 ciclo de 95°C por 15 segundos, um ciclo de 60°C por 1 minuto, em um total de 40 ciclos.

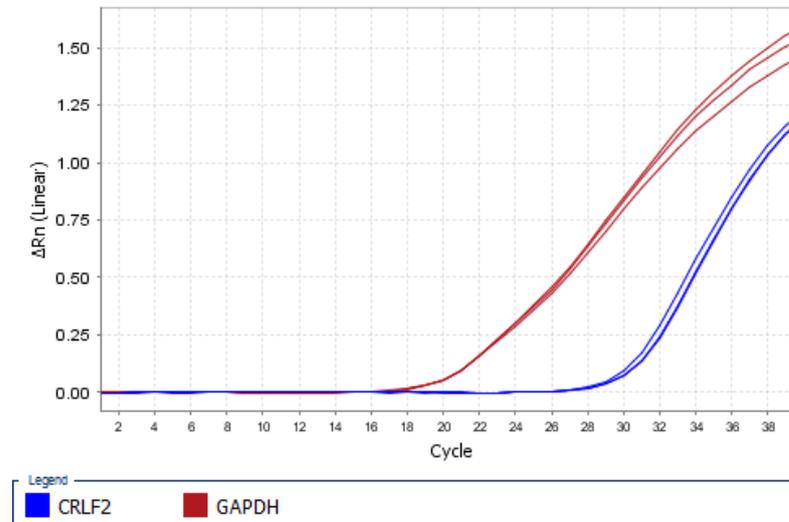


Figura 4.5: O *plot* de amplificação do *CRLF2* e *GAPDH*. Para definir a expressão gênica foi utilizada as médias do ΔC_t , sendo que entre as triplicatas o limite de variação foi de até 0,2. Em azul o gene *CRLF2* e em vermelho o gene *GAPDH*.

4.4.11. Análise estatística

Foi feita a análise exploratória e descritiva inicial dos dados para avaliação de diferenças na distribuição de subgrupos de pacientes de acordo com a faixa etária, subtipo imunofenotípico (CD10-, CD10+), ter ou não SD. 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 e 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 correlação não paramétrica entre os dados foi utilizado o teste de *Spearman* e para análise não paramétrico com teste pareado entre as amostras de diagnóstico e recaída foi utilizado o teste *Wilcoxon*.

Para as análises utilizou-se software PRISM (PRISM, Graphpad, La Jolla, CA, USA). Para todos os testes foi considerado o nível mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Características clínico-demográficas das amostras

No período de estudo (2014-2016), uma série de 151 amostras foram incluídas para análises, conforme a figura 5.1. Dentre essas amostras, 32 foram excluídas por não conformidade, como ≥ 3 dias de colhido, baixa viabilidade celular ($<50\%$) e/ou colhida em heparina, 138 (91,4%) foram selecionadas para o estudo, incluindo 5 casos de LLA-cpB em crianças com SD (Figura 5.1).

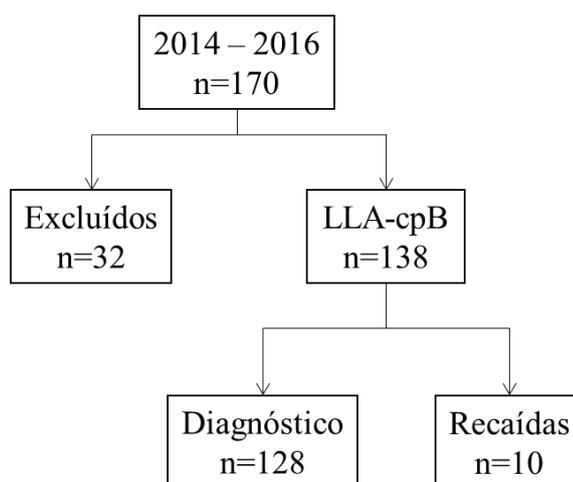


Figura 5.1: Representação esquemática dos casos do estudo. Dentre os 151 casos, 13 casos foram excluídos por ausência de blastos, baixa viabilidade e marcação inespecífica. Cento e trinta e oito amostras foram utilizadas no presente estudo, sendo 128 casos ao diagnóstico, incluindo 5 casos de SD. Além de 10 amostras de recaídas sequenciais.

As características demográficas e clínicas estão enumeradas na tabela 5.1. A média de idade foi de 6,2 anos (0,1 – 17 anos). Foi observado discreto predomínio do sexo masculino e de cor da pele não branca. Em relação ao subtipo celular, os casos mais frequentes eram LLA-cpB comum (com CD10 +). Foram analisadas 81 (58,7%) amostras quanto ao índice de DNA, como *proxy* para categorizar os casos hiperdiploides ($\geq 1,16$), principalmente nos casos que não foram realizados estudos citogenéticos (bandeamento G). As alterações citogenético-moleculares mais frequentes nos casos são hiperdiploidia (26%); *ETV6-RUNX1* (9,5%); *TCF3-PBX1* (2%); *KMT2A* (5,3%) e *BCR-ABL1* (2,0%).

Casos com todos os principais testes citogenéticos negativos foram denominadas como LLA-cpB ^{negativos}. Os cinco casos de SD com LLA-cpB tem as mesmas características das

demais LLA-cpB sem SD com maior frequência de casos dentro do grupo de risco padrão (baixo risco).

Tabela 5.1: Características clínico-demográficos dos casos ao diagnóstico

Variáveis	Casos totais ao diagnóstico	LLA-cpB SD
	n(%)	n (%)
	128 (100)	5 (100)
Idade (meses)		
0-12	5 (3,9)	0 (0)
13-120	99 (77,3)	5(100)
> 120	24 (18,8)	0 (0)
Sexo		
Masculino	73 (57)	3 (60)
Feminino	55 (43)	2 (40)
Cor da pele*		
Branca	57 (44,5)	3 (60)
Não-branca	67 (52,3)	1 (20)
Não informado	4 (3,2)	1 (20)
Leucometria ($\times 10^6/L$)		
≤ 50.000	99 (77,3)	4 (80)
> 50.000	29 (22,7)	1 (20)
EGIL*		
B-I (Pró- B)	15 (11,7)	0 (0)
B-II (B-comum)	91 (71,1)	5 (100)
B-III (Pré-B)	15 (11,7)	0 (0)
Não informado	7 (5,5)	0 (0)
Alterações recorrentes**		
Altamente Hiperdiploide $\geq 1,16$	19 (14,8)	1 (20)
<i>ETV6-RUNX1</i>	10 (7,8)	0 (0)
<i>E2A-PBX1</i>	2 (1,6)	0 (0)
<i>KMT2A</i>	5 (3,9)	0 (0)
<i>BCR-ABL1</i>	1 (0,8)	0 (0)
LLA-cpB ^{negativos}	26 (20,3)	1 (20)
Não classificados	65 (50,8)	
Classificação de risco NCI		
Alto	48 (37,5)	1 (20)
Padrão	80 (62,5)	4 (80)

Abreviações: * Não foram obtidas informações em todos os casos. ** Neste item foram ilustrados apenas os casos que apresentaram as alterações cromossômicas mais recorrentes. São considerados casos LLA-cpB^{negativos}, aqueles com resultados negativos para todas as outras alterações citogenéticas; os casos não classificados são aqueles que não foram possíveis realizar o teste de uma ou mais alterações citogenéticas moleculares acima. SD, síndrome de Down; NCI, National Cancer Institute.

As recaídas foram analisadas de acordo com a marcação imunofenotípica dos anticorpos CRLF2 e CD127 ao diagnóstico. As características clínico-laboratoriais estão enumeradas na tabela 5.2. A média de idade foi de 12,3 anos (1 – 17 anos). Predomínio no subtipo LLA-B comum (50%) e alto risco de acordo com o NCI (80%). Foi identificado um caso (10%) com o rearranjo *KMT2A* e um caso (10%) com a fusão *TCF3-PBX1*. A média de duração entre o diagnóstico e a recaída foi de 1,9 anos (1 – 4 anos).

Tabela 5.2: Características clínico-demográficas das amostras de recaída.

Casos	Idade (anos) na recaída	Duração entre diagnóstico e recaída (anos)	Subtipo EGIL	Alteração citogenética-molecular ao diagnóstico	Alteração citogenética-molecular na recaída	NCI ao diagnóstico	Localização	Leucometria $\times 10^6$ ao diagnóstico	Leucometria $\times 10^6$ na recaída
1	16	3	B-II	<i>ETV6-RUNX1</i>	Ausente	Alto Risco	MO	37.000	2.000
2	12	4	B-II	Ausente* ^Δ	Ausente ^Δ	Alto Risco	MO	74.000	142.500
3	1	2	B-I	<i>KMT2A</i>	<i>KMT2A</i>	Alto Risco	MO	102.000	33.800
4	7	1	B-II	Ausente ^Δ	Ausente	Risco padrão	MO	28.300	4.900
5	12	1	B-I	Ausente ^Δ	Ausente*	Alto Risco	MO	53.500	10.700
6	9	2	B-II	<i>ETV6-RUNX1</i> ^Δ	Ausente*	Risco padrão	MO	47.400	16.800
7	16	2	B-II	Ausente ^Δ	Ausente ^Δ	Alto Risco	MO	5.300	5.600
8	16	2	B-II	Ausente ^Δ	Ausente	Alto Risco	MO	127.000	83.000
9	17	1	B-I	Não realizado	Não realizado	Alto Risco	MO	82.000	43.900
10	17	1	B-III	<i>TCF3-PBX1</i> ^Δ	<i>TCF3-PBX1</i>	Alto Risco	MO	20.140	1.820

Abreviações: As alterações citogenética-molecular foram realizadas para *ETV6-RNX1*, *KMT2A*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* e índice de DNA. Não foi realizado o teste para alterações citogenética-molecular no caso 9. *Não foi realizado o teste para o rearranjo *KMT2A*. ^ΔNão foi realizado o índice de DNA. No caso 9 foi realizado o índice de DNA apenas na recaída sendo analisado como diploide.

5.2. Análises de imunofenotipagem para CRLF2 e perfil de expressão celular

As análises de expressão celular da molécula CRLF2 foram realizadas nas 138 amostras do estudo, incluindo os casos com SD e as recaídas. Foram incluídos todos os casos de LLA-cpB, com e sem alterações citogenética-molecular recorrentes. Inicialmente a avaliação do CRLF2 consistiu em estabelecer os valores correspondentes aos níveis de *cutoff* entre os percentuais e IMF conforme ilustrado na figura 5.2. Embora já seja convencionalizado que o *cutoff* de 20% de células marcadas positivamente defina os padrões de leucemias (BENE, *et al.* 1995; WANT, *et al.* 2010), foi observado que o CRLF2 apresenta diferentes perfis de

expressão (Figura 5.3). Dessa forma, foram definidos casos fortemente positivos, moderadamente positivos e negativos (Figura 5.3a), essa análise foi utilizada para definir grupos com diferentes níveis de expressão do CRLF2, que serão descritos a frente (Figura 5.3 e Tabela 5.2). Os casos com baixa expressão (nomeados no histograma abaixo como negativo) representam percentual abaixo de 20%. Observamos que 21 casos possuem esse perfil de expressão, mas que possuem IMF intermediária ou alta.

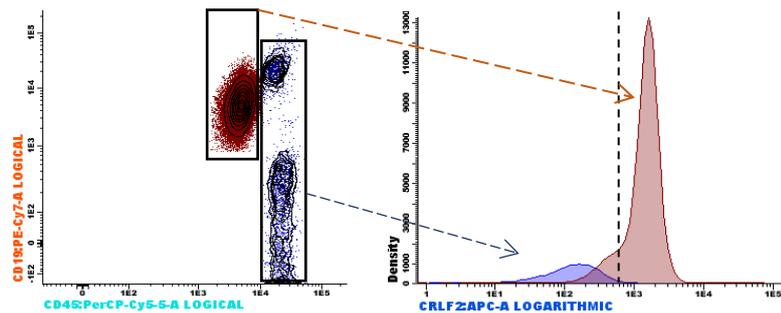
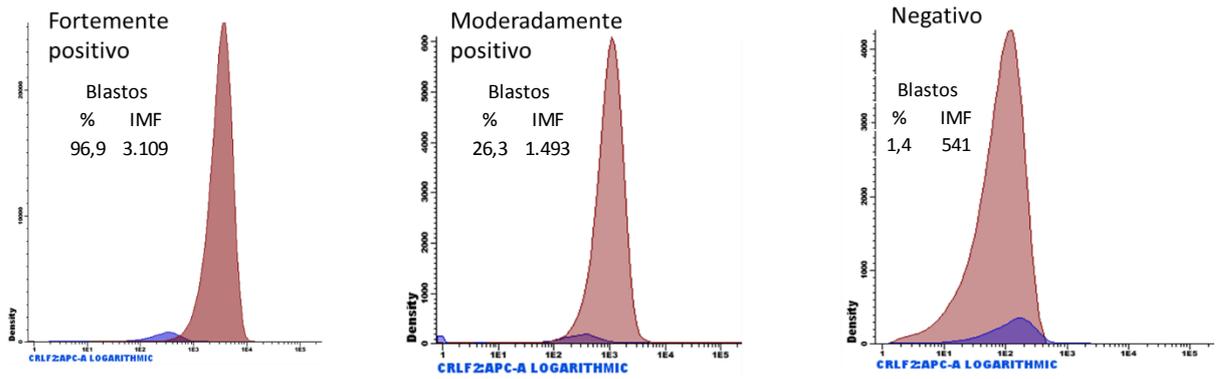


Figura 5.2: Esquema de análise do CRLF2 através de *dotplot* com CD45xCD19. A marcação foi visualizada em região de células viáveis definidas previamente. Em azul os linfócitos (utilizados como controle negativo) e em lilás os blastos leucêmicos. A IMF dos blastos leucêmicos foi mensurada a partir das células positivas mostrados em linhas pontilhadas no histograma.

A



B

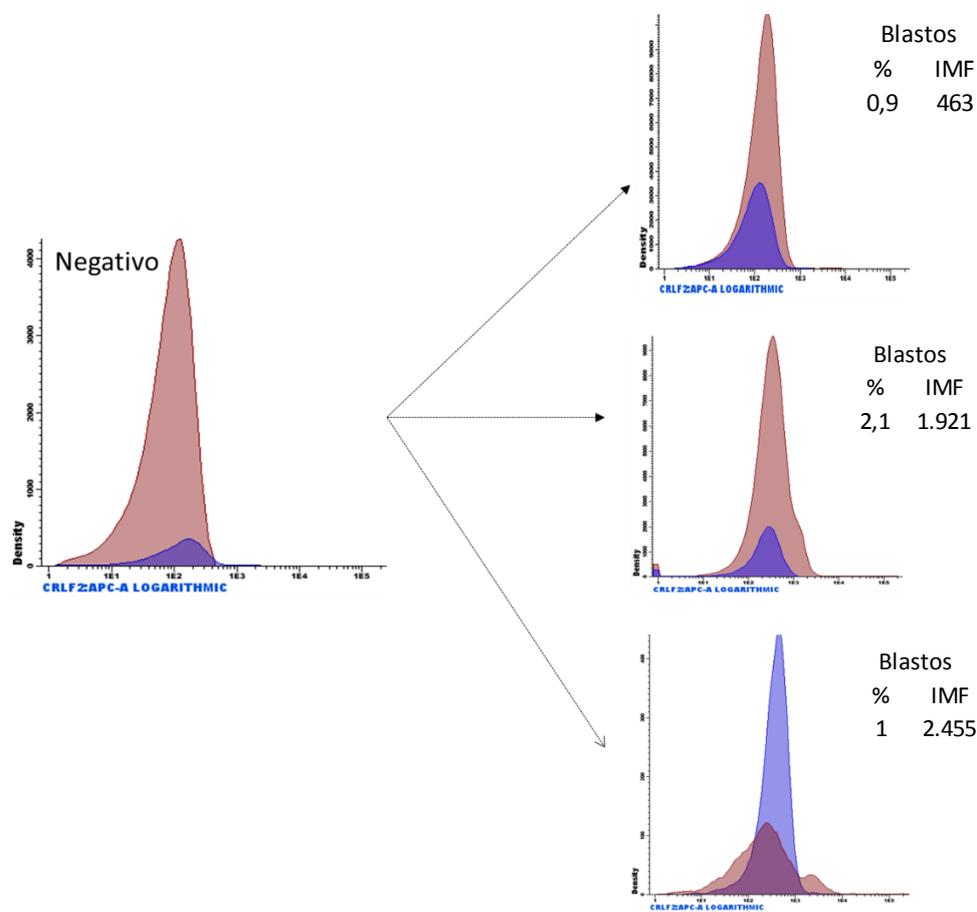


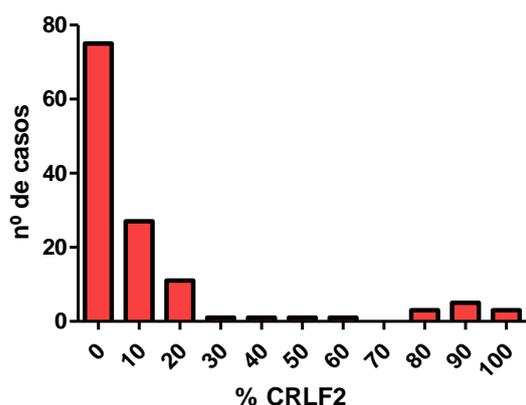
Figura 5.3: Perfil de expressão dos casos analisados para o CRLF2. (A) histogramas representativos com a expressão de CRLF2 em blastos linfoides e a marcação negativa para CRLF2 em linfócitos nomeados como fortemente positivo, moderadamente positivo e negativo. (B) Histogramas representativos dos casos com percentual baixo para CRLF2. Entre esses casos que possuem um percentual baixo são observados aqueles que possuem IMF também baixos (primeiro histograma a direita), que possuem uma IMF intermediária (histograma do meio) e aqueles que possuem um clone minoritário com alta IMF (mostrado no último histograma a direita). Em lilás os blastos leucêmicos e em azul os linfócitos utilizados como controle negativo.

5.2.1. Distribuição de frequência do percentual e intensidade mediana de fluorescência do CRLF2

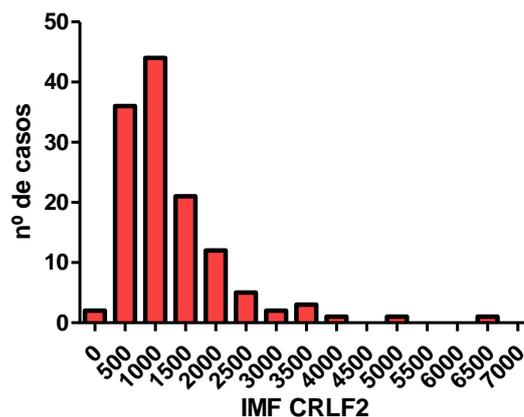
A distribuição de frequência (percentual e IMF) dos casos marcados para o CRLF2 pode ser visto na Figura 5.4. Observou-se que o perfil de expressão em relação ao percentual de células marcadas é muito heterogêneo com mediana 3,5% (0,07% - 99,7%). Nessa distribuição foi possível visualizar 3 grupos distintos de expressão celular categorizados como, percentual baixo (<20%), percentual intermediário ($\geq 20\%$ e <70%) e percentual alto ($\geq 70\%$), conforme visto na figura 5.4a. Esta definição de *cutoff* foi utilizada em todas análises posteriores. Nesta série de casos, a maioria (85,2%) possuem percentual baixo de células marcadas para CRLF2.

Quanto a distribuição de frequência dos casos em relação a IMF conforme mostra a Figura 5.3b. Verificou-se que a mediana de expressão foi 1.015, com variação de 226 a 6.677. Nesta análise de IMF utilizamos os valores de percentis para categorizar essas expressões: menor que 75 percentil (< 1.480) foi considerado como baixa expressão; ≥ 75 percentil e menor que 90 percentil (≥ 1.480 e <2.438) foi considerada expressão intermediária; valor igual ou acima de 90 percentil (≥ 2.438) foi considerada expressão alta (Figura 5.4c).

A



B



C

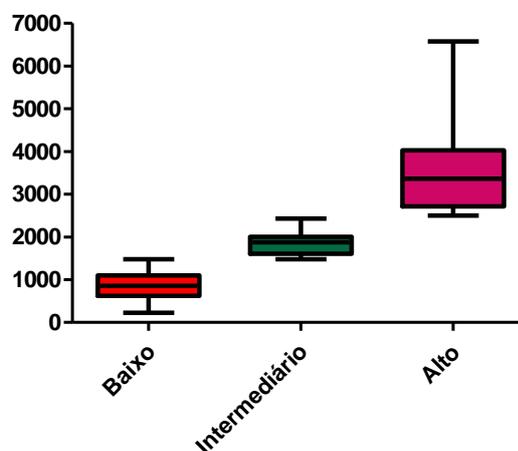


Figura 5.4. Distribuição de frequência do CRLF2 em blastos leucêmicos de LLA-cpB. (A) A distribuição em relação ao percentual, foi possível dividir a expressão em baixa, intermediária e alta. (B) A distribuição em relação ao IMF de células positivas para o CRLF2 foi dividida através dos percentis em baixa, intermediário e alta expressão em relação ao IMF. (C) Valores categóricos de acordo os percentis para a IMF. As barras horizontais nos *boxplots* representam mediana, valores mínimo e máximo. P-valor calculado pelo teste *Kruskal-Wallis*.

5.2.2. Perfil de expressão celular do CRLF2 de acordo com o percentual e a intensidade mediana de fluorescência nas variáveis clínico-demográficas

Realizou-se o teste de Mann Whitney e Qui-Quadrado, para verificar o perfil de expressão celular em relação às variáveis idade (meses), sexo, etnia, leucometria, classificação de risco preditivo. Inicialmente foram comparados dois grupos de cada variável

(idade, sexo, dor da pele, classificação de risco e leucometria) de acordo com o percentual (Figura 5.5) e IMF (Figura 5.6) do CRLF2.

Posteriormente foi realizado a análise para o percentual, dividido entre baixo percentual (<20%), percentual intermediário (≥ 20 e <70%) e percentual alto ($\geq 70\%$), mostrou valor estatístico na variável idade, no qual foi possível observar que aproximadamente 20% dos pacientes maiores de 10 anos possuem um percentual de expressão mais alto ($\geq 70\%$). Foi observado também um maior número de casos (63,6%) com alto risco entre o grupo com percentual alto de CRLF2 ($\geq 70\%$), resultado bem diferente dos grupos com percentual baixo e intermediário nesse grupo de risco. Apesar desse aumento, não foi observada diferença estatística significativa, assim como nas outras variáveis (leucometria, sexo e cor da pele) analisadas (Tabela 5.3). Também foi realizado o mesmo teste para verificar o perfil de expressão do CRLF2 a partir da IMF (Tabela 5.4). Foi encontrada uma tendência de aumento no número de pacientes com idade acima de 10 anos no grupo com IMF alta, conforme também visto em relação ao percentual, apesar de não ter tido significância estatística. Em relação a leucometria, risco preditivo, sexo e cor da pele, não houve nenhuma diferença estatística.

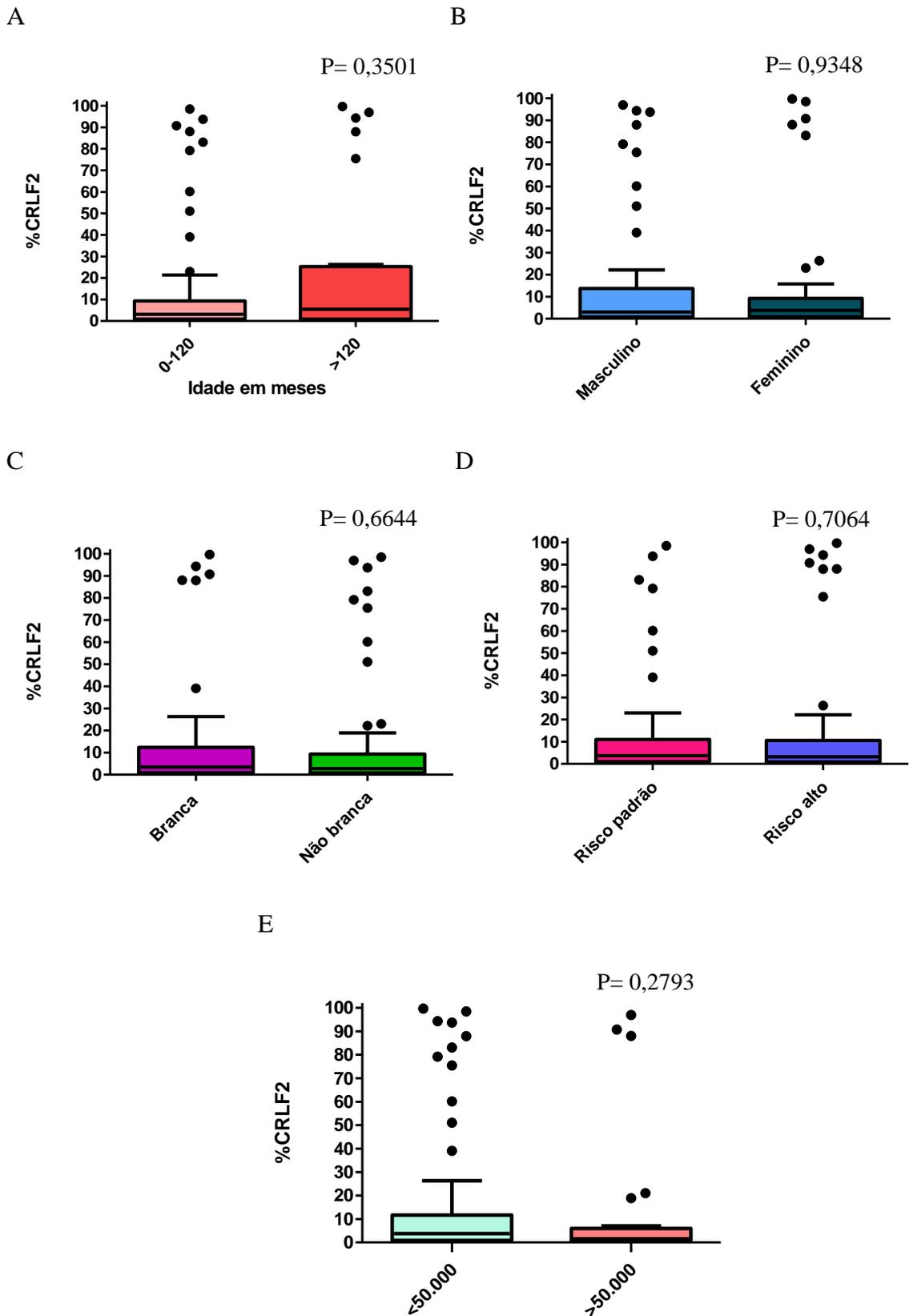


Figura 5.5: Análise do percentual do CRLF2 de acordo com as variáveis idade em meses (A), sexo (B), cor da pele (C), classificação de risco (D) e leucometria $\times 10^6$ (E). As barras horizontais nos *boxplots* representam mediana, valores mínimo e máximo. P-valor calculado pelo teste *Kruskal-Wallis*.

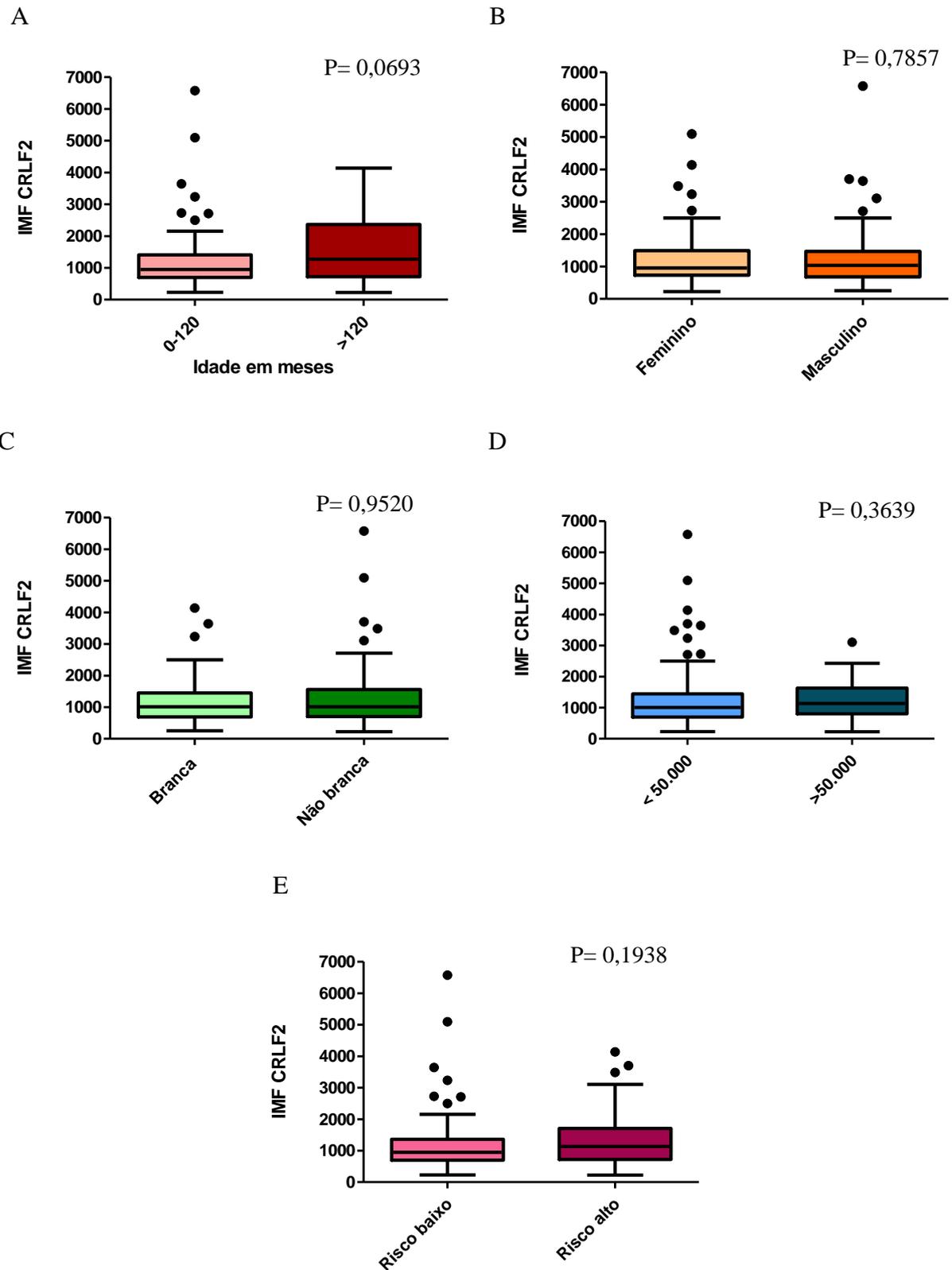


Figura 5.6: Análise da IMF do CRLF2 de acordo com as variáveis idade em meses (A), sexo (B), cor da pele (C), classificação de risco (D) e leucometria ($\times 10^6$) (E). As barras horizontais nos *boxplots* representam mediana, valores mínimo e máximo. P-valor calculado pelo teste *Kruskal-Wallis*.

Tabela 5.3: Comparação das variáveis clínico-demográficas de acordo com o perfil de expressão celular em percentual do CRLF2

Variáveis	n (%)	<20% n(%)	≥20% e <70% n(%)	≥70% n(%)	P valor
Nº de pacientes	128 (100)	109 (85,2)	8 (6,2)	11 (8,6)	
Idade (meses)					0,0482
0-120	104 (81,2)	92 (84,4)	6 (7,5)	6 (54,6)	
>120	24 (18,8)	17 (15,6)	2 (2,5)	5(45,4)	
Sexo					0,5676
Masculino	73 (57)	61 (56)	6 (7,5)	6 (54,5)	
Feminino	55 (43)	48 (44)	2 (2,5)	5 (45,5)	
Cor da pele*					0,9845
Branca	57 (44,5)	49 (44,9)	3 (37,5)	5 (45,4)	
Não branca	67 (52,3)	57 (52,3)	4 (50)	6 (54,5)	
Leucometria					0,7373
< 50.000	99 (77,3)	84 (77,1)	7 (87,5)	8 (72,7)	
≥ 50.000	29 (22,7)	25 (22,9)	1 (12,5)	3 (27,3)	
Classificação NCI					0,1712
Alto risco	48 (37,5)	38 (34,9)	3 (37,5)	7 (63,6)	
Risco padrão	80 (62,5)	71 (65,1)	5 (62,5)	4 (36,4)	

*Informação não obtida em 4 casos. A análise foi feita a partir dos 124 casos com informação disponível. Análise estatística efetuada através do teste do Qui-Quadrado.

Tabela 5.4: Comparação das variáveis clínico-demográficas de acordo com o perfil de expressão celular em IMF do CRLF2

Variáveis	n (%)	<1.480 n(%)	≥1.480 e <2.438 n(%)	≥2.438 n(%)	P valor
Nº de pacientes	128 (100)	96 (75)	20 (15,6)	12 (9,4)	
Idade (meses)					0,0566
0-120	104 (81,2)	82 (86,5)	15 (75)	7 (58,3)	
>120	24 (18,8)	14 (13,5)	5 (25)	5 (41,7)	
Sexo					0,8427
Masculino	73 (57)	56 (58,3)	11 (55)	6 (50)	
Feminino	55 (43)	40 (41,7)	9 (45)	6 (50)	
Cor da pele*					0,7984
Branca	57 (44,5)	44 (46,8)	9 (47,4)	4 (36,4)	
Não branca	67 (52,3)	50 (53,2)	10 (52,6)	7 (63,6)	
Leucometria					0,2042
< 50.000	99 (77,3)	75 (78,1)	13 (65)	11 (91,7)	
≥ 50.000	29 (22,7)	21 (21,9)	7 (35)	1 (8,3)	
Classificação NCI					0,4021
Alto risco	48 (37,5)	33 (34,4)	10 (50)	5 (41,7)	
Risco padrão	80 (62,5)	63 (65,6)	10 (50)	7 (58,3)	

*Informação não obtida em 4 casos, a análise foi feita a partir dos 124 casos com informação disponível. Análise estatística efetuada através do teste do Qui-Quadrado

5.2.3. Correlação entre o percentual e a intensidade mediana de fluorescência

Verificou-se a correlação estatisticamente significativa entre o percentual e a IMF do CRLF2 (Figura 5.7), tendo sido encontrada $p=0,0365$, no entanto, o valor de $r=0,1850$ demonstra correlação fraca. Observou-se que 29 (22,7%) casos apresentaram valores de percentual e IMF discrepantes (percentual alto e IMF baixo ou percentual baixo e IMF alto).

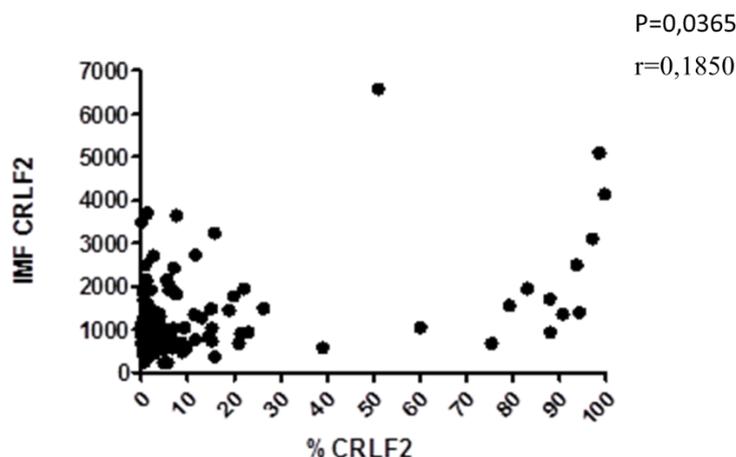


Figura 5.7: Correlação entre o percentual e a IMF do CRLF2. Para esta análise foi utilizado o teste *Spearman*, mostrando baixa correlação entre as duas variáveis.

5.2.4. Expressão celular e os subtipos maturativos

Realizou-se os testes comparativos entre os subtipos maturativos de LLA-cpB, com a finalidade de verificar alguma associação entre possíveis níveis de expressão celular do CRLF2 e os estágios maturativos da LLA-cpB. Foram excluídos sete casos porque não foram completamente caracterizados com painel de anticorpos que definem os subtipos. Quinze casos (12,4%) foram caracterizados como LLA-pró B (B-I), 91 casos (75,2%) como LLA-B comum (B-II) e 15 casos (12,4%) como LLA-pré B (B-III).

Foi observada diferença estatística quando avaliado o percentual de células positivas para o CRLF2 ($p=0,0237$) entre o subtipo LLA-pró B (B-I) e LLA-pré B (B-III) (Figura 5.8a). Observou-se que no grupo B-I a mediana de expressão foi de 1,2% (0,1-4,8%) e no grupo B-II, a mediana foi 3,8% (0,07-97%), já o subtipo B-III apresentou uma mediana de 6,7% (0,4-99,7%). Não foi observado nenhuma associação significativa entre eles ($p=0,8037$) (Figura 5.8b). A mediana da IMF dentre os casos de B-I foi 917,0 (226-2.709), a mediana dos casos B-II foi 1.046 (227,6-3.700) e já nos casos de B-III foi 863,2 (252,8-6.578). A tabela 5.5

mostra os diferentes níveis de percentual e a tabela 5.6 mostra em relação a IMF entre os subtipos analisados de acordo com o *boxplots* vistos abaixo.

Nas tabelas abaixo (tabela 5.5 e 5.6) semelhantemente pode ser observado que no grupo com subtipo Pré-B (B-III) apresentam um maior percentual de casos (26,6% e 20% respectivamente) entre os grupos com alto percentual e alta IMF do CRLF2.

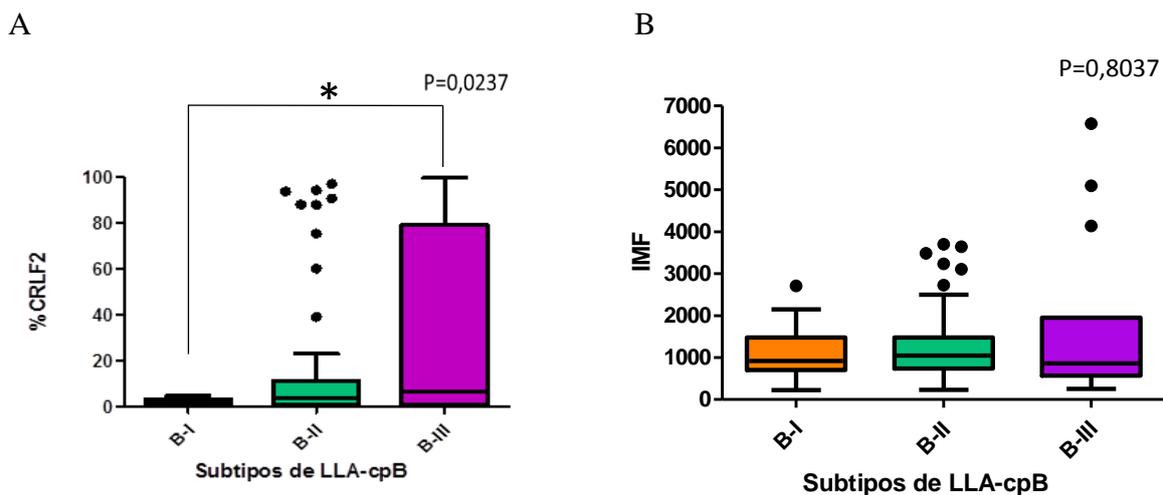


Figura 5.8: Perfil de expressão de células positivas para o CRLF2 em subtipos de LLA-cpB. As barras horizontais nos *boxplots* representam mediana, valores mínimo e máximo. P-valor calculado pelo teste *Kruskal-Wallis*. (A) Em relação ao percentual houve diferença estatística entre subtipos Pró-B (B-I) e Pré-B (B-III) (*p=0,0237) (B) Não houve associação estatística quando avaliada a IMF entre os subtipos de LLA-cpB.

Tabela 5.5: Perfil de expressão do CRLF2 em LLA-cpB de acordo com percentual entre os subtipos maturativos

Subtipos	n (%)	<20% n(%)	≥20% e <70% n(%)	≥70% n(%)
B-I	15 (12,4)	15 (100)	0 (0)	0 (0)
B-II	91 (75,2)	78 (85,7)	6 (6,6)	7 (7,7)
B-III	15 (12,4)	10 (66,7)	1 (6,7)	4 (26,6)
Total	121 (100)	103 (85,1)	7 (5,8)	11 (9,1)

Tabela 5.6: Perfil de expressão do CRLF2 em LLA-cpB de acordo com a IMF entre os subtipos maturativos

Subtipos	n (%)	<1.480 n(%)	≥1.480 e <2.438 n(%)	≥2.438 n(%)
B-I	15 (12,4)	12 (80)	2 (13,3)	1 (6,7)
B-II	91 (75,2)	68 (74,7)	15 (16,5)	8 (8,8)
B-III	15 (12,4)	10 (66,7)	2 (13,3)	3 (20)
Total	121 (100)	90 (74,4)	19 (15,7)	12 (9,9)

5.2.5. Avaliação imunofenotípica do CD66c com a expressão diferencial do CRLF2

A expressão na superfície do marcador CD66c foi realizada em 67 pacientes, utilizando o mesmo protocolo de marcação mencionado anteriormente. Foi utilizado o *cutoff* de 20% de marcação em células leucêmicas para definir a positividade do marcador. Foi identificado os casos positivos e negativos para o CD66c e posteriormente avaliado o perfil de expressão (percentual e IMF) do CRLF2 nesses casos (Figura 5.9). A média do percentual de expressão do CRLF2 nos casos positivos para o CD66c foi de 19,1% (0,9-99,7) e nos casos negativos para CD66c foi 9,7% (0,9-83,1). Em relação a IMF da expressão do CRLF2 nos casos positivos para a molécula CD66c foi 1.575 (534-6.578) e nos casos negativos foi 1.199 (227,6-3.644).

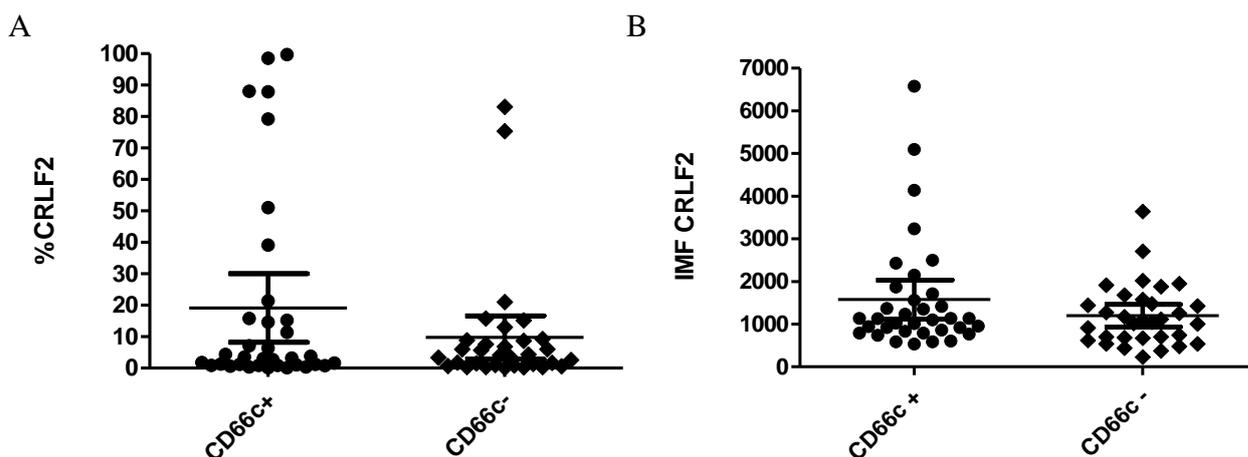


Figura 5.9: Perfil de expressão do CRLF2 nos casos com percentual positivo e negativo do CD66c. (A) Percentual de expressão da molécula CRLF2 nos casos positivos e negativos do CD66c, p valor =0,6878. (B) IMF do CRLF2 nos casos positivos e negativos para CD66c, P valor =0,3307. As

barras horizontais apresentam média com 95% de intervalo de confiança. P-valor calculado pelo teste *Mann Whitney test*.

Não foi observado associação da marcação do CD66c com a expressão diferencial do CRLF2 quando observados nos diferentes perfis de marcação (baixo, intermediário e alto) tanto em relação ao percentual, quanto em IMF (Tabela 5.7 e Tabela 5.8). No entanto pode ser verificado que 71,4% dos casos com alta expressão (percentual e IMF) do CRLF2 possuem a marcação positiva ($\geq 20\%$) do CD66c.

Tabela 5.7: Marcação do CD66c em baixo, intermediário e alto percentual de expressão do CRLF2

Percentual	n (%)	CD66c + n(%)	CD66c - n(%)	P valor
				0,3284
Baixo	56 (83,5)	27 (48,2)	29 (51,8)	
Intermediário	4 (6)	3 (75)	1 (25)	
Alto	7 (10,5)	5 (71,4)	2 (28,6)	
Total	67 (100)	35 (52,2)	32 (47,8)	

Tabela 5.8: Marcação do CD66c em baixo, intermediário e alto IMF de expressão do CRLF2

IMF	n (%)	CD66c + n(%)	CD66c - n(%)	P valor
				0,4558
Baixo	48 (71,6)	25 (52,1)	23 (47,9)	
Intermediário	12 (17,9)	5 (41,7)	7 (58,3)	
Alto	7 (10,5)	5 (71,4)	2 (28,6)	
Total	67 (100)	35 (52,2)	32 (47,8)	

5.2.6. Análises da expressão celular de CRLF2 de acordo com subtipo de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B com alterações fundadoras da leucemogênese

As principais alterações fundadoras que definem os subtipos preditivos de LLA-cpB, *ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1*, *r-KMT2A*, *BCR-ABL1* e alta hiperdiploidia, foram analisadas de acordo com valores de percentual e IMF da marcação com o CRLF2 (Figura 5.10a). Os casos cujo valores de ploidia avaliado por índice de DNA (81 amostras, sendo 73 casos analisados ao diagnóstico), cujos índices de DNA $\geq 1,16$ foram categorizados como hiperdiploides. A maioria dos casos possuem baixo percentual de expressão do CRLF2, no entanto foram encontrados 2 (10,5%) casos que possuem a superexpressão do CRLF2 ($>70\%$). Não foi possível analisar os casos com *E2A-PBX1* e *BCR-ABL1*, pois a positividade foi apenas encontrada em 2 e 1 caso, respectivamente.

Verificou-se que os casos com a fusão *ETV6-RUNX1* apresentaram uma expressão mais baixa (mediana 0,95%) ($p=0,0298$); Os casos com o rearranjo *KMT2A* tiveram uma expressão menor do CRLF2 (mediana 1,4%), no entanto, não houve valor estatístico.

Quando os casos foram analisados em relação a ter ou não a presença das alterações (*ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1*, *KMT2* e *BCR-ABL1*) foi encontrado um valor estatístico significativo ($*p=0,0221$) no qual foi observado que os casos com alguma das alterações mencionadas acima possuíam um menor percentual de células marcadas (mediana 1,4%) quando comparados com os casos sem essas alterações (mediana 5,5) (Figura 5.10b). A tabela 5.9 mostra mais claramente que pacientes com as alterações *ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1*, *KMT2* e *BCR-ABL1* possuem baixo percentual de células marcadas para o CRLF2 e para os casos altamente hiperdiploide ($\geq 1,16$), 16 (84,2%) casos possuem baixo percentual, no entanto 1 (5,2%) possuem expressão intermediária e 2 (10,5%) possuem percentual alto $\geq 70\%$.

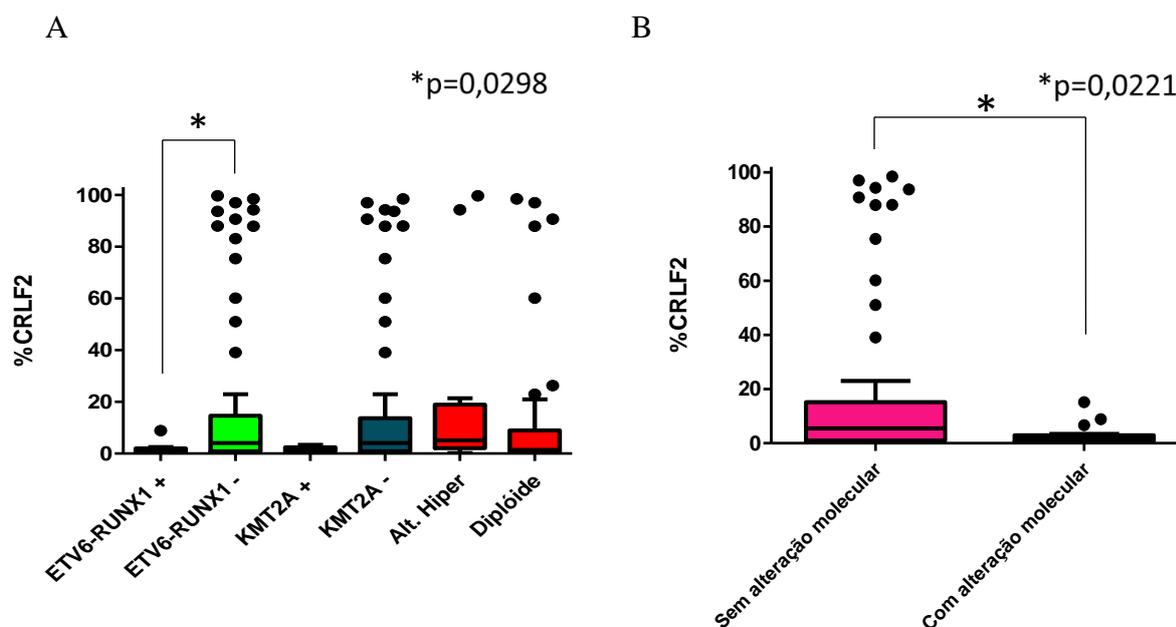


Figura 5.10: Comparação do percentual de células positivas para o CRLF2 em casos com a presença e ausência de alterações moleculares mais frequentes. (A) Os casos foram estatisticamente significantes quando comparados entre os casos com a presença e ausência *ETV6-RUNX1* ($*p=0,0298$). (B) Perfil de expressão de células positivas para o CRLF2 em casos com ausência e presença das alterações *ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1*, *KMT2* e *BCR-ABL1* ($*p=0,0221$). As barras horizontais nos *Box plots* representam mediana, valores mínimo e máximo; p-valor calculado pelo teste de *Mann Whitney*.

Tabela 5.9: Presença das alterações moleculares mais frequentes em LLA-cpB de acordo com o percentual de expressão de CRLF2

Alterações moleculares	n (%)	<20%	≥20% e <70%	≥70%
		n (%)	n (%)	n (%)
<i>ETV6-RUNX1</i>	10 (27)	10 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>E2A-PBX1</i>	2 (5,5)	2 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>KMT2A</i>	5 (13,5)	5 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>BCR-ABL1</i>	1 (2,7)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
Hiperdiploidia	19 (51,3)	16 (84,2)	1 (5,3)	2 (10,5)

Foram realizados os mesmos testes para analisar a IMF de células positivas para o CRLF2 na presença e ausência das alterações moleculares mais frequentes de LLA-cpB (Figura 5.11). Não foi observada nenhuma diferença estatística entre eles.

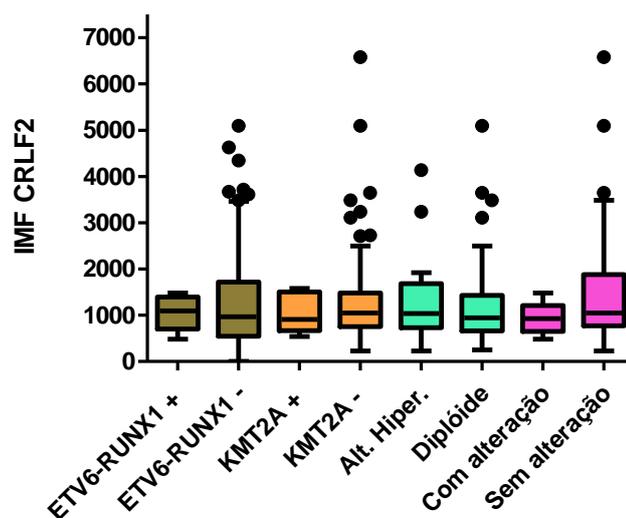


Figura 5.11: Comparação da IMF de células positivas para o CRLF2 em casos com a presença ou ausência das alterações moleculares e índice de DNA. Não houve nenhuma diferença estatística. As barras horizontais nos *Boxplots* representam mediana, valores mínimo e máximo; p-valor calculado pelo teste de *Mann Whitney*.

Nesta série de casos não foi possível obter análises de cariótipo em todas as amostras, estas, no entanto, foram avaliadas através de índice de DNA, utilizado como uma *proxy* para avaliação da ploidia nesses casos. Sendo assim foi realizado o índice de DNA em 81 amostras, sendo 73 casos. Foi avaliado o índice de DNA em relação aos dados clínicos dos pacientes (tabela 5.10). Não foi possível realizar o teste estatístico para as alterações moleculares por conta do número de casos positivos para estas alterações, nos 7 casos *ETV6-RUNX1*, foi observado 4 casos diploides e 3 casos near-diploide, 1 caso foi positivo para *E2A-PBX1*, sendo caracterizado como diploide, nos 5 casos com o rearranjo do *KMT2A* foi observado 2 casos diploides e 3 casos near-diploide, em um caso positivo para *BCR-ABL1* foi identificado índice de DNA altamente hiperdiploide.

Tabela 5.10: Características clínico-demográficas nos casos com identificação da ploidia

Variáveis	Casos ao diagnóstico n (%)	Diplóide	<i>near</i> -Diploide	Altamente hiperdiploide	P valor
Nº de pacientes	73 (100)	35 (48)	19 (26)	19 (26)	
Idade (meses)					0,8059
0-120	62 (84,9)	29 (82,9)	16 (84,2)	17 (89,5)	
>120	11 (15,1)	6 (17,1)	3 (15,8)	2 (10,5)	
Sexo					0,8715
Masculino	42 (57,5)	21 (60)	10 (52,6)	11 (57,9)	
Feminino	31 (42,5)	14 (40)	9 (47,4)	8 (42,1)	
Cor da pele*					0,7096
Branca	32 (44,4)	17 (48,6)	7 (36,8)	8 (44,4)	
Não branca	40 (55,6)	18 (51,4)	12 (63,2)	10 (55,6)	
Leucometria					0,8615
< 50.000	57 (78,1)	28 (80)	14 (73,7)	15 (79)	
≥ 50.000	16 (21,9)	7 (20)	5 (26,3)	4 (21)	
Classificação NCI					0,9125
Alto risco	26 (35,6)	13 (37,1)	7 (36,8)	6 (31,6)	
Risco padrão	47 (64,4)	22 (62,9)	12 (63,2)	13 (68,4)	
Subtipos (EGIL)**					0,1501
B-I	7 (10,3)	3 (9,4)	4 (22,2)	0 (0)	
B-II	54 (79,4)	24 (75)	13 (72,2)	17 (94,4)	
B-III	7 (10,3)	5 (15,6)	1 (5,6)	1 (5,6)	

*Informação não obtida em 1 caso, análise foi feita em 72 casos com informação disponível. ** Não foram possíveis a identificação do subtipo em 5 casos, análise feita em 68 casos. Análise estatística efetuada através do teste do Qui-Quadrado.

5.2.7. Expressão celular do CRLF2 em leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B nas crianças com Síndrome de Down

Nos 5 casos de LLA-cpB em crianças com SD, 40% apresentaram maiores valores nos níveis de expressão celular de CRLF2, porém, pelo baixo número de casos não foi possível gerar poder estatístico para comparação com os casos de LLA-cpB sem SD e variáveis como idade, leucometria, estratificação de risco e alterações moleculares recorrentes, entre os níveis de expressão (baixa, intermediária ou alta) do CRLF2. No entanto, observou-se 1 caso (20%) entre o grupo de percentual intermediário, e 1 caso (20%) entre o grupo de percentual alto. Em relação a IMF, 1 caso (20%) apresentou IMF intermediário e nenhum caso foi

identificado como alto (≥ 2.438). Apesar do número restrito de amostras, é um percentual de casos com expressão mais alta de CRLF2 do que entre pacientes sem SD.

5.2.8. Níveis de expressão celular do CRLF2 entre pacientes com recaída de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B

Foram analisados 10 casos com recaídas, dessa forma essas amostras foram avaliadas de acordo com o percentual e IMF de células positivas para a molécula CRLF2. Observou-se que em relação ao percentual, 8 (80%) casos foram identificados como baixo percentual tanto no diagnóstico como na recaída. Apenas 1 (20%) caso possuía no diagnóstico 0,8% (baixo percentual) de células positivas para o CRLF2 e 93% na recaída, já em relação a IMF tanto no diagnóstico como na recaída esse caso foi caracterizado como baixa expressão. Foi identificado neste caso, alto risco, no diagnóstico o caso foi positivo para *KMT2A* e caracterizado como uma LLA-pró B. Em outro caso foi observado a expressão intermediária com 22% de células positivas para o CRLF2 e na recaída foi identificado 4,7% (baixo percentual) e em relação a IMF foi observado o mesmo perfil (expressão intermediária no diagnóstico e expressão baixa na recaída). Além disso, outros dois casos foram identificados de acordo com IMF a expressão intermediária no diagnóstico e expressão baixa na recaída, no entanto, estes casos tiveram baixo percentual no diagnóstico e recaída. Nenhum caso no diagnóstico foi identificado como alto percentual de CRLF2 e IMF, assim não foi possível demonstrar alguma relação com a presença de CRLF2 na recaída. Portanto não houve uma associação entre os casos ao diagnóstico e as recaídas (como observado na figura 5.12).

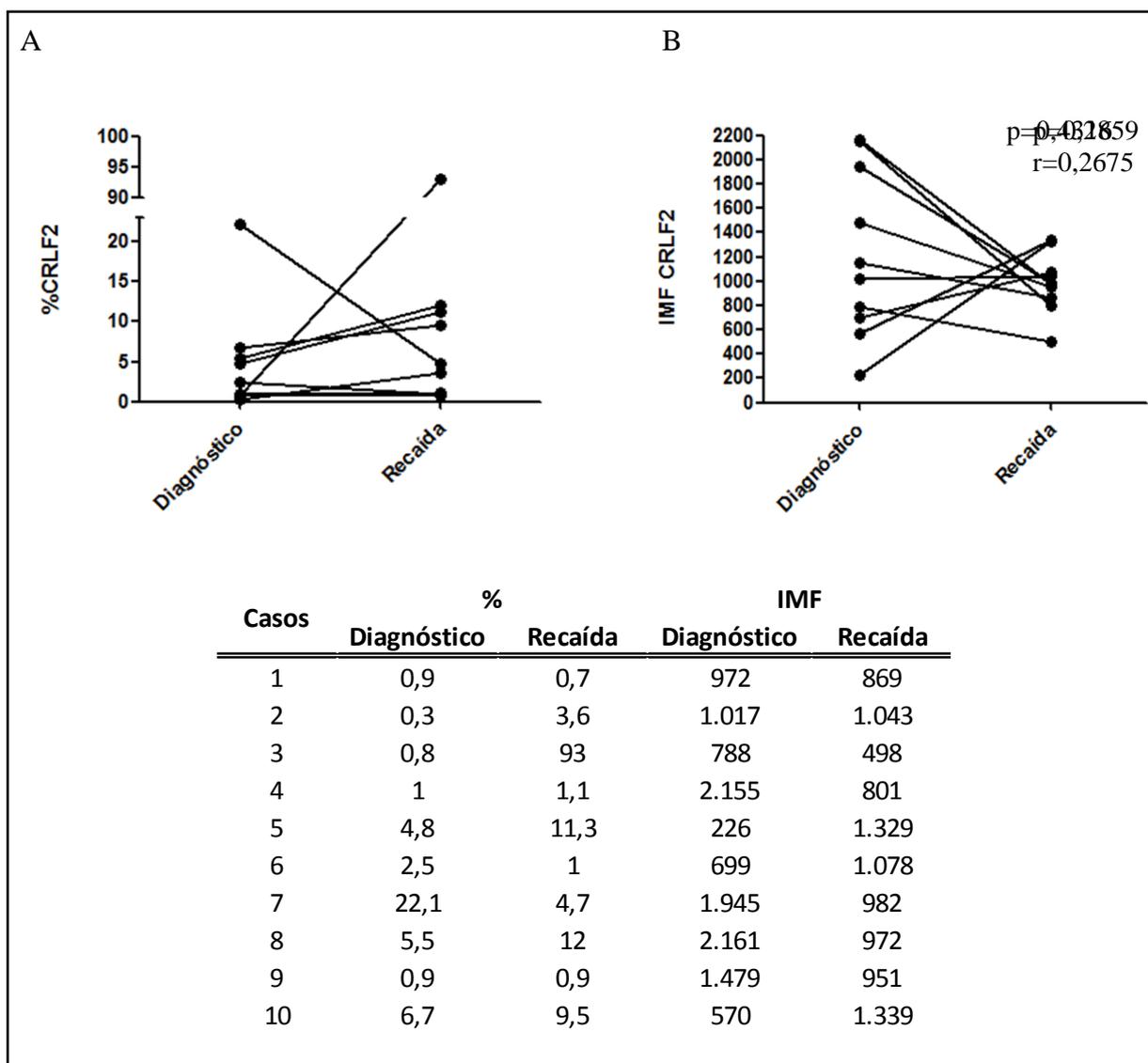


Figura 5.12: Análise de expressão de CRLF2 em amostras de diagnóstico e recaída em relação aos níveis de expressão em percentual (A) e IMF (B). Não houve correlação quando analisado pela IMF. p-valor calculado pelo teste de *Wilcoxon*. Abaixo, os valores de percentuais e IMF das amostras analisadas tanto no diagnóstico, como na recaída.

5.3. Análise de expressão gênica do *CRLF2*

Setenta e cinco amostras foram direcionadas para as análises por RT-qPCR. No entanto, foram possíveis analisar 45 casos de diagnóstico, incluindo 2 de Síndrome de Down. Também foram analisadas 4 amostras de recaída totalizando 49 amostras. Doze amostras foram perdidas por um problema interno do aparelho utilizado (Viia 7) e 14 amostras tiveram resultados acima do limite de variação estipulado entre o *GAPDH* e o *CRLF2* e excluídas das análises.

Realizou-se inicialmente a distribuição de frequência dos 45 casos analisados conforme visto na figura 5.13. A mediana da expressão gênica foi 0,152 (0,085 – 4,819). O *cutoff* foi baseado através da mediana de expressão desses casos, sendo utilizado como baixa expressão valor $< 0,152$ e expressão alta $\geq 0,152$.

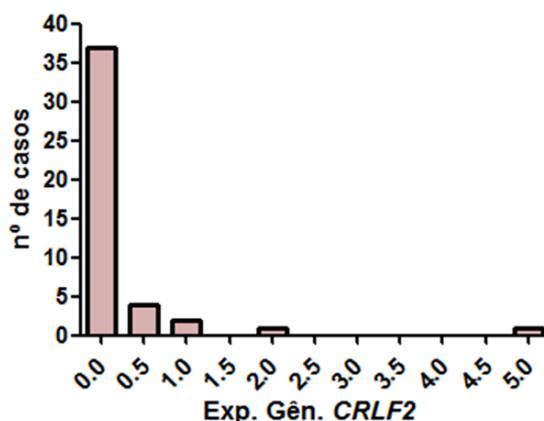


Figura 5.13: Distribuição de frequência da expressão gênica do CRLF2 nos casos de LLA-cpB. Foram analisados quanto à expressão gênica do *CRLF2* dos 45 casos de diagnóstico

Posteriormente analisamos a expressão gênica de acordo com os três subtipos maturativos de LLA-cpB (B-I, B-II, B-III). Dessa forma, foram analisados 44 casos, sendo um caso excluído porque não foi possível identificar o subtipo; 8 casos (18,2%) de LLA-pró B, 28 (63,6%) de LLA-B comum e 8 (18,2%) casos de LLA-pré B. A média da expressão gênica dentre os casos B-I foi 0,1650 (0,0977-0,2810), de B-II foi 0,3674 (0,0960-4,819), já nos casos B-III foi 0,5399 (0,0850-2,230). Os resultados foram semelhantes ao encontrado quando avaliada a expressão celular. Não houve estatística significativa ($P=0,7127$), no entanto, pode ser observado que os casos de LLA-pré B possuem uma expressão gênica maior que em relação ao subtipo Pró-B (Figura 5.14).

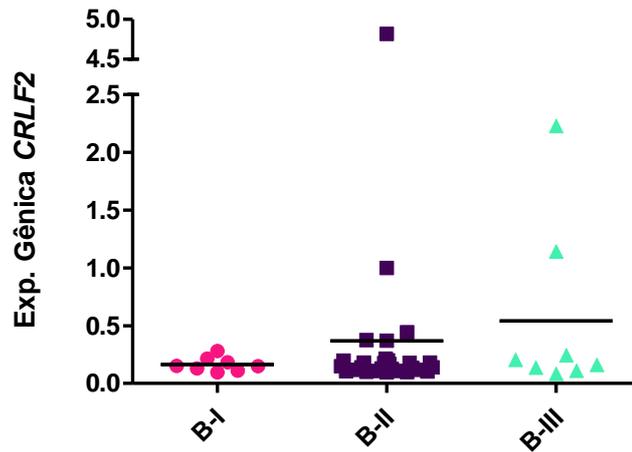


Figura 5.14: Perfil de expressão gênica do *CRLF2* em subtipos de LLA-cpB. As barras horizontais representam a média. P-valor calculado pelo teste *Kruskal-Wallis*. (P=0,7127)

Também foi avaliada a correlação entre a expressão gênica do *CRLF2* e o percentual e IMF da molécula (Figura 5.15). Observou-se através do teste de correlação um valor estatístico significativo entre expressão gênica vs percentual ($p=0,0144$) e expressão gênica vs IMF ($p=0,0313$). Nas duas correlações, de acordo com o teste utilizado, foi observada uma correlação positiva fraca.

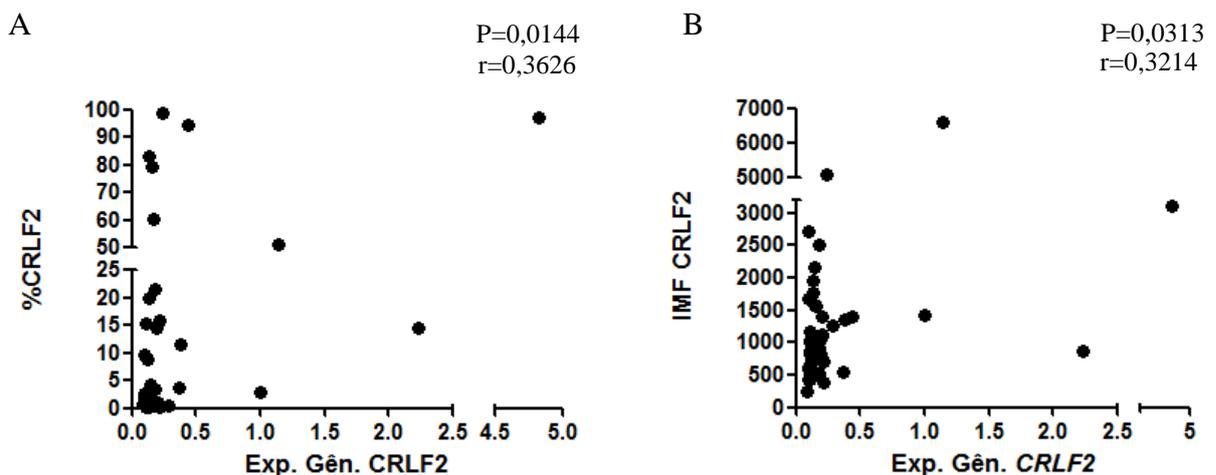


Figura 5.15: Correlação da expressão gênica com os níveis de expressão celular do *CRLF2*. (A) Análise de correlação entre a expressão gênica e o percentual de células positivas, observou-se uma correlação positiva fraca ($r=0,3626$) e p valor significativo ($p=0,0144$). (B) Análise de correlação entre a expressão gênica e a IMF de células positivas com correlação positiva fraca ($r=0,3214$) e p valor significativo ($p=0,0313$). Utilizou-se o teste de *Spearman*.

Realizamos a análise levando em consideração os *cutoff* estabelecidos para percentual baixo, intermediário e alto, verificamos a mediana de expressão gênica dentro da população de baixo percentual foi 0,139 (0,085-2.230) e média 0,238. No grupo de expressão intermediária a mediana foi 0,179 (0,170-1,144) e média 0,497, já no percentual alto foi observado mediana de 0,245 (0,137-4,819) e média 1,161 (P=0,077). Na série de 45 casos analisados por RT-qPCR, 5 casos foram identificados com alto percentual e IMF por CFM. Dentre esses casos, 4 casos (80%) também possuíam expressão gênica alta.

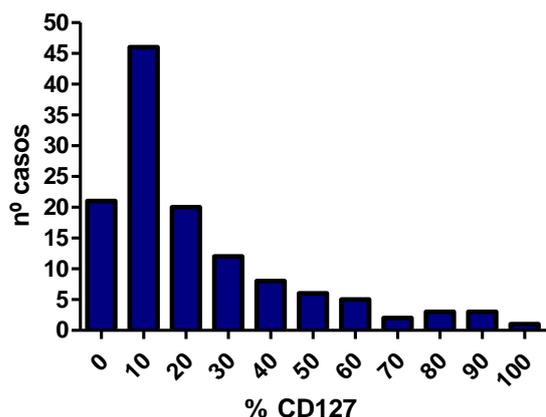
5.4. Análises de imunofenotipagem para CD127

A molécula CD127 ou IL-7R α forma com o CRLF2 um heterodímero que se liga à citocina TSLP. Dessa forma juntamente com a marcação do CRLF2 nas amostras incluídas no presente estudo, também foi realizada a marcação da molécula CD127. Dos 128 casos aqui estudados, apenas um caso foi excluído das análises subsequentes por marcação inespecífica da molécula. A avaliação desse marcador também foi obtida a partir do programa de análise Infinicyt utilizando o percentual e a IMF de células positivas através de *dotplots* e histograma para melhor observar as populações. Para identificar o percentual e IMF foi utilizado como controle negativo o tubo de células não marcadas para o CD127. O percentual de células positivas do CD127 foi avaliado dentro da população dos blastos linfóides, os quais identificados pela marcação dos antígenos CD45 e CD19.

5.4.1. Distribuição de frequência do perfil de expressão do CD127 em relação ao percentual e intensidade mediana de fluorescência

Em relação ao marcador CD127 foi realizado inicialmente as análises de distribuição de frequência (Figura 5.16). Em relação ao percentual foi observada a mediana de expressão 14,1% (0,0-99%). Já em relação a IMF foi observada a mediana de 257,0 (130-5.699).

A



B

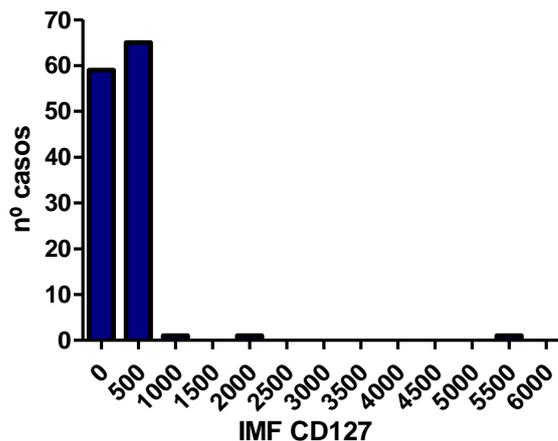


Figura 5.16: Distribuição de frequência do CD127 em relação ao percentual (A) e IMF (B) em blastos linfóides de pacientes com LLA-cpB. Foram analisados 127 casos de diagnóstico.

5.4.2. Correlação entre o percentual e a intensidade mediana de fluorescência

Posteriormente foi realizada a análise de correlação entre o percentual e a IMF dos casos de CD127. Verificou-se que existe uma correlação de $r=0,2511$ com p valor significativo ($p=0,0044$) (Figura 5.17). É possível observar que existe uma variação bastante expressiva em relação ao percentual, no entanto, em relação a IMF, há pouca variação, sendo a maioria dos casos (aproximadamente 95%) com um nível de expressão abaixo de 500.

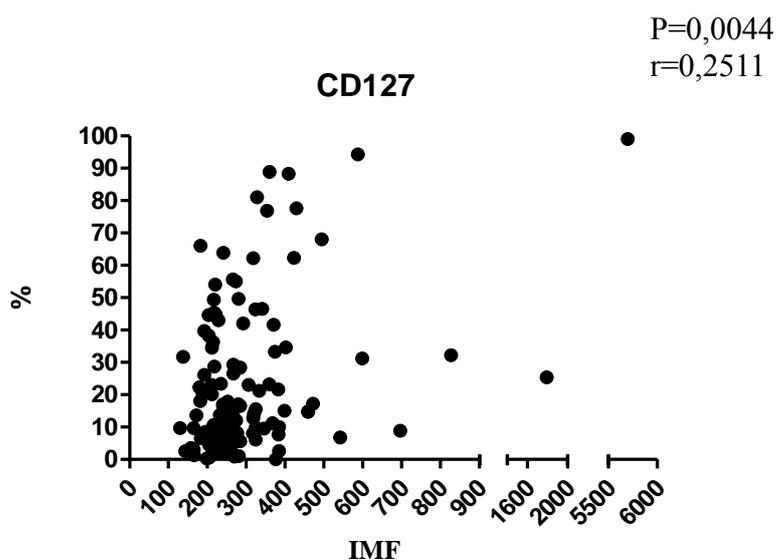


Figura 5.17: Análise de correlação entre o percentual e a IMF das células positivas para o CD127. Para esta análise foi utilizado o teste *Spearman*.

5.4.3. Perfil de expressão celular do CD127 de acordo com as variáveis clínico-demográficas

Foram utilizados os valores de percentis (75 e 95) para identificar os níveis de expressão em relação ao percentual e IMF de células positivas para a molécula, abaixo de 75 percentil é expressão baixa, entre ≥ 75 e < 90 é intermediário e ≥ 90 é alto. Dessa forma dividimos as populações em baixo percentual ($< 30\%$), percentual intermediário (≥ 30 e $< 70\%$) e alto percentual (≥ 70). Em relação a IMF os níveis de expressão foram caracterizados como baixa IMF (< 325), intermediária (≥ 325 e < 424) e alta (≥ 424). Assim, comparamos esses níveis de expressão com as variáveis idade, leucometria, sexo, estratificação de risco e cor da pele (tabela 5.12 e 5.13).

Foi realizado a análise do percentual de células positivas do marcador CD127 de acordo com as variáveis idade em meses, sexo, cor da pele, leucometria e classificação de risco (Figura 5.17). Também foi feita a mesma análise com a IMF para essas variáveis (Figura 5.18).

Não foi possível realizar o teste Qui-Quadrado dos subtipos (B-I, B-II e B-III) e das alterações moleculares. Dos 15 casos de LLA-pró B foram observados 11 (73,3%) casos com baixo percentual da molécula CD127, 3 (20%) de percentual intermediária e 1(6,7%) de percentual alto. Dos 90 casos de LLA-B comum, 70 (77,8%) possuem percentual baixo, 16 (17,8%) percentual intermediário e 4 (4,4%) percentual alto. Dos 15 casos de LLA-pré B, 9 (60%) possuem percentual baixo, 5(33,3%) percentual intermediário e 1 (6,7%) percentual baixo.

Nas demais variáveis clínico-demográficas foi possível observar que dentro da população com alto percentual ($\geq 70\%$) a maioria dos casos (71,4%) são criança abaixo de 11 anos, do sexo masculino e da cor branca. No entanto, não foi obtido nenhum valor estatístico entre elas (tabela 5.12).

Já nos casos de acordo com a IMF dos casos analisados, foi observado que a maioria (91,7%) possuem alta leucometria. Apesar de não ter obtido valor estatístico pode destacar a tendência em relação a idade, visto que 11 casos (91,7%) possuem idade até 10 anos e apenas 1 (8,3%) com idade superior a 10 anos com alta IMF do marcador CD127. Também vale ressaltar que de acordo com a variável de classificação de risco de acordo com o NCI, 83,3% dos casos com IMF alto possuem risco padrão diferentemente do que visto quando analisados em relação aos percentuais do CD127 (Tabela 5.13).

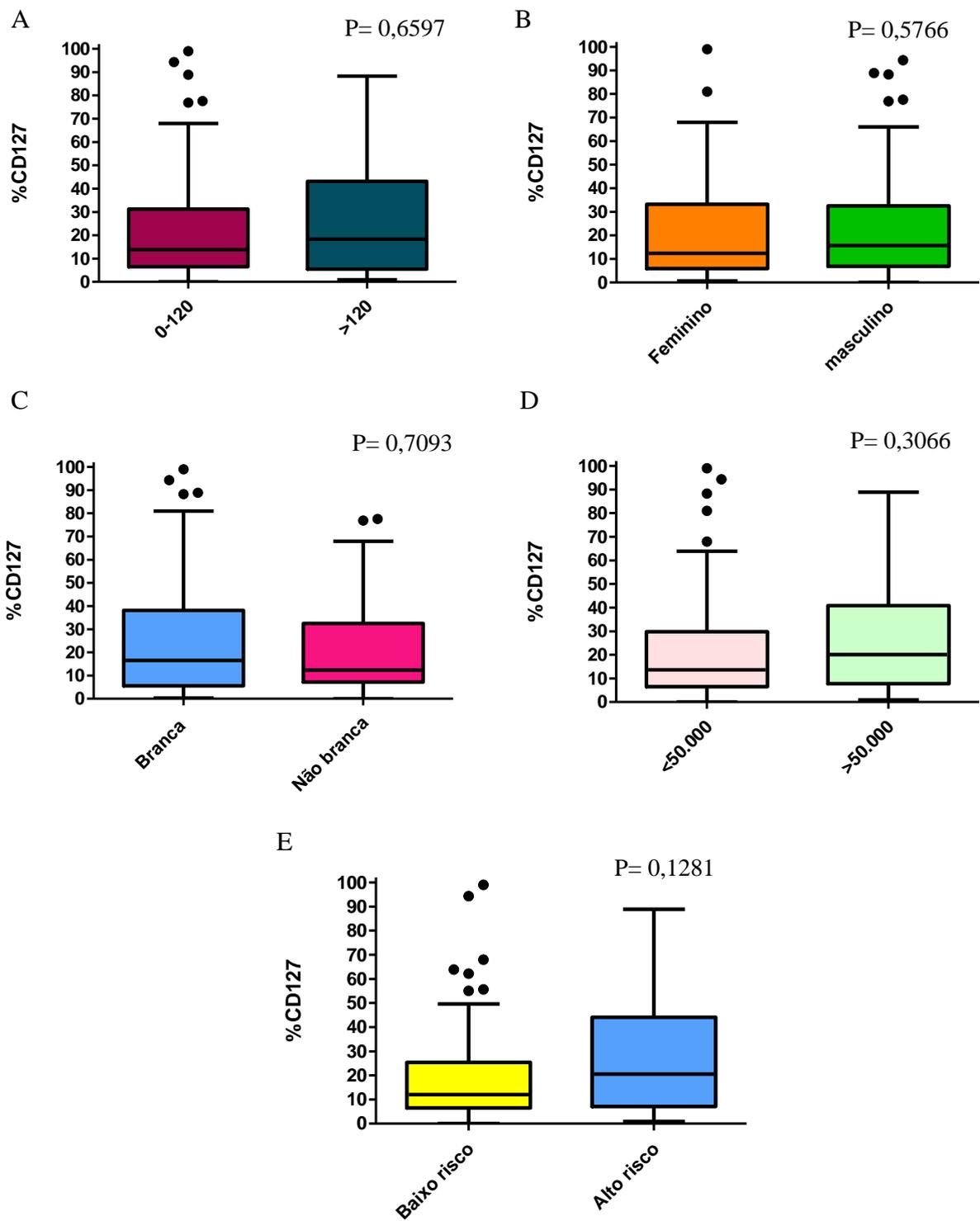


Figura 5.17: Análise do percentual do CD127 de acordo com as variáveis idade em meses (A), sexo (B), cor da pele (C), classificação de risco (D) e leucometria ($\times 10^6$ céls/mL) (E). As barras horizontais nos *boxplots* representa mediana, valores mínimo e máximo. P-valor calculado pelo teste *Kruskal-Wallis*.

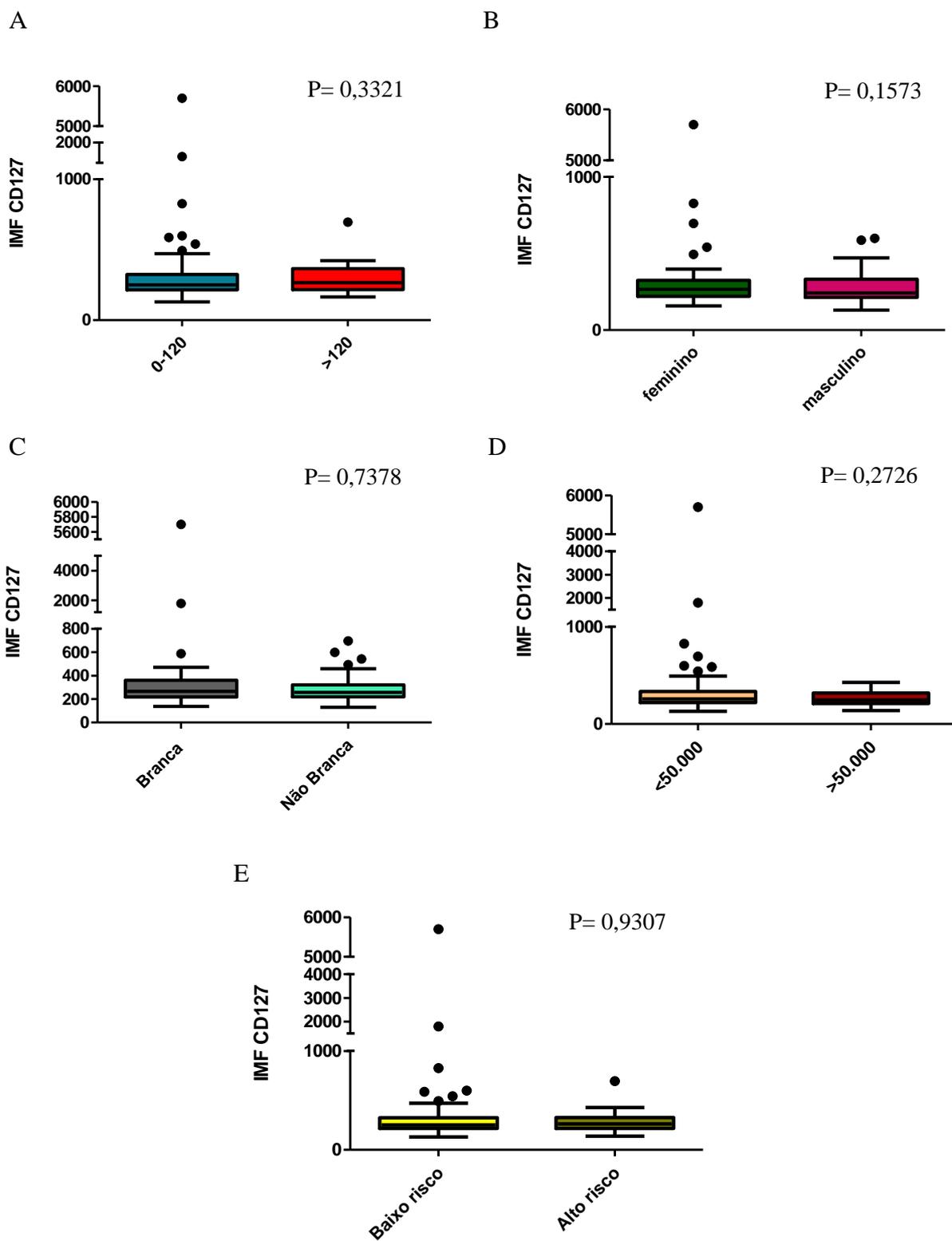


Figura 5.18: Análise da IMF do CD127 de acordo com as variáveis idade em meses (A), sexo (B), cor da pele (C), classificação de risco (D) e leucometria ($\times 10^6$ céls/mL) (E). As barras horizontais nos *boxplots* representa mediana, valores mínimo e máximo. P-valor calculado pelo teste *Kruskal-Wallis*

Tabela 5.12: Comparação das variáveis clínico-demográficas de acordo com o perfil de expressão celular em percentual do CD127

Variáveis	n (%)	<30% n(%)	≥30% e <70% n(%)	≥70% n(%)	P valor
Nº de pacientes	127 (100)	93 (77,2)	27 (21,3)	7 (5,5)	
Idade (meses)					0,6716
0-120	103 (81,1)	77 (82,8)	21 (77,8)	5 (71,4)	
>120	24 (18,9)	16 (17,2)	6 (22,2)	2 (28,6)	
Sexo					0.7381
Masculino	73 (57,5)	53 (57)	15 (55,5)	5 (71,4)	
Feminino	54 (42,5)	40 (43)	12 (45,5)	2 (28,6)	
Cor da pele*					0,3473
Branca	57 (46,3)	41 (46,1)	11 (40,7)	5 (71,4)	
Não branca	66 (53,7)	48 (53,9)	16 (59,3)	2 (28,6)	
Leucometria					0,3598
< 50.000	98 (77,2)	74 (79,6)	20 (74,1)	4 (57,1)	
≥ 50.000	29 (22,8)	19 (20,4)	7 (25,9)	3 (42,9)	
Classificação NCI					0,0547
Alto risco	48 (37,8)	30 (32,3)	13 (48,1)	5 (71,4)	
Risco padrão	79 (62,2)	63 (67,7)	14 (51,9)	2 (28,6)	

Observação: *Informação não obtida em 4 casos, a análise foi feita a partir dos 124 casos sobre os quais tínhamos informação. Análise estatística efetuada através do teste do qui-quadrado

Tabela 5.13: Comparação das variáveis clínico-demográficas de acordo com o perfil de expressão celular em IMF do CRLF2

Variáveis	n (%)	<325 n(%)	≥325 e <424 n(%)	≥424 n(%)	P valor
Nº de pacientes	127 (100)	96(75,6)	19 (15)	12 (9,4)	
Idade (meses)					0,0751
0-120	103 (81,1)	80 (83,3)	12 (63,2)	11 (91,7)	
>120	24 (18,9)	16 (16,7)	7 (36,8)	1 (8,3)	
Sexo					0,9969
Masculino	73 (57,5)	55 (57,3)	11 (57,9)	7 (58,3)	
Feminino	54 (42,5)	41 (42,7)	8 (42,1)	5 (41,7)	
Cor da pele*					0,1104
Branca	57 (46,3)	39 (42,4)	13 (68,4)	5 (41,7)	
Não branca	66 (53,7)	53 (57,6)	6 (31,6)	7 (58,3)	
Leucometria					0,4288
< 50.000	98 (77,2)	72 (75)	15 (79)	11 (91,7)	
≥ 50.000	29 (22,8)	24 (25)	4 (21)	1 (8,3)	
Classificação NCI					0,1313
Alto risco	48 (37,8)	36 (37,5)	10 (52,6)	2 (16,7)	
Risco padrão	79 (62,2)	60 (62,5)	9 (47,4)	10 (83,3)	

Observação: *Informação não obtida em 4 casos, a análise foi feita a partir dos 124 casos sobre os quais tínhamos informação. Análise estatística efetuada através do teste do qui-quadrado.

5.4.4. Correlação entre os níveis de expressão das moléculas CRLF2 e CD127

Realizou-se a correlação entre os níveis de expressão dos marcadores CRLF2 e CD127 de acordo com os percentuais (Figura 5.19a) e a IMF (Figura 5.19b). Não houve nenhuma correlação entre os dois marcadores.

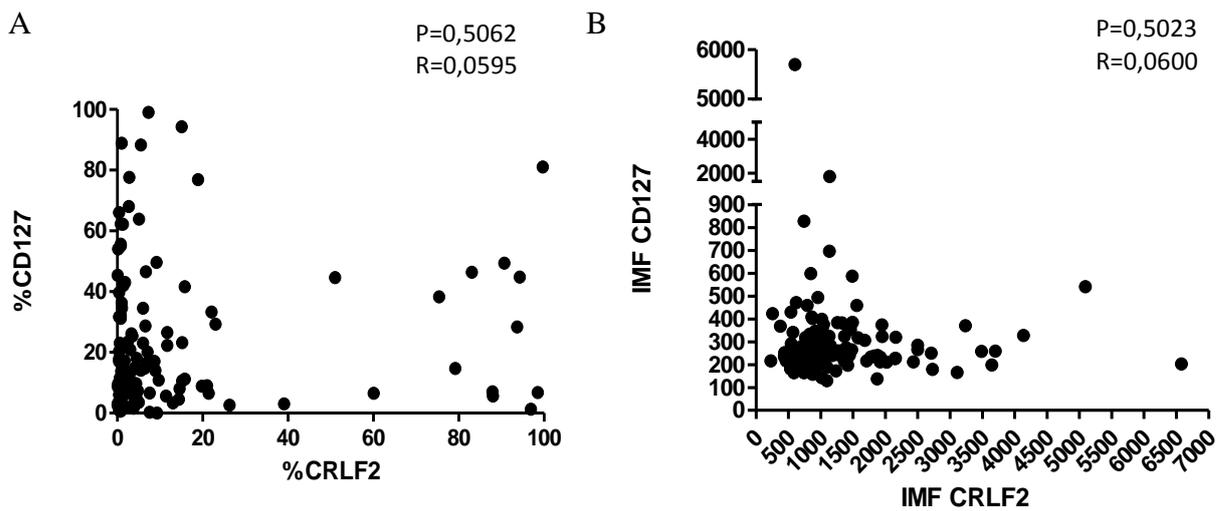


Figura 5.19: Correlação entre a expressão dos marcadores CRLF2 e CD127. (A) Feita a correlação entre os percentuais de células marcadas para CRLF2 e CD127. Não tendo sido observada diferença estatística significativa ($p=0,5062$) e ausência de correlação ($r=0,0595$). (B) Feita a correlação entre as IMF de células positivas para o CRLF2 e CD127. Não tendo sido observada diferença estatística significativa ($p=0,5023$) e ausência de correlação ($r=0,0600$). Para esta análise foi utilizado o teste *Spearman*.

Dessa forma foi proposto um algoritmo de testes, com inserção de marcadores imunofenotípicos para caracterizar a LLA-cpB e abordagens moleculares importantes para definição completa desses casos (Figura 5.20).

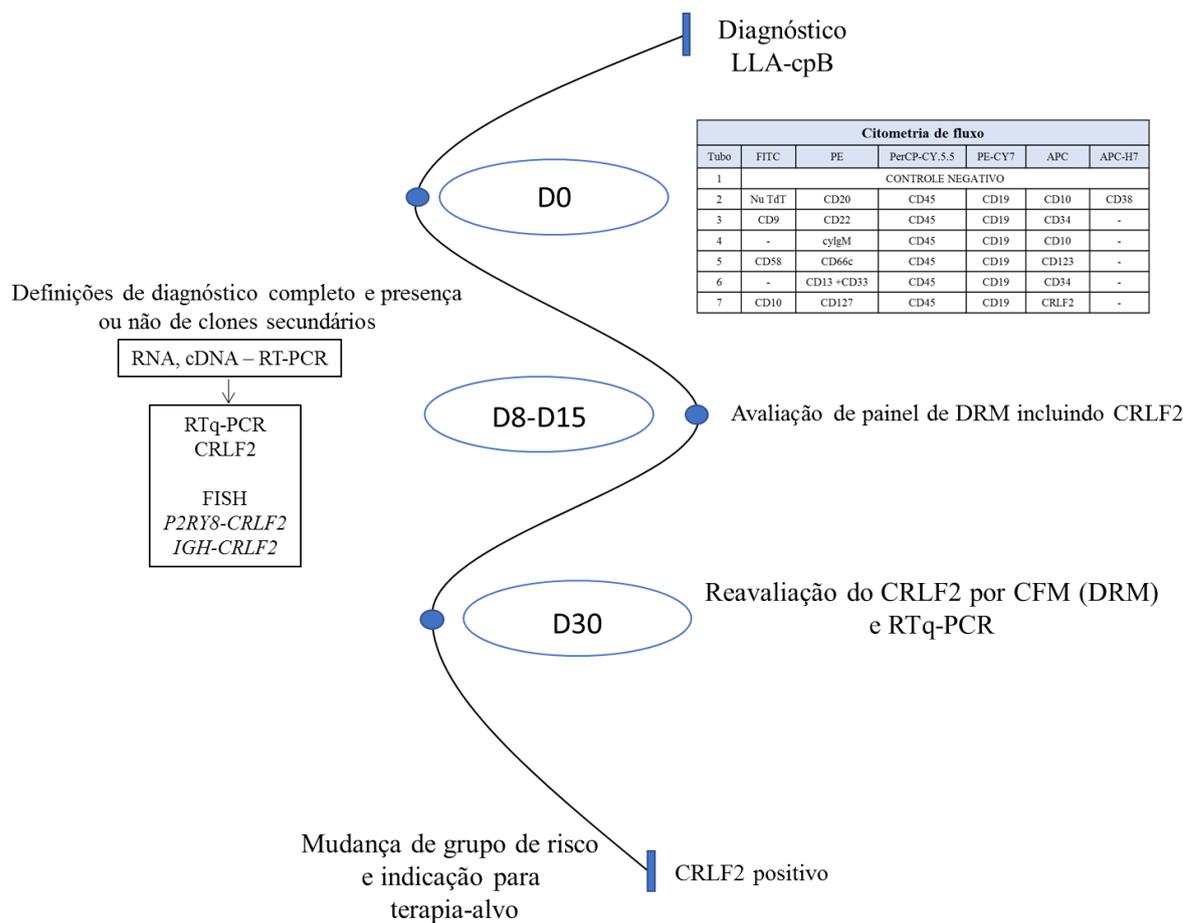


Figura 5.20: Algoritmo de testes para a identificação da alta expressão do CRLF2. O diagnóstico imunofenotípico é realizado no D0 com a realização do painel completo para definição de subtipo de LLA-cpB, posteriormente ao processamento da amostra será realizado os testes moleculares utilizando o RT-PCR para as alterações mais frequentes dentro desse grupo (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* e *r-KMT2A*). Visto a importância do RT-qPCR, será realizado para verificar a expressão diferencial do *CRLF2* e o FISH para os rearranjos mais comuns envolvendo este gene (*P2RY8-CRLF2* e *IGH-CRLF2*). Por fim, será reavaliado a expressão do CRLF2 por CFM e o RT-qPCR na DRM D30.

6. DISCUSSÃO

As LLA-cpB possuem anormalidades genéticas somáticas consideradas como alterações fundadoras no processo de leucemogênese. Estas alterações identificadas através das técnicas de CFM, citogenética convencional ou molecular são relevantes para estabelecer valor prognóstico. Apesar do sucesso ao tratamento em LLA-cpB, demonstrado por diversos protocolos internacionais, ainda existe um subgrupo de pacientes que evoluem com recaídas (precoces ou tardias) com falha no tratamento e conseqüentemente sobrevida média diminuída (MOORMAN, *et al.* 2015). No Brasil, o panorama ainda é sombrio, pois as taxas de sobrevida e mortalidade ainda estão com índices inferiores aos obtidos com os resultados dos países mais desenvolvidos (BRANDALISE, *et al.* 2010; FERMAN, *et al.* 2012). Enquanto a frequência e relevância da identificação de alterações genômicas adicionais vêm sendo extensivamente investigadas e incorporadas na prática dos protocolos internacionais, muito pouco se conhece sobre a frequência e impacto da expressão celular de *CRLF2* como fator de prognóstico.

A partir da análise dos dados da literatura foi possível verificar diferentes resultados sendo descritos em relação a expressão de *CRLF2*. Nesse aspecto, a frequência da presença dos rearranjos envolvendo o *CRLF2* e a alta expressão desse gene variou de 2,2% até 34,3% dos casos (HARVEY, *et al.* 2010b; MULLIGHAN, *et al.* 2009b; RUSSELL, *et al.* 2009; YODA, *et al.* 2010; CARIO, *et al.* 2010; ENSOR, *et al.* 2011; CHEN, *et al.* 2012; PALMI, *et al.* 2012; KIYOKAWA, *et al.* 2014; CHIARETTI, *et al.*, 2016). Para prognóstico também têm sido descritos resultados discrepantes, alguns estudos sugerem que a expressão aumentada do *CRLF2* é um marcador de prognóstico com desfecho desfavorável (CARIO, *et al.* 2010; HARVEY, *et al.* 2010b), enquanto outros discutem que o *CRLF2* não é um fator de risco independente (ATTARBASCHI, *et al.* 2012; BUITENKAMP, *et al.* 2012; VAN DER VEER, *et al.* 2013; ENSOR, *et al.* 2011). Para alguns grupos a alta expressão gênica de *CRLF2* pode ser determinada só pela presença dos rearranjos gênicos onde o *CRLF2* está envolvido, como *P2RY8-CRLF2* e *IGH-CRLF2* (RUSSELL, *et al.* 2009; MULLIGHAN, *et al.* 2009). No entanto, já foi demonstrado que pacientes que não possuem estes rearranjos gênicos têm a expressão gênica aberrante do *CRLF2*, portanto, a ausência desses rearranjos em uma abordagem única não exclui a possibilidade do paciente possuir a expressão aumentada do gene (VAN BODEGOM, 2012; CHEN, *et al.* 2012; YANO, *et al.* 2014).

Estes resultados discordantes poderiam ser explicados pelas diferentes metodologias utilizadas para a definição da expressão de *CRLF2*, seja pela presença dos rearranjos *P2RY8-*

CRLF2 e *IGH-CRLF2* (por FISH), a alta expressão gênica de *CRLF2* por RT-qPCR e aumento da expressão celular quantitativa e qualitativa por CFM, o que enfatiza assim o requisito de definições nas padronizações dos protocolos terapêuticos. Nesse contexto, nosso estudo teve como foco principal a utilização da CFM para identificar os casos com alta expressão de *CRLF2* comparado com RT-qPCR para compreender a melhor forma de identificar o *status* do *CRLF2* na superfície celular nas amostras de LLA-cpB no nosso meio.

Portanto, testamos a frequência da expressão celular diferencial do *CRLF2* em uma série de casos de LLA-cpB no Brasil. As análises foram inicialmente realizadas por CFM. O percentual de células marcadas definidas como positivas e a IMF das células que expressam *CRLF2* foram os primeiros passos do estudo. O *cutoff* para positividade do *CRLF2* foi definido em <20%, ou seja, acima desse valor consideramos que a amostra é positiva para *CRLF2*. Encontramos diferentes padrões de expressão tanto nas análises utilizando o percentual de expressão e IMF. Os resultados foram então categorizados como de percentual baixo ou negativos nos níveis <20%, percentual intermediário e alto. Nem todos os padrões do IMF foram correspondentes as categorias pré-estabelecidas nos valores percentuais, o que foi traduzido pela correlação fraca encontrada. Levando-se em conta esse resultado, é importante mencionar que entre os pacientes com alto percentual observamos aqueles com IMF também alto/intermediário, traduzindo uma alta densidade de *CRLF2* na maioria dos casos positivos. No entanto, nos casos onde foram encontrados valores de percentual baixos, com uma IMF alta/intermediária, temos claramente a presença de duas populações com diferentes níveis de expressão, nestes casos consideramos estes resultados como um clone minoritário, que apresenta uma alta densidade de expressão celular. Assim como utilizado no trabalho BUGARIN, *et al* (2015), avaliou a expressão de superfície do *CRLF2* em 421 casos de diagnóstico e realizou a mesma estratégia de análise, sendo também explorada a IMF e observados 3 padrões de expressão nos casos negativos (no qual o *cutoff* de positividade do *CRLF2* foi definida em <10%), sendo denominados como casos totalmente negativos quando a população blástica sobrepõe o controle negativo, moderadamente positivo quando uma população de blastos estava deslocada para a direita e o terceiro padrão mostrando claramente duas populações de blastos, uma totalmente negativa e uma pequena população deslocada para a direita, sendo positiva. Este perfil de expressão está de acordo com o que observamos nas amostras com percentual baixo. Neste trabalho também foi visto que em alguns dos casos negativos, com presença de subclones identificados por citometria, foi encontrado um pequeno nível basal de fosforilação no STAT5 (pSTAT5), que seria o final da via de

sinalização do CRLF2, sugerindo de forma mais forte a presença de subclone com alta expressão do CRLF2 (BUGARIN, *et al.* 2015).

Demonstramos também a diferença entre os casos LLA-pró B (B-I) e LLA-pré B (B-III) ($p=0,0237$), tendo sido observado que os casos B-I possuem uma mediana de expressão mais baixa (1,2%) e em 15 (100%) casos com este subtipo foi visto baixa expressão (<20%) enquanto pacientes B-III possuem mediana mais alta (6,7%). Encontramos também uma associação positiva entre a alta expressão celular do CRLF2 em pacientes com idades superiores a 10 anos ($p=0,0482$), o que colabora com o fato deste grupo já ter características de alto risco pela classificação NCI. Para complementar nossa investigação incluímos análises incorporando o CD66c.

A molécula CD66c tem sido alvo de estudos onde está é relacionada à expressão aumentada de *CRLF2*. Foi observada uma alta frequência da expressão do CD66c em casos com alta expressão para o *CRLF2*, conforme descrito por Kiyokawa ilustrado na figura 6.1. Além disso, também foi observado que casos apresentando outras alterações moleculares encontradas no grupo *PH-like* tendem a expressar frequentemente o CD66c identificado pelos painéis de CFM. (KIYOKAWA, *et al.* 2014).

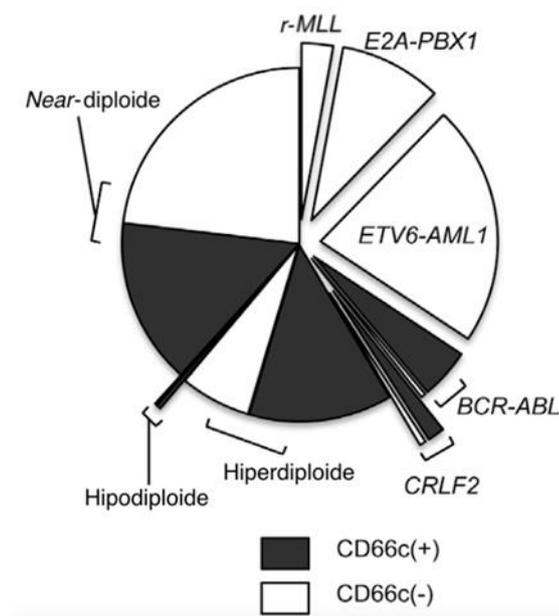


Figura 6.1: Expressão do CD66c e correlação com anormalidades genéticas. (adaptado Kiyokawa, 2014)

Em nosso estudo verificamos que 71,4% dos casos com alta expressão do CRLF2 possuem marcação positiva para o CD66c. Embora a expressão do CD66c sozinho no diagnóstico de LLA-cpB ainda não seja diretamente vinculada ao prognóstico, as anormalidades genômicas que acompanham a expressão do CD66c são importantes fatores de prognóstico em LLA-cpB. A identificação de novos marcadores genéticos hoje é fundamental para evidências de prognósticos e preditivos em LLA-cpB com indicações de estratégias terapêuticas. A identificação de um perfil preditivo de alterações genômicas somáticas podem ser realizadas por uma técnica mais rápida e direta como a citometria de fluxo. Por exemplo, o CD66c também possui uma forte correlação com a ausência do *ETV6-RUNX1*, além de ter sido observado que aproximadamente 30% dos pacientes que expressam CD66c apresentam alta hiperdiploidia (OWAIDAH, *et al.* 2008; KIYOKAWA, *et al.* 2014; HRUSAK, 2002; KALINA, *et al.* 2005). Funcionalmente a molécula CD66c está envolvida na adesão, contribui com a sinalização mediada por Ca²⁺ e está envolvida com a indução da apoptose, no entanto, o significado biológico dessa molécula para intervenção terapêutica em LLA-cpB ainda não é totalmente compreendida (KANDEROVÁ, *et al.* 2010; KLEIN, *et al.* 1996).

Em nosso estudo verificamos os diferentes perfis de expressão do CRLF2 nas alterações moleculares mais frequentes em LLA-cpB, como *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*, *r-KMT2A* e hiperdiploidia. Encontramos valor significativo em pacientes sem a fusão *ETV6-RUNX1*, sendo mostrado que o *CRLF2* é pouco expresso na presença desta anormalidade (p=0,0298). Este resultado está de acordo com dados da literatura, onde foi demonstrada relação significativa entre pacientes com a alta expressão de CRLF2 e ausência da fusão *ETV6-RUNX1* (CARIO, *et al.*, 2010). Em relação aos casos com *r-KMT2A*, não foram encontrados casos com alta expressão de CRLF2 na presença desse rearranjo, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significante. Nos pacientes com *TCF3-PBX1* e *BCR-ABL1*, não foi possível realizar o teste estatístico, pois foi encontrada positividade para esses rearranjos em apenas 2 e 1 caso, respectivamente. Nos casos hiperdiploides, a maioria (84,2%) apresentou expressão baixa do CRLF2, no entanto, 2 casos (10,5%) foram altamente expressos e 1 (5,3%) teve percentual intermediário do CRLF2, não houve associação estatística entre esses casos. Em relação aos rearranjos gênicos, esses resultados já eram esperados já que o aumento da expressão do gene CRLF2 tem sido observado dentro de um grupo sem essas anormalidades frequentemente encontradas em LLA-cpB (RUSSELL, *et al.* 2009; YODA, *et al.* 2010). No entanto, a presença de pacientes com expressão intermediária ou alta do CRLF2 no grupo com alta hiperdiploidia será melhor estudada, sendo avaliada nestes casos a expressão gênica e prognóstica. ENSOR, *et al.* (2011) mostrou presença da alta

hiperdiploidia e do *iAMP21* em 10% e 12% respectivamente dos casos com rearranjos *P2RY8-CRLF2* e *IGH-CRLF2*.

O índice de DNA foi utilizado com uma *proxy* dentro dos casos de LLA-cpB já que não foi avaliado o cariótipo em toda a população deste estudo. Não foi vista nenhuma relação entre as variáveis idade, leucometria, classificação de risco de acordo com o NCI, sexo, cor de pele e subtipo maturativo em LLA-cpB, além dos casos com a expressão aumentada do *CRLF2*. Ainda assim, o índice de DNA realizado por CFM é uma metodologia eficaz para identificar até clones minoritários aneuploides que não podem ser identificados no bandeamento G (NYGAARD, *et al.* 2006). Os subclones também foram avaliados em relação ao percentual de *CRLF2*, no entanto, os únicos dois casos hiperdiploides (ID = 1,17 e 1,19) e que também possuíam o alto percentual de expressão do *CRLF2* possuíam clones únicos. Não foi possível confirmar a hiperdiploidia desses casos por outra técnica, pois eles não possuem resultados de cariótipo. Outro caso também plausível para a discussão e confirmação por uma técnica alternativa, é aquele com hiperdiploidia e a presença do rearranjo *BCR-ABL1*, no qual foi observado índice de DNA 1,32 em clone único.

Crianças com SD possuem uma alta taxa de LLA, estes pacientes são principalmente de linhagem B e possuem imunofenótipo ao diagnóstico similares a alta hiperdiploidia e *ETV6-RUNX1*. Além disso, podem ser especialmente sensíveis aos efeitos tóxicos das medicações. Ainda não é clara a razão pela qual os pacientes com LLA-SD não possuem resultado mais favorável do que pacientes com LLA sem SD, no entanto, tem sido sugerido que o ganho de sensibilidade aumentada de células leucêmicas para a quimioterapia é compensado por um aumento da toxicidade das células normais (MALINGE, *et al.* 2009). A toxicidade é marcada pelo aumento de infecções e morte durante os períodos de tratamento com a quimioterapia (WHITLOCK, *et al.* 2006; SHAH, *et al.* 2009). Em um estudo do *Children's Cancer Group* (CCG) foi demonstrado que a redução acentuada da quimioterapia pode ser um erro nesses pacientes, a sobrevida em crianças com LLA-SD tratados por protocolos intensivos de quimioterapia ajustados ao risco foi surpreendentemente boa. Os resultados desse trabalho sugerem que a intensificação da terapia para pacientes com SD é necessária para manter o resultado comparável com aqueles de LLA em pacientes sem SD. Sendo assim a importância de estratificar o risco do paciente com a SD (WHITLOCK, *et al.* 2005). Além disso, tem sido observado que em pacientes com SD a expressão gênica aumentada e/ou rearranjos moleculares envolvendo o *CRLF2* ocorre em mais de 50% dos casos em LLA-cpB (RUSSELL, *et al.* 2009; IZRAELI, 2010; HERTZBERG, *et al.* 2010; MULLIGHAN, *et al.* 2009b) e está associada com pior prognóstico (CARIO, *et al.* 2010; HARVEY, *et al.* 2010b;

YODA, *et al.* 2010; ENSOR, *et al.* 2011). Avaliamos em nossa população 5 casos de LLA-SD, destes, 2 (40%) tiveram percentual alto/intermediário do CRLF2. Não foi possível realizar teste estatístico pelo pequeno número de casos com SD, no entanto, foi observado que 8,1% dos casos sem SD tiveram alta expressão do CRLF2, sugerindo uma tendência nos casos com SD de possuírem uma frequência maior da expressão aberrante do CRLF2. Em nosso estudo também foi avaliada a presença das alterações moleculares mais frequentes em LLA-cpB. De acordo com a literatura, a hiperdiploidia e a fusão *ETV6-RUNX1* são mais frequentes neste grupo de pacientes com SD. Em 3 casos foi mostrado a ausência dessas duas alterações, nos outros dois casos a fusão *ETV6-RUNX1* não foi realizada e a alta hiperdiploidia foi encontrada em um caso. De acordo com a estratificação de risco NCI, foram observados 4 casos com risco padrão e 1 caso de alto risco, sendo neste último visto alto percentual de expressão do CRLF2.

Não se sabe ainda porque a expressão aberrante do *CRLF2* é tão comum em pacientes com SD em comparação com pacientes que não possuem essa síndrome genética. Foi sugerido que as células que expressam CRLF2 sejam selecionadas pelo aumento da produção de TSLP na MO, no entanto, isso ainda não foi demonstrado (IZRAELI, 2016). A ativação da via de sinalização CRLF2-JAK-STAT na maioria dos casos de SD sugere um potencial terapêutico para os inibidores de JAK, se confirmado em ensaios clínicos, esta terapia poderia ser utilizada como alvo terapêutico para essas crianças com SD. Mutações JAK2 estão presentes em aproximadamente 20% dos pacientes com SD, já foi relatado que pacientes com SD e mutação em JAK2 foram significativamente observados em pacientes mais jovens (média de idade, 4,5 vs 8,6, $P < 0,0010$) no momento do diagnóstico (MALINGE, *et al.* 2007; BERCOVICH, *et al.*; 2008; KEARNEY, *et al.* 2009). Assim, estes resultados sugerem que as mutações de JAK2 são um evento genético adquirido após o nascimento, que surge em progenitores linfoides B já comprometidos, conferindo uma vantagem proliferativa a estas células. Juntos, estes resultados não apenas proporcionam lesões moleculares específicas de LLA-SD, mas também sugerem que estas leucemias são candidatas para terapia com novos inibidores de JAK2 (MALINGE, 2009).

Em relação as amostras de recaída não foram observadas nenhuma associação entre o perfil de expressão do CRLF2 no diagnóstico nem na recaída, visto que a maioria dos casos possuem baixa expressão tanto por percentual, como por IMF. Esses casos também serão estudados em relação a mutações dentro do grupo *BCR-ABL1-like*, já que 5 pacientes (50%) estudados em nosso trabalho não apresentavam nenhum marcador de prognóstico. Dentro da série de casos estudados ao diagnóstico, verificou-se que 48 pacientes (37,5%) obteve a

classificação de risco NCI como baixo (risco padrão), no entanto, os pacientes que recaíram foram enquadrados em 80% como alto risco (de acordo com os critérios NCI).

No segundo momento, estabelecemos através do RT-qPCR, quais casos com expressão gênica aumentada e finalmente procuramos estabelecer se existe associações entre os resultados de forma a otimizar a CFM na identificação dos casos com expressão alta do *CRLF2*.

Para definir o *cutoff* foi utilizado a mediana de expressão para distinguir do grupo *CRLF2* alto do grupo de baixa expressão. PALMI e colaboradores consideraram como alta expressão gênica a quantidade de vezes que o valor estava maior que a mediana (PALMI, *et al.* 2012; 2016). Já outro grupo CHIARETTI, 2016 rastreou os casos que apresentam o rearranjo do *CRLF2* (*P2RY8-CRLF2* e *IGH-CRLF2*) e que conhecidamente teriam alta expressão gênica e dessa forma estabeleceu um *cutoff* para distinguir os casos altamente expressos do grupo com baixa expressão. Outro estudo investigou a alta expressão gênica do *CRLF2* em pacientes adultos, onde ele encontrou mediana do $\Delta Ct=9,98$ (1,5-17,3) e estabeleceu um *cutoff* $\Delta Ct=8$ previamente descrito por CHEN, *et al.* 2012. Em nosso trabalho utilizamos a mediana e posteriormente iremos confirmar e estabelecer o melhor ponto de corte de acordo com a positividade dos rearranjos envolvendo o *CRLF2*.

Não houve uma correlação forte entre eles, o que pode ser explicado pelo baixo número de amostras realizadas por RT-qPCR, além disso, erros no controle pós-transcricional poderiam explicar a diferenças no padrão de expressão gênica e celular de algumas amostras. O aumento do N amostral poderia contribuir com uma melhor análise de nossos resultados.

É difícil prever mais biomarcadores clinicamente possíveis emergentes do subgrupo *BCR-ABL1-like* embora muitos trabalhos têm estudado o prognóstico relevante das anormalidades secundárias presentes neste subgrupo genético como a deleção de *IKZF1* e mutação na via RAS. Além disso, tem sido recentemente estudado o marcador CD127 ou como mais conhecido, IL7R em LLA-cpB, no entanto, já foi bem estudado em relação aos casos LLA-T, em que mutações de IL7R tem sido observada em 7,2% desses pacientes e também mais frequentemente em pacientes com LLA de células precursoras T precoces (LLA-ETP) ocorrendo em 27,3%, além disso, a expressão alta ou intermediária do marcador CD127 visto por CFM teve associação com casos com mutações N-KRAS (P=0,02) (NORONHA, 2016). Recentemente esse marcador tem sido explorado por estar envolvido na via da citocina TSLP. Em nosso trabalho estudamos a expressão deste marcador por CFM a

fim de verificar a correlação com os casos que apresentam alta expressão do CRLF2. No entanto, não foi vista nenhuma correlação entre a expressão das duas moléculas, tanto por percentual ($r=0,0595$) como pela IMF ($r=0,0600$). Ainda comparamos a expressão do CD127 de acordo com as variáveis idade, leucometria, sexo, classificação de risco NCI e cor da pele, foi observada uma tendência nos casos com o percentual alto do CD127, entre os quais, 71,4% (5/7) dos casos apresentam classificação de alto risco de acordo com o NCI, comparados a percentuais mais baixos entre os grupos com percentual baixo e intermediário, mas não houve resultado significativo ($p=0,0547$).

Em nosso trabalho ainda não foi possível realizar o estudo de sobrevida dos pacientes e buscar o *follow-up*, no entanto, este trabalho ainda terá continuidade e isso será fundamental para o melhor entendimento da alta expressão do CRLF2 definida pela CFM e pelo RT-qPCR. Além disso, também será avaliada a presença de mutações de JAK e IL-7R, o que contribuirá para melhor compreensão dos nossos casos, visto que foi demonstrado que casos com alta expressão do gene *CRLF2* possuem associação com algumas translocações crípticas envolvendo outras tirosinas quinases (*ABL1*, *EPOR*, *JAK*) e mutações de ativação de *JAK1* e *JAK2* e deleções de *IKZF1* e parece correlacionar-se com um perfil genético semelhante a *BCR-ABL1-like* e um desfecho desfavorável (ROBERTS, *et al.* 2011). Alguns trabalhos sugerem que mutações principalmente em *JAK2* estão fortemente associadas com a expressão gênica aumentada do *CRLF2* em LLA-cpB, incluindo casos de LLA-SD (RUSSELL, *et al.* 2009; MULLIGHAN, *et al.* 2009; HERTZBERG, *et al.* 2009; HARVEY, *et al.* 2010).

Embora ainda não exista consenso em relação a CRLF2 ser um marcador prognóstico robusto, ele é um alvo terapêutico atraente particularmente no contexto de pacientes com SD que são propensos aos efeitos secundários tóxicos da quimioterapia. Portanto, a inibição das vias JAK e PI3K representa estratégias terapêuticas potenciais nestes casos (ROBERTS, *et al.* 2012; 2014). Várias novas terapias direcionadas podem contribuir para uma melhoria no resultado do tratamento em crianças de LLA-cpB. A expressão na superfície celular do CRLF2 pode ser um potencial alvo para terapias baseadas em anticorpos anti-CRLF2. Além disso, o uso da CFM poderia contribuir para identificação do grupo *BCR-ABL1-like* com maior rapidez, nos casos com alta expressão de CRLF2. O percentual apresentou resultados mais marcantes do que o IMF talvez pela maior variabilidade deste último. Porém, a IMF pode representar melhor a expressão gênica por representar o nível de expressão por células. Devem ser levados em consideração ao mesmo tempo o percentual e o IMF, pois o primeiro mostra a presença da molécula no total de células da amostra, enquanto o segundo indica o nível de expressão por célula, podendo ter uma maior relação com o nível de expressão

gênica. Além disso, a IMF alta com baixo percentual, indica a presença de um clone minoritário na amostra. De forma geral, os resultados na identificação da alta expressão do CRLF2 pela técnica de citometria demonstrou relação com os casos sem alterações genéticas (*ETV6-RUNX1*, *r-KMT2A*, *TCF3-PBX1* e *BCR-ABL1*), o que está de acordo visto que a alta expressão do CRLF2 tem sido identificada através do grupo LLA-cpB^{negativos}. Além disso, foi relacionado com subtipos de LLA-pré B e em pacientes maiores de 10 anos, e que dentro dessa população com alto percentual de CRLF2 foi visto uma frequência maior de pacientes com alto risco.

7. CONCLUSÕES

- Sugerimos um algoritmo de testes com a utilização de CFM e métodos moleculares (Figura 5.17) para identificação de marcadores cuja associação preditiva de subgrupos de LLA-cpB serão beneficiados com a introdução de medicação alvo-molecular.
- Foi possível estabelecer por CFM e RT-qCR a força de associação entre a expressão celular e molecular de *CRLF2* em pacientes com LLA-cpB. Além disso, identificamos clones celulares minoritários dentre a heterogenicidade da LLA, em pacientes com baixa expressão da molécula de *CRLF2*;
- Forte associação entre idade acima de 10 anos e LLA-cpB com alta expressão celular do *CRLF2*, quando comparados aos pacientes com idade inferior a 10 anos;
- Alta expressão celular de *CRLF2* e correlação positiva com LLA-cpB subtipo B-III;
- Não foram encontradas diferenças significativas para expressão de CD127 entre as variáveis sexo, cor da pele, leucometria, além de não ter sido encontrada correlação com a expressão celular de *CRLF2*;

8. REFERÊNCIAS

Alves, G.V.A. *et al.* Flow Cytometry immunophenotyping evaluation in acute lymphoblastic leucemia: Correlation to factors affecting clinic outcome. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 26, p. 431-440, 2012

Attarbaschi, A., *et al.* Treatment outcome of CRLF2-rearranged childhood acute lymphoblastic leukaemia: a comparative analysis of the AIEOP-BFM and UK NCRI-CCLLG study groups. **Br. J. Haematol.**, v.158, n.6, p.772-777, 2012.

Azevedo-Silva, F., *et al.* Evaluation of childhood acute leukemia incidence and underreporting in Brazil by capture-recapture methodology. **Cancer Epidemiol.**, v.33, n.6, p.403-405, 2009.

Azevedo-Silva, F.; de Camargo, B. and Pombo-de-Oliveira, M.S. Implications of infectious diseases and the adrenal hypothesis for the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.43, n.3, p.226-229, 2010.

Bene, M.C. Immunophenotyping of acute leukaemias. **Immunology Letters**, p.9-21, 2005.

Bene, M.C., *et al.* Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. **Haematologica**, v.84, p.1024-1034, 1999

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

Belson, M.; Kingsley, B.; Holmes, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environmental Health Perspectives**, v.115, n.1, p.138-145, 2007.

Bennett, J.M., *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, v.33, n.4, p.451-458, 1976

Bercovich, D., *et al.* Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemia associated with Down's syndrome. **Lancet**, v.372, p.1484-1492, 2008.

Bernaldez-Rios, R., *et al.* The age incidence of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Mexico city. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v..30, n.3, p.199-203, 2008.

Blunk, C.B. Predição da fusão gênica *ETV6-RUNX1* através da expressão celular de CD9 em leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B. Dissertação – Instituto Nacional do Câncer – INCA, Rio de Janeiro, 2014.

Borowitz, M.J. *et al.* Surface antigen phenotype can predict TEL-AML1 rearrangement in childhood B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group study. **Leukemia**. v.12, p.1764-1770, 1998

Brandalise, S.R., *et al.* 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. **Journal of Clinical Oncology**, v.28, p.1911-1918, 2010

Buffler, P.A., *et al.* Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: Appraising the evidence. **Cancer investigation**, v.1, p.60-75, 2005

Bugarin, C., *et al.* Fine Tuning of surface CRLF2 expression and its associated signaling profile in childhood B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2015.

Buitenkamp, T.D. *et al.* Outcome in children with Down's syndrome and acute lymphoblastic leukemia role of IKZF1 deletions and CRLF2 aberrations. **Leukemia**, v.26, n.10, p.2204-2211, 2012

Cario, G., *et al.* Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. **Blood**, v.115, p.5393-5397, 2010.

Chapiro, E., *et al.* Activating mutation in the TSLPR gene in B-cell precursor lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v.120, n.4, p.833-842, 2012.

Chen, I.M., *et al.* Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. **Blood**, v.119, n.15, p.3512-3522, 2012

Chiaretti, *et al.* *CRLF2* overexpression identifies an unfavourable subgroup of adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia lacking recurrent genetic abnormalities. **Leukemia Research**, v.411, p.36-42, 2016.

Clappier, E. *et al.* An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. **Leukemia**, v.28, n.1, p.70-77, 2014

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

Collins-Underwood, J.R.; Mullighan, C.G. Genomic profiling of high-risk acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v.24, p.1676-1685, 2010.

Corcoran, A.E., *et al.* The interleukin-7 receptor γ chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis. **EMBO J.**, v.15, p.1924-1932, 1996.

Den Boer, M.L., *et al.* A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. **Lancet Oncol.**, v.10, n.2, p.125-134, 2009.

Dyer, M.J., *et al.* Immuno-globulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers? **Blood**, v.115, n.8, p.1490-1499.

Edgar, K. and Morgan, A. Does infections cause or prevent childhood leukemia? A review of the scientific evidence. London: **Children with Leukemia**, 2008.

Emerenciano, M., *et al.* The distribution of MLL breakpoints correlates with outcome in infant acute leukaemia. **British Journal of Haematology**, v.161, p.224-236, 2013.

Emerenciano, M., *et al.* Challenges in the use of NG2 antigen as a marker to predict *MLL* rearrangements. **Leukemia Research**, v.35, p.1001-1007, 2011

Ensor, H.M., *et al.* Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and *CRLF2* deregulation: results from the MRC ALL97 clinical trial. **Blood**, v.117, n.7, p.2129-2136, 2011.

Enshaei, A., *et al.* Long-term follow-up of *ETV6-RUNX1* ALL reveals that NCI risk, rather than secondary genetic abnormalities, is the key risk factor. **Leukemia**, v.27, n.11, p.2256-2259, 2013.

Ferman, S.E., *et al.* Childhood cancer mortality trends in Brazil, 1979 2008. **Clinics**, v.68, p.219-224, 2013

Fielding, A.K., *et al.* UKALLXII/ECOG2993: addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.123, n.6, p.843-850, 2014.

Ford, *et al.* *In utero* rearrangement in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. **Nature**, v.363, p. 358-360, 1993.

Friedmann, A.M.; Weinstein, H.J. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **The Oncologist**. v.5, p.321-328, 2000.

Greaves, M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukemia. **Eur. J. Cancer**, v.35, n.14, p.1941-1953, 1999.

Greaves, M. Childhood leukaemia. **Clinical review**, v.324, p. 283-287, 2002

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

Harvey, R.C., *et al.* Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. **Blood**, v.116, n.23, p.4874-4884, 2010a

Harvey, R.C., *et al.* Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia, **Blood**, v.115, p.5312-5321, 2010b

Harrison, C.J. Acute Lymphoblastic leukemia. **Clin Lab Med**, v.31, p. 631-647, 2011.

Harrison, C.J., *et al.* Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the biology and diagnosis committee of international Berlin-Frankfurt-Munster study group. **British Journal of Haematology**, v.151, p.132-142, 2010.

Hjalgrim, L.L., *et al.* Age- and sex-specific incidence of childhood leukemia by immunophenotyped in the Nordic countries. **J. Natl. Cancer Inst.** v.95, n.20, p.1539-1544, 2003.

Hertzberg, L, *et al.* Down syndrome acute lymphoblastic leukemia: a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM study group. **Blood**, v.115, p.1006-1017, 2010

Hrusak, O.; Porwit-MacDonald, A., Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. **Leukemia**, v.16, p.1233-1258, 2002.

Ikoma, M.R.V., *et al.* First proposed panels on acute leukemia for four-color immunophenotyping by flow cytometry from the Brazilian group of flow cytometry GBCFLUX. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, v.88, 2014.

Isaksen, D.E., *et al.* Uncoupling of proliferation and STAT5 activation in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction. *J. Immunol.*, v.168, p.3288-3294, 2002.

Izraeli, S. Similar yet different. *Blood*, v.116, p.1019-1020, 2010.

Izraeli, S. The acute lymphoblastic leukemia of Down Syndrome – Genetics and pathogenesis. *European Journal of Med. Genetics*, v.59, p.158-161, 2016

Jia, Ming., *et al.* Prognostic significance of cytokine receptor-like factor 2 alterations in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *World J. Pediatr.* v.11, n.2, p.126-133, 2015

Kalina, T., *et al.* Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens. *BMC Cancer*, v. 5, n.38, 2005

Kalina, T., *et al.* EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, v.26, p.1986-2010, 2012.

Kanderová, V., Hrusák, O., Kalina, T. Aberrantly expressed CEACAM6 is involved in the signaling leading to apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. *Exp. Hematol.* v.38, p.653-660, 2010.

Kearney, L., *et al.* A specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 113, p.646- 648, 2009.

Kebriaei, P.; Anastasi, J.; Larson, R.A. Acute lymphoblastic leukaemia: Diagnosis and classification. *Best. Prac. Res. Clin. Haematol.*, v.15, n.4, p.597-621, 2003

Kiyokaya, N., *et al.* An analysis of Ph-like ALL in Japanese patients. *Blood.*, v.122, n.21, p.352, 2013.

Kiyokawa, N., *et al.* Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, v.38, p.42-48, 2014

Klein, M.L., *et al.* Role of non-specific cross-reacting antigen, a CD66 cluster antigen, in activation of human granulocytes. **Infect Immun.** v.64, p.4574-4579, 1996

Kronnie, G.T., *et al.* Philadelphia-Like signature in childhood acute lymphoblastic leukemia: The AIEOP experience. **Blood**, v.122, n.21, p.353, 2013

Leonard, W.J. Cytokines and immunodeficiency diseases. **Nat. Rev. Immunol.**, v.1, p.200-208, 2001.

Linnet, M.S., *et al.* Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in United States. **J. Natl. Cancer Inst.** v.91, p.1051-1058, 1999.

Liu, Y.J., TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. **Annu. Rev. Immunol.**, v.25, p.193-219, 2007.

Malinge, S., *et al.* Novel activating JAK2 mutation in a patient with Down syndrome and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.109, p.2202-2204, 2007.

Malinge, S.; Izraeli, S.; Crispino, J.D. Insights into manifestations outcomes and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. **Blood**, v.113, n.12, 2009.

Meyer, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. **Leukemia**. v.27, n.11, p.2165-2176, 2013.

Miller, J.P., *et al.* The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7. **J. Exp. Med.**, v.196, p.705-711, 2002.

Moorman, A.V., *et al.* Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. **Lancet Oncol.** v.11, p. 429-438, 2010.

Moorman, A.V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Blood Review**. v.26, p.123-135, 2012a.

Moorman, A.V., *et al.* IGH@ translocation, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, v.30, p.3100-3108, 2012b

Moorman, A.V., *et al.* The clinical relevance of genetics in predicting outcome after a first relapse in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Blood**, v.122, n.21, p.2566, 2013.

Moorman, A.V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v.101, n.4, p.407-416, 2016.

Mullighan, C.G. *et al.* Genoma-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v.446, n.7137, p.758-764, 2007.

Mullighan, C.G. *et al.* BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. **Nature**, v.453, n.7191, p.110-114, 2008

Mullighan, C.G., *et al.* Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v.360, n.5, p.470-480, 2009a.

Mullighan, C.G., *et al.* Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor-and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. **Nat. Genet.**, v.41, n.11, p.1243-1246, 2009b

Mullighan, C.G. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **The Journal of Clinical Investigation**. v.122, n.10, p.3407-3415, 2012

Noguchi, M.Y., *et al.* Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. **Science**, v.262, p.1877-1880, 1993.

Noronha, E.P. Perfil imunofenotípico e molecular das leucemias agudas de células T pediátricas. Doutorado - Instituto Nacional do Câncer – INCA, Rio de Janeiro, 2016.

Nosaka, T., *et al.* STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J.*, v.18, p.4754-4765, p.1999.

Owaidah, T.M. *et al.* Expression of CD66c and CD25 in acute lymphoblastic leukemia as a predictor of the presence of BCR-ABL rearrangement. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* v.1, n.1, p.34-37, 2008.

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

Palmi, C., *et al.* Poor prognosis for P2RY8-CRLF2 fusion but not for CRLF2 over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. ***Leukemia***, v.26, n.10, p.2245-2258, 2012

Perera, F.P. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment and prevention. ***J. Nat. Cancer Inst.*** v.88, n.8, p.496-509, 1996.

Pieters, R.; Carroll, W.L. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. ***Hematol Oncol Clin North Am***, v. 24, n. 1, p. 1-18, Feb 2010.

Pombo-de-Oliveira, M. S. *et al.* Lymphoblastic leukemia in siamese twins: evidence for identity. ***Lancet***, v. 2, n. 8513, p. 969-970, 1986

Pombo-de-Oliveira, M.S.; Koifman, S. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. ***Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.***, v.15, n. 12, p. 2336-2341. 2006.

Pombo de Oliveira, M.S., *et al.* Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leucemia. ***Blood Cells, Molecules, and Disease***, v.42, p.121-125, 2009.

- Pui, C.H. Childhood leukemias. **N. Engl. J. Med.**, v.332, n.24, p.1618-1630, 1995.
- Pui, C.H.; Evans, W.E. Acute lymphoblastic leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v.339, n.9, p.605-615, 1998.
- Pui, C.H, Robison, L.L.; Look, A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v.371, p.1030-1043, 2008
- Reis, R.S., *et al.* Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatr Blood Cancer**, v. 56, p.58-64, 2011
- Roberts, K.G., *et al.* Novel chromosomal rearrangements and sequence mutations in high-risk Ph-like acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.118, n.67a, 2011.
- Roberts, K.G., *et al.* Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Cell**, v. 22, n. 2, p. 153-166, 2012.
- Roberts, K.G., *et al.* Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. **N. Engl. Journal Med.**, v.371, n.11, p.1005-1015, 2014.
- Robinson, H.M., *et al.* Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) may arise from a breakage-fusion-bridge cycle. **Genes, Chromosomes and Cancer**. v.46, n.4, p.318-326, 2007.
- Russell, L.J., *et al.* Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.114, p.2688-2698, 2009.
- Sales, M.M.; Vasconcelos, D.M. Citometria de fluxo aplicações no laboratório clínico e de pesquisa. São Paulo: Atheneu, 2013.
- Sato, A.K., *et al.* Stromal cells provide signals different from cytokines for STAT5 activation in hematopoietic cells. **Cell Struct Function**, v.26, p.95-101, 2001

Schmiegelow, K. and Hjalgrim, H. Is the risk of acute lymphoblastic leukemia reduced in siblings to children with the disease? A novel hypothesis explored by international collaboration. **Leukemia**, v.20, p.1206-1208, 2006.

Schmiegelow, K., *et al.* Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: the adrenal hypothesis. **Leukemia**, v.22, p.2137-2141, 2008.

Schrappé, M., *et al.* Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. **Leukemia**, v.14, p.2205-2222, 2000.

Schultz, K.R., *et al.* Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *J. Clin. Oncol.*, v.27, p.5175-5181, 2009.

Schwab, C.J., *et al.* Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features. **Haematologica**, v.98, n.7, p.1081-1088, 2013

Seif, A.E. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. **Cancer Genet.** v.204, n.5, p.227-244, 2011

Sedek, L., *et al.* The immunophenotypes of blast cells in b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: how different are they from their normal counterparts? **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**. v. 86B, p. 329-339, 2014

Shah, N., *et al.* Outcome and toxicity of chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome. **Pediatr. Blood Cancer**, v.52, p.14-19, 2009

Shochat, C., *et al.* Gain-of-function mutations in interleukin-7-receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. **J. Exp. Med.**, v.208, p.901-908, 2011

Shurtleff, S.A. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. **Leukemia**. v.9, n.12, p.1985-1989, 1995

Sims, J.E., *et al.* Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. **J. Exp. Med.**, v.192, p.671-680, 2000.

Smith, M., *et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v.14, n.1, p.18-24, 1996.

Stanulla, M.; Schrappe, M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Elsevier**, v.46, n.46, p.52-63, 2009.

Tal, N. *et al.* Interleukin 7 and thymic stromal lymphopoietin: from immunity to leukemia. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.71, p.365-378, 2014

Van Bodegom, D., Differences in signaling through the B-cell leukemia oncoprotein CRLF2 in response to TSLP and through mutant JAK2. **Blood**, p.2853-2863, 2012.

Van der Veer, A., *et al.* Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. **Blood**, v.122, n.15, p.2622-2629, 2013

Van der Veer, A., *et al.* IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL. **Blood**, v.123, n.11, p.1691-1698, 2014.

Van Lochem, E.G. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. **Clinical Cytometry**, v.60B, p.1-13, 2004

Vindelov, L.L.; Christensen, I.J. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. **Cytometry**, v.11, p.753-770, 1990

Wandt, H., *et al.* WHO Classification of myeloid neoplasms and leukemia. **Blood**, v.115, n.3, p.748-749, 2010.

Whitlock, J.A., *et al.* Clinical characteristic and outcome of children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. **Blood**, v.106, p.4043-4049, 2005.

Whitlock, J.A. Down syndrome and acute lymphoblastic leukaemia. **Br. Journal Haematologica**, v.135, p.595-602, 2006.

Wiemels, J.L., *et al.* Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. **The Lancet**, v.352, p.1499-1503, 1999

Yano, M., *et al.* An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with CRLF2 overexpression. **Genes Chromosomes Cancer**, v.53, p.815-823, 2014

Yoda, A., *et al.* Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.107, p.252-257, 2010.

Yu, J.H., *et al.* Individualized leukemia cell-population profiles in common B-cell acute lymphoblastic leukemia patients. **Chin. J. Cancer**, v.32, n.4, p.213-223, 2013

Zenatti, P.P., *et al.* Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Nat. Genet.**, v.43, n.10, p.932-939, 2011

9. ANEXOS

9.1 Instituições colaboradoras

Região	Estado	Instituição
Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul (MS)	Hospital Regional de Mato Grosso do Sul Rosa Pedrossian - CETOHI
	Goiás (GO)	Hospital Araújo Jorge - Associação de combate ao câncer em Goiás
		Hospital Santa Casa de Misericórdia de Goiânia
		Clínica CEBROM
	Hospital da criança de Brasília José Alencar	
Nordeste	Alagoas (AL)	Hospital do açúcar e álcool
	Bahia (BA)	Santa Casa de Itabuna
		Hospital Martagão Gesteira
	Paraíba (PB)	Hospital Napoleão Laureano
Hospital Universitário Alcides Carneiro		
Pernambuco (PE)	Hospital Universitário Oswaldo Cruz	
Sudeste	Rio de Janeiro (RJ)	Hospital dos Servidores do Estado - HSE
	São Paulo (SP)	Hospital Amaral Carvalho
		Hospital Sarina Rolin
	Hospital Infantil Darcy Vargas	
Sul	Santa Catarina (SC)	Hospital Infantil Joana de Gusmão
	Rio Grande do Sul (RS)	Hospital das Clínicas de Porto Alegre

9.2. Ficha de cadastro do paciente

Exames - Requisição - Incluir

enviar cancelar

VOLTAR

Tipo de Exame Hematológico Tumor Pediátrico

Dados do Paciente

Nome Paciente*

Nome da Mãe*

Identificação da Mãe* Telefone da Mãe

Nome do Pai

Data nascimento*

[buscar paciente]

Idade Faixa etária

Data diagnóstico*

Sexo*

Cor*

Registro Hospitalar

Síndrome Down* Sim Não

Outras Síndromes Genéticas* Sim Não

Logradouro Residência* Número Residência* Complemento Residência

CEP Residência* Bairro Residência*

Estado Residência* Município Residência*

Região Residência

Estado Naturalidade* Município Naturalidade*

Dados da Instituição/Médico

Instituição* UF

Médico*

Dados Clínicos

Suspeita Diagnóstica

Tratamento Utilizado

Outras Informações Clínicas

Baço* Sim Não

Fígado* Sim Não

Linfonodos* Sim Não

Tumoração* Sim Não

Sistema Nervoso Central Comprometido* Sim Não

Alargamento de Mediastino* Sim Não

Medicamentos sendo usados pelo paciente* Sim Não

Uso Prévio de Corticóide* Sim Não

Tem irmã(o) gemelar?* Sim Não

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

Dados Laboratoriais

Leucometria*

Hematócrito %

Hemoglobina

Plaquetas

Blastos* %

Dados da Amostra

Amostra Enviada*

Sangue Periférico

Anticoagulante: EDTA

Heparina

Medula Óssea

Anticoagulante: EDTA

Heparina

Outros

Lâminas Medula Óssea

Lâminas Sangue Periférico

Motivo da Coleta*

Diagnóstico

Recaída

DRM

Amostra da Mãe

Outros

Data da Coleta*

Projeto

Data do Envio da Amostra*

Dados da Entrevista

Entrevista com a mãe

Data da entrevista com a mãe

Follow-up

Data

Observação

Observação

*Itens de preenchimento obrigatório

[[enviar](#)]

9.4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PROJETO EmILi – Aprovado pelo Comitê de
Ética em Pesquisa em ____/____/____.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Responsável pelo Paciente Pediátrico (Idade < 18 anos)

NOME DO PROJETO DE PESQUISA: “*ESTUDOS MULTI- INSTITUCIONAL DAS LEUCEMIAS INFANTIS: CONTRIBUIÇÃO DOS MARCADORES IMUNO-MOLECULARES NA DISTINÇÃO DE SEUS SUBTIPOS E DE FATORES DE RISCOS ETIOPATOGENICOS*”.

Seu (sua) filho (a) está sendo convidado (a) a participar de um estudo porque ele (ela) tem diagnóstico de leucemia aguda. . Estamos consultando você sobre a possibilidade de que as amostras excedentes de sangue e/ou medula óssea de seu (sua) filho (a), que seriam descartadas normalmente, possam ser utilizadas neste projeto de pesquisa. Para você decidir se estamos autorizados a usar estas sobras de amostras biológicas nas investigações propostas neste projeto de pesquisa, você precisa conhecer os objetivos deste projeto de pesquisa, os benefícios, riscos e consequências para seu (sua) filho (a) envolvidos em sua autorização. Após receber todas as informações abaixo você poderá fornecer o seu consentimento por escrito para a participação do seu (sua) filho (a), através de sua assinatura e data neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

PROPÓSITO (OBJETIVOS) DO PROJETO DE PESQUISA

O objetivo deste projeto de pesquisa é de identificar os defeitos que ocorreram no DNA (material genético) que fica dentro das células leucêmicas. A leucemia aguda afeta o DNA de células presentes no sangue. Dependendo do tipo de defeito encontrado, pretendemos avaliar se esse defeito pode estar associado com a doença. Para isso, se você concordar com a participação do seu (sua) filho (a), serão realizados os testes genéticos nas amostras biológicas que já foram coletadas para diagnóstico e acompanhamento do seu (sua) filho (a). Estes testes genéticos permitem identificar os defeitos adquiridos na doença.

PROCEDIMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

Se você concordar a participação do seu (sua) filho (a) neste projeto de pesquisa, os pesquisadores consultarão os dados clínicos dele (a), para identificar se poderão utilizar uma parte do material biológico, já obtida para realização de exames rotineiros do diagnóstico e acompanhamento da doença do seu (sua) filho (a). Este material biológico somente será usado se estiver disponível e não interferir nas amostras biológicas necessárias ao diagnóstico clínico, de acordo com o médico responsável do seu (sua) filho (a). A partir deste material biológico retiraremos o material genético (chamado de DNA) das células doentes (leucêmicas), e realizaremos exames laboratoriais que nos permitam identificar os defeitos das células leucêmicas. Avaliaremos também o papel desses defeitos na evolução da doença do seu (sua) filho (a). Para isto pretendemos estudar os seguintes genes, que são identificados através de letras e números pelos pesquisadores, tais como: *ETV6, RUNX1, RUNX3, NUP98, HOXD13, ETO, PML, RARA, MTHFR, TS, SHMT1, RFC1, CYP3, GST3, STIL, HOX, c-Kit, FLT3, PTPN11, RAS, MYH11, CBFb, MYST3, CREBBP, MLL, PLZF, NPM1, STAT5b, NuMA, FIP1L1 e BCOR*. O médico do seu (sua) filho (a) poderá explicar funcionalidade ou efeito do gene caso seja de seu interesse.

Página 1 de 6

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do responsável pelo participante da pesquisa

TCLE para responsável pelo paciente Pediátrico (< 18 anos) - Versão Final de 18 de Dezembro de 2015.

USO E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Após a primeira etapa de identificação dos defeitos das células leucêmicas, o restante do material biológico poderá ser devidamente armazenado e utilizado para possíveis desdobramentos deste projeto de pesquisa. Todas as amostras de sangue e/ou medula óssea de seu (sua) filho (a) serão utilizadas apenas para os propósitos descritos neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Se você autorizar, estas amostras biológicas serão enviadas para o Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrica no Instituto Nacional de Câncer – INCA, e armazenado no Laboratório desta Instituição. Nós pesquisadores vamos ter o controle destes envios, assim como o local de armazenamento e a pessoa que devemos fazer contato para qualquer mudança em sua opinião. Você será comunicado sempre que possível, e na impossibilidade de comunicarmos a você este envio, vamos apresentar uma justificativa ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) de nossa Instituição. Estas amostras biológicas serão armazenadas por até 10 anos para serem utilizadas em pesquisas futuras. Quando houver necessidade de outros estudos, diferentes dos explicados aqui, você será contatado novamente para consentir ou não, o uso das amostras biológicas armazenadas de seu (sua) filho (a). Estes novos estudos deverão ser aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta instituição e você receberá um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorizar essas novas pesquisas. Os Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) são formados por vários profissionais que avaliam todas as propostas de pesquisas em seres humanos, e foram criados para defender os interesses dos participantes das pesquisas em sua integridade e dignidade, e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. É importante ressaltar que seu (sua) filho (a) poderá participar deste projeto de pesquisa mesmo que você não autorize o armazenamento das amostras biológicas que sobraram. Para isto, no final deste documento você poderá escolher entre estas alternativas. Gostaríamos de ressaltar também que, caso haja perda ou destruição das amostras biológicas do seu (sua) filho (a), você será informado. Após a realização das análises propostas neste Projeto de Pesquisa, e considerando 10 anos a contar da data do recebimento no laboratório do Instituto Nacional de Câncer (INCA), estas amostras ali armazenadas serão integralmente destruídas, de acordo com procedimentos internos e regulamentações nacionais de formação de biorepositórios.

RISCOS

Toda pesquisa com seres humanos tem alguma possibilidade de risco. Mas como não está previsto nenhum exame ou procedimento invasivo neste projeto de pesquisa, então não estão previstos riscos imediatos para seu (sua) filho (a) pela participação neste projeto de pesquisa, por causa da utilização de apenas uma parte das amostras biológicas que já foram coletadas rotineiramente para o diagnóstico dele (dela). A possibilidade de qualquer tipo de dano, de dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural, ou espiritual, por causa da participação do seu (sua) filho (a) neste projeto de pesquisa, é mínima, seja individual ou coletiva. As punções venosas (retiradas de sangue da veia) coletadas como parte do tratamento regular do seu (sua) filho (a), podem resultar em dor no local da punção ou manchas roxas transitórias chamadas de equimoses, conforme já foi explicado pelo médico. Nenhum dano imediato ou tardio, que comprometa a saúde do seu (sua) filho (a) está previsto neste projeto de pesquisa. O pesquisador responsável por este projeto de pesquisa se compromete a suspender a pesquisa imediatamente ao perceber qualquer risco ou dano significativo à saúde do seu (sua) filho (a), previstos ou não neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O problema será comunicado diretamente ao médico responsável pelo diagnóstico do seu (sua) filho (a), que comunicará a você, assim como também ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da sua Instituição, ao Comitê de Ética em Pesquisa

Página 2 de 6

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do responsável pelo participante da pesquisa

TCLE para responsável pelo paciente Pediátrico (< 18 anos) - Versão Final de 18 de Dezembro de 2015.

do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA) e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e as devidas providências serão tomadas em caráter imediato.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente, diretamente ou não, da participação do seu (sua) filho (a) neste projeto de pesquisa, e que venha acompanhado da necessidade de atendimento médico, ficará a cargo da Instituição de origem, aquela onde o seu (sua) filho (a) tem o diagnóstico e tratamento. Ressaltamos que o tratamento do seu (sua) filho (a) será exatamente o mesmo, caso você decida pela participação dele (dela), ou não, neste projeto de pesquisa.

BENEFÍCIOS

Este projeto de pesquisa não oferece benefícios diretos a seu (sua) filho (a). O benefício principal da participação do seu (sua) filho (a) é possibilitar que no futuro, com os resultados alcançados com esta pesquisa, o diagnóstico e tratamento para esta doença possam beneficiar outras pessoas com leucemia (crianças, adolescentes e adultos jovens).

CUSTOS

Se você concordar com o uso de uma parte da amostra biológica do seu (sua) filho (a), como descrito acima, esclarecemos que você não terá quaisquer custos ou forma de pagamento por autorizar a participação do seu (sua) filho (a) neste projeto de pesquisa. A participação dele (dela) neste projeto de pesquisa é voluntária, nem você ou seu (sua) filho (a) sofrerão nenhuma penalidade caso não autorize a utilização da amostra biológica dele (dela) neste projeto de pesquisa. Novamente, reforçamos que o tratamento do seu (sua) filho (a) e acompanhamento médico serão os mesmos, independentes de sua decisão de autorizar ou não, a utilização da amostra biológica neste projeto de pesquisa.

ASSISTÊNCIA INTEGRAL GRATUITA E INDENIZAÇÃO - DANO DIRETO OU INDIRETO

Caso concorde com o uso de parte das amostras biológicas do seu (sua) filho (a) para este projeto de pesquisa, mesmo estas sendo sobras de material biológico para diagnóstico e acompanhamento, por favor esteja ciente de que vamos garantir o direito do seu (sua) filho (a) à assistência imediata/tardia integral gratuita e indenização, em caso de qualquer dano/evento adverso decorrente direta ou indiretamente com a participação dele (dela) nesta pesquisa. Sendo assim, por favor fazer contato com o médico responsável pelo diagnóstico e acompanhamento do seu (sua) filho (a) para identificar as melhores opções e os detalhes sobre esta assistência imediata/tardia integral gratuita e indenização

CONFIDENCIALIDADE

Como medidas de proteção de dados individuais, contra qualquer tipo de discriminação ou estigmatização, seja esta individual ou coletiva, todos os documentos referentes ao acompanhamento clínico de seu (sua) filho (a), tais como resultados de exames, testes, TCLE ou prontuário por exemplo, serão acessíveis somente ao médico responsável e/ou equipe autorizada na Instituição onde realiza este acompanhamento, e quando aplicável, aos pesquisadores, sendo proibido o acesso a terceiros. Todas as informações deste projeto de pesquisa serão confidenciais, nem você ou seu (sua) filho (a) serão identificados em nenhum momento durante o desenvolvimento desta pesquisa, nem na divulgação dos dados da mesma. O material biológico do seu (sua) filho (a) será processado de forma que a privacidade e identidade do seu (sua) filho (a) sejam totalmente preservadas. O nome de seu (sua) filho (a) não será

Página 3 de 6

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do responsável pelo participante da pesquisa

TCLE para responsável pelo paciente Pediátrico (< 18 anos) - Versão Final de 18 de Dezembro de 2015.

divulgado em nenhuma circunstância, mesmo que as informações do registro médico de seu (sua) filho (a) sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos. Para manter esta confidencialidade, a equipe do pesquisador responsável arquivará uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado em sigilo absoluto, e atribuirá um número de identificação para a amostra biológica do seu (sua) filho (a). Todas as informações pessoais do seu (sua) filho (a) serão guardadas na Instituição de origem onde o seu (sua) filho (a) teve o diagnóstico e acompanhamento. Além da equipe de saúde envolvida, os registros médicos do seu (sua) filho (a) poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) de sua instituição de atendimento, e/ou pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), e também pela equipe de pesquisadores envolvidos neste projeto de pesquisa. Pretendemos desta forma, garantir medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como do prontuário, que somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos, e nunca será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.), e assim também garantir que venha a existir qualquer tipo de discriminação ou estigmatização, individual ou coletiva.

BASES DA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA (direito a recusa ou abandono)

É importante que você saiba que a participação do seu (sua) filho (a) neste projeto de pesquisa, através da utilização de parte do material biológico, é completamente voluntária. Você pode recusar autorizar o uso do material e das informações para este projeto de pesquisa, ou interromper a participação do seu (sua) filho (a) a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais o seu (sua) filho (a) tem direito, ou mudança no tratamento dele (dela) na instituição. Ressaltamos que você pode retirar o seu consentimento para permanecermos com a guarda do material biológico do seu (sua) filho (a), a qualquer tempo, e sem quaisquer ônus ou prejuízo, com validade a partir da data da comunicação da decisão. A retirada do consentimento deverá ser feita através da sua manifestação, por escrito, assinada por você, e entregue ao médico responsável pelo diagnóstico e tratamento do seu (sua) filho (a). Assim podemos proceder com a devolução do material existente para a Instituição onde seu (sua) filho (filha) tem o diagnóstico e o tratamento. Caso você não autorize a utilização de parte do material biológico do seu (sua) filho (a), basta que você não assine este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) na última página, e nem rubricar as demais páginas, no canto inferior direito.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Você também tem todo o tempo que precisar para ler este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A pessoa responsável por explicar todo o conteúdo destas informações e obter as assinaturas neste documento, também se coloca à disposição para responder todas as suas perguntas sempre que precisar e tiver novas dúvidas. Você também tem a liberdade de consultar outros pesquisadores envolvidos neste projeto de pesquisa toda vez que sentir necessário. Nós estimulamos a você, ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento. Nós garantimos a você o acesso completo aos resultados de testes realizados no material biológico do seu (sua) filho (a), que pode ser obtido através do médico responsável pelo acompanhamento, independente da participação do seu (sua) filho (a), nesta pesquisa, e com total liberdade para optar em tomar conhecimento ou não dessas informações. Não está previsto o aconselhamento genético neste projeto de pesquisa. Mas, quando for o caso, o médico responsável pelo acompanhamento clínico do seu (sua) filho (a) poderá lhe explicar, e providenciar, se necessário, e sem nenhum prejuízo ou custo para você. O médico responsável pelo seu (sua) filho (a) também poderá contactar você, a qualquer momento, para obter atualização dos resultados obtidos. O pesquisador responsável por este projeto de pesquisa será avisado, e está disponível através dos seguintes contatos:

Página 4 de 6

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do responsável pelo participante da pesquisa

TCLE para responsável pelo paciente Pediatras (< 18 anos) - Versão Final de 18 de Dezembro de 2015.

Pesquisador Responsável:

Nome: Dra. Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira

E-mail: mpombo@inca.gov.br

Telefone: (21) 3207-6532 (direto ou a cobrar)

Fax.: (21) 3207-6566

Endereço: Instituto Nacional de Câncer – INCA/MS.

Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico/ Cpq-Instituto Nacional de Câncer

Rua André Cavalcanti, 37 – 6º andar – CEP 20231050 – Rio de Janeiro, Brasil.

Este pesquisador responsável também se compromete em oferecer informações atualizadas ao longo do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, caso este seja o seu desejo. Você pode optar em tomar conhecimento, ou não, dos resultados dos exames realizados no material biológico do seu (sua) filho (a). Para isto, você deve fazer contato sempre que precisar, com o médico responsável na Instituição onde seu (sua) filho (a) tem o diagnóstico e acompanhamento, através das seguintes informações abaixo:

Nome do Médico responsável pelo diagnóstico e acompanhamento:

Telefones: _____

Endereço do Centro de Pesquisa participante:

Se tiver perguntas com relação aos direitos do seu (sua) filho (a), como participante deste projeto de pesquisa, também pode contar com um contato imparcial, no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) de sua Instituição, através dos seguintes contatos e durante o horário de funcionamento:

Nome do CEP e Endereço:

E-mail:

Telefones:

Horário de funcionamento:

Este documento será elaborado em duas vias originais, sendo que uma via original será arquivado com o pesquisador responsável, e a segunda via original deve ser entregue a você!

Página 5 de 6

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do responsável pelo participante da pesquisa

TCLE para responsável pelo paciente Pediátrico (< 18 anos) - Versão Final de 18 de Dezembro de 2015.

PÁGINA DE ASSINATURAS E CONSENTIMENTO

Eu, declaro que li as informações acima, entendi o propósito deste projeto de pesquisa, bem como os benefícios e riscos potenciais da utilização das amostras biológicas do meu (minha) filho (a). As informações foram fornecidas para mim de forma clara e acessível, eu tive a oportunidade de fazer perguntas, e todas foram respondidas. Ficou claro para mim que não terei qualquer despesa por autorizar a participação do meu (minha) filho (a), e que se eventualmente elas ocorrerem por causa deste projeto de pesquisa, eu serei ressarcido (a) mediante comprovação adequada dos gastos. Eu entendi que não receberei nenhuma compensação monetária por permitir a utilização das amostras biológicas do meu (minha) filho (a) neste projeto de pesquisa. Entendi também que tenho todas as informações necessárias neste documento aqui apresentado para o meu consentimento na participação do meu (minha) filho (a), e, em caso de qualquer dúvida ou desistência eu posso procurar os pesquisadores através dos contatos registrados. Também ficou claro para mim que eu posso desistir a qualquer momento da participação do meu (minha) filho(a) neste projeto de pesquisa, sem nenhum prejuízo para o seu diagnóstico e acompanhamento. Sendo assim, eu, por intermédio deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE):

() Autorizo a participação de meu (minha) filho(a) neste projeto de pesquisa e **CONCORDO** que suas amostras de sangue e/ou medula óssea sejam armazenadas para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta instituição e para isto deverei assinar no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), se eu concordar.

OU

() Autorizo a participação de meu (minha) filho (a) neste projeto de pesquisa, mas **NÃO CONCORDO** em que suas amostras de sangue e/ou medula óssea sejam armazenadas para uso em pesquisas futuras.

Nome do Paciente (com idade < 18 anos):

_____ / /

Nome e Assinatura do Responsável pelo Paciente

Data

_____ / /

Nome e Assinatura da Testemunha Imparcial

Data

Eu, como médico responsável pelo diagnóstico e acompanhamento deste paciente, e também delegado pelo pesquisador responsável por este projeto de pesquisa, confirmo que expliquei completamente os detalhes relevantes deste projeto de pesquisa ao responsável pelo paciente menor de idade, e/ou a pessoa autorizada em consentir pelo mesmo. Declaro que obtive, de forma apropriada e voluntária, as devidas assinaturas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a participação deste paciente neste projeto de pesquisa.

_____ / /

Nome e Assinatura do Pesquisador (a)

Data

Página 6 de 6

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do responsável pelo participante da pesquisa

TCLE para responsável pelo paciente Pediátrico (< 18 anos) - Versão Final de 18 de Dezembro de 2015.

9.5. Produções durante o período de mestrado



Certificamos que o trabalho intitulado “**CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA NA PREDIÇÃO DA ALTA EXPRESSÃO CELULAR E MOLECULAR DE CRLF2 NA LEUCEMIA DE CÉLULAS PRECURSORAS B**” de autoria de “Ferreira PMS, Terra-Granado E, Noronha EP, Faro AJ, Blunck CB, Andrade CF, Pombodeoliveira MS” foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2015, realizado no período de 19 a 22 de novembro de 2015, no Transamérica Expo Center em São Paulo/SP, na categoria apresentação em painel com visita guiada.

São Paulo, 22 de Novembro de 2015.