



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

João Lucas Cruz Souza

**Estudo genético de pacientes pediátricos com Leucemia Linfóide Aguda de
células T de Pernambuco**

Recife
2022

João Lucas Cruz Souza

Estudo genético de pacientes pediátricos com Leucemia Linfóide Aguda de células T de Pernambuco

Dissertação apresentada ao Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências

Orientadora:

Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Coorientadora:

Dra. Terezinha de Jesus Marques-Salles

Recife

2022

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

S729e Souza, João Lucas Cruz.
Estudo genético de pacientes pediátricos com
Leucemia Linfóide Aguda de células T de Pernambuco /
João Lucas Cruz Souza. — Recife: [s.n.], 2022.
99 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Instituto Aggeu Magalhães,
Programa de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia em Saúde, Recife, 2022.

Orientadora: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da
Silva; coorientadora: Terezinha de Jesus Marques-Salles.

1. Leucemia. 2. Citogenética. 3. Células T. 4.
Leucemia linfóide – genética. 5. Leucemia linfóide –
diagnóstico. 6. Pediatria. I. Silva, Norma Lucena
Cavalcanti Licínio da. II. Marques-Salles, Terezinha de
Jesus. III. Título.

CDU 578

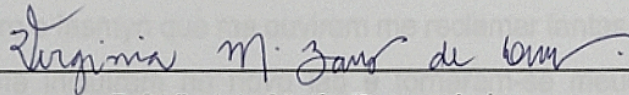
João Lucas Cruz Souza

Estudo genético de pacientes pediátricos com Leucemia Linfóide Aguda de células T em Pernambuco

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de
mestre em Ciências

Aprovado em: 28 de julho de 2022

BANCA EXAMINADORA

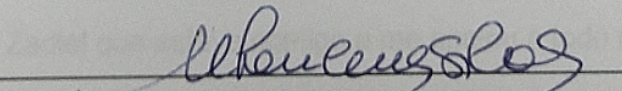


Dr^a Virginia Maria Barros de Lorena

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr^a Darlene Bezerra Paiva

Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco



Dr^a. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, pelos sacrifícios realizados que me proporcionaram a oportunidade de fazer e exercer algo que eu gostasse de fato, e a toda a minha família que me ajudou no caminho. Em especial aqueles que muito torceram por mim e acabei perdendo no caminho: Tia Maria, Tio Edvonaldo, Vô Valdecy, Vó Alaíde.

As minhas orientadoras Dr. Terezinha Marques-Salles e Dr. Norma Lucena-Silva, pela paciência e colaboração.

As pessoas que compõem o laboratório de Citogenética do CEOHNPE: Malu, Eli Marquim, Terezinha, Fernanda, Enécia e Luís; por todo o apoio prestado.

As pessoas que compõem o Laboratório de Diagnóstico do IMIP e o Laboratório de Imunogenética da Fiocruz de Pernambuco: Katherine, Neila, Camila, Fernanda e Laís. E em especial a Renan, por ter me co-co-orientado e servido como analista de cores; a Rossana, Mauro e Iasmyn que me ouviram me reclamar tantas vezes, me apoiaram, me ajudaram, me incluíram no novo lab e tornaram-se meus amigos. Além das enfermeiras do IMIP Dany e Rafa.

Aos meus professores do Instituto Aggeu Magalhães.

A Malu, minha amiga e colega de trabalho.

Ao meu namorado Zadiel que esteve comigo e me apoiou a todo momento.

“A ciência, meu jovem, é feito de erros, mas erros que devem ser cometidos, pois pouco a pouco conduzem à verdade” –
Viagem ao Centro da Terra (VERNE, 1864).

RESUMO

SOUZA, João Lucas Cruz. Estudo genético de pacientes pediátricos com Leucemia Linfóide Aguda de células T em Pernambuco. 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) de células T é uma neoplasia maligna hematológica agressiva que representa 15% das LLAs da infância. Atualmente, são descritas anormalidades genéticas específicas com importância no diagnóstico e prognóstico da doença. Através de estudos citogenéticos e moleculares é possível identificar oncogenes envolvidos na patogenia da doença. O objetivo do trabalho foi determinar a frequência e o impacto das alterações nos genes *FLT3* e *Notch1* em pacientes pediátricos com Leucemia de células T em Pernambuco e estabelecer seu perfil genético. Foram estudados 129 pacientes com LLA-T no IMIP e no HUOC. A citogenética foi avaliada por banda G e FISH, o perfil genético por PCR com o painel estabelecido pelo Laboratório de Biologia Molecular do IMIP, e as alterações *FLT3*-ITD e mutação na região PEST do *Notch1* por sequenciamento. Em relação ao painel molecular, dos 110 pacientes analisados, 14 foram positivos para a expressão do gene *TLX3* e 2 para o *TLX1*. A fusão *SIL-TAL1* foi positiva em 5, a *t(9;11)* foi positiva em 3, a *t(10;11)* em 2 e a *t(11;19)* em 2. A citogenética clássica foi analisada em 27 pacientes e mostrou cariótipos normais em 8, alterações numéricas em 12, e estruturais em 8. Foram observadas as translocações *t(3;13)*, *t(17;19)*, *t(6;11;17)* e duas *t(11;14)*, todas definidas por citogenética molecular. A técnica de FISH mostrou rearranjo do gene *TLX3* em 4 casos e deleção em 2. Três tiveram rearranjo do gene *TCR- $\alpha\beta$* ; cinco o rearranjo *SIL-TAL1* (sendo estes diferentes dos avaliados pela molecular); e 1 rearranjo do *TLX1*. A amplificação do gene *ABL1* foi negativa em todos os investigados. Foram encontradas ainda as alterações estruturais *i(Xq)* e *del7q, 11q, 12p* e *14q*. Em relação à alteração *FLT3*-ITD, 90 pacientes foram avaliados dos quais 3 positivos, dois deles sendo associado com o *Hox11L2*, e o terceiro sendo uma ETP. Em relação ao *Notch1*, 69 pacientes foram analisados, dos quais 26 pacientes apresentaram 22 mutações diferentes, sendo predominantemente mutação pontual. Apesar do mal prognóstico do *FLT3* na Leucemia Mieloide Aguda, todos estão vivos no período de 5 anos após o tratamento. O impacto do *Notch1* na LLA-T ainda necessita de esclarecimentos. Em relação a citogenética, esse estudo mostra a necessidade da citogenética molecular como auxílio diagnóstico. As translocações *t(11;14)*, *t(17;19)* e *t(3;13)* sugeriram mal prognóstico, já que esses pacientes recaíram precocemente e foram a óbito.

Palavras-chave: leucemia; LLA-T; *FLT3*; *Notch1*; citogenética.

ABSTRACT

SOUZA, João Lucas Cruz. Genetic study of pediatric patients with T cells Acute Lymphoid Leukemia in Pernambuco. 2022. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

T-cell Acute Lymphoid Leukemia (ALL) is an aggressive hematologic malignancy that represents 15% of childhood ALLs. Currently, specific genetic abnormalities of importance in the diagnosis and prognosis of the disease are described. Through cytogenetic and molecular studies it is possible to identify oncogenes involved in the pathogenesis of the disease. The aim of this study was to determine the frequency and impact of alterations in the *FLT3* and *Notch1* genes in pediatric patients with T-cell leukemia in Pernambuco and to establish their genetic profile. In total, 129 T-ALL patients were studied at IMIP and HUOC. Cytogenetics was evaluated by G band and FISH, genetic profile by PCR with the panel established by the Laboratory of Molecular Biology of IMIP, and *FLT3*-ITD alteration and *Notch1* PEST mutation by sequencing. Regarding the molecular panel, among the 110 analysed patients, 14 were positive for *TLX3* gene expression and 2 for *TLX1*. The SIL-TAL1 fusion was positive in 5 samples, t(9;11) was positive in 3, t(10;11) in 2 and t(11;19) in 2. Classical cytogenetics was analyzed in 27 patients and showed normal karyotypes in 8, numerical changes in 12, and structural changes in 8. The translocations t(3;13), t(17;19), t(6;11;17) and two t(11;14) were observed, all defined by molecular cytogenetics. FISH technique showed *TLX3* gene rearrangement in 4 cases and deletion in 2. Three had *TCR- $\alpha\beta$* gene rearrangement; five, the SIL-TAL1 rearrangement (different from those evaluated by molecular); and 1 rearrangement of *TLX1* gene. *ABL1* gene episomal amplification was negative in all investigated. Structural alterations i(Xq) and del7q, 11q, 12p and 14q were also found. Regarding the *FLT3*-ITD alteration, 90 patients were evaluated of which 3 were positive, two of them being associated with *Hox11L2*, and the third was an ETP-T-ALL. The *Notch1* were analyzed in 69 patients, of which 26 presented 22 different mutations, most of them point mutations. Despite the poor prognosis of *FLT3* in Acute Myeloid Leukemia, the 3 patients in this had no events within 5 years of post-treatment period. The impact of *Notch1* on T-ALL still needs to be clarified. The cytogenetic study showed the need for molecular cytogenetics as a diagnostic aid. The translocations t(11;14), t(17;19) and t(3;13) suggested poor prognosis, since these patients had early relapse of the disease and died.

Keywords: leukemia; T-ALL; *FLT3*; *Notch1*; cytogenetics.

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 HEMATOPOESE.....	14
3.2 ONTOGENIA DE LINFÓCITOS T	15
3.3 LEUCEMIA.....	17
3.4 LLA-T.....	21
3.5 CITOGENÉTICA	22
3.6 GENES.....	23
3.6.1 FLT3	23
3.6.2 Notch1	26
3.6.3 ABL1	28
3.6.4 MLL (KMT2A)	30
3.6.5 TAL1	32
3.6.6 Hox11 (TLX1) e Hox11L2 (TLX3)	33
4 JUSTIFICATIVA	35
5 HIPÓTESE	36
6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	37
6.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	37
6.2 DADOS CLÍNICOS-LABORATORIAIS.....	37
6.3 ESTUDOS MOLECULARES	37
6.3.1 Processamento de amostra	37
6.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	39
6.3.3 Sequenciamento do FLT3	40
6.3.4 Sequenciamento do Notch1	41
6.4 ESTUDOS CITOGENÉTICOS	42
6.4.1 Cultura	42
6.4.2 Citogenética Convencional	42
6.4.3 Hibridização in situ Fluorescente (FISH)	42
7 RESULTADOS	44
7.1 PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL E MOLECULAR DOS PACIENTES.	44

7.2 FREQUÊNCIA DA ALTERAÇÃO FLT3-ITD E O IMPACTO NO PROGNÓSTICO DA LLA-T.....	46
7.3 ALTERAÇÃO NA REGIÃO PEST DO NOTCH1 E IMPACTO NO PROGNÓSTICO DA LLA-T.....	46
7.4 PERFIL CITOGENÉTICO.....	48
8 DISCUSSÃO.....	51
9 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
APENDICE A – ARTIGO.....	63
ANEXO A – TCLE 1.....	78
ANEXO B – TCLE 2.....	79
ANEXO C – TALE 1.....	86
ANEXO D – TALE 2.....	89
ANEXO E – TALE 3.....	92
ANEXO F – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA 1.....	97
ANEXO G – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA 2.....	98
ANEXO H – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA 3.....	99

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma neoplasia maligna caracterizada pela proliferação desreguladas de células da linhagem Linfóide, presentes na Medula Óssea (MO), no Timo e nas glândulas linfáticas. Essa doença é mais comum em pacientes pediátricos, representado 80% dos pacientes por ela acometidos, e a mais comum das Leucemias nesse grupo. Apresenta um pico de aparecimento de 2-5 anos, mas pode aparecer em qualquer idade.

A LLA de células T acomete os timócitos e representa 15% das LLAs na infância. As características clínicas apresentam-se com leucometria elevada, adenomegalias, alargamento do mediastino e infiltração precoce do Sistema Nervoso Central (KEESET al., 2003). O diagnóstico envolve análise morfológica das células, imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular.

Em relação à imunofenotipagem, o European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) define que a LLA-T é caracterizada pela expressão do CD3. Dos seus subtipos, a LLA-próT (TI) apresenta unicamente o CD7; a LLA-prÉT (TII) apresenta o CD2 e/ou CD5 e/ou CD8; a LLA-T cortical (TIII) apresenta CD1a; e a LLA-T de células maduras (TIV) apresenta CD3 de superfície e CD1a negativo. Pode-se dividir ainda em dois subgrupos, a e b, dependendo da expressão do TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$.

O marcador CD135 é amplamente encontrado nas células T, especialmente entre os percussores de células T intra-tímicas. Ele reconhece uma proteína constituída de 993 aminoácidos que é codificada pelo gene *FLT 3*. Esta proteína está associada a proliferação e apoptose de células hematopoéticas. Estudos atuais demonstram um aumento de expressão da proteína FLIT3 em 13% das LLA-Ts.

A Doença Residual Mínima (DRM) de Portadores de LLA tornou-se uma importante ferramenta para o tratamento e prognóstico desses pacientes. O acompanhamento da DRM nas fases iniciais da quimioterapia (QT) pode definir a sensibilidade do tratamento em relação a LLA. Além disso, a utilização dessa ferramenta no fim da fase de indução e início da fase de consolidação pode estabelecer a necessidade de transplante de MO. Mais de uma forma de avaliação da

DRM já foi estabelecida para as leucemias: PCR quantitativa e Citometria de fluxo são as mais utilizadas no caso das LLA-Ts.

Alterações genéticas ainda não foram associadas a estratificação de tratamento devido a heterogeneidade genética da LLA-T, apesar de muitas terem sido associadas ao prognóstico. Olshanskaya et al, apresentou um painel com 42 alvos o DNA que apresentavam alterações mais recorrentes na LLA-T, dos quais os mais recorrentes eram as alterações nos genes TAL1 e TLX3. O melhor prognóstico da pesquisa foi associado ao cariótipo normal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever o perfil clínico-laboratorial e a frequência de alterações moleculares e citogenéticas envolvendo os genes *FLT3* e *Notch1* e seu valor prognóstico em pacientes pediátricos com Leucemia Linfóide Aguda de células T no estado de Pernambuco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Descrever o perfil clínico-laboratorial dos pacientes;
- b) Determinar a frequência das alterações genéticas mais comuns na Leucemia Linfóide Aguda de células T: fusões *Sil-Tal*, *KMT2A-MLLT3*, *KMT2A-MLLT10* e *KMT2A-MLLT1* e a expressão dos genes *Hox11* e *Hox11L2*;
- c) Realizar o diagnóstico molecular da alteração *FLT3-ITD* e correlacioná-la com o prognóstico;
- d) Avaliar alteração na sequência da região PEST do gene *Notch1* e correlacioná-la com o prognóstico;
- e) Avaliar o perfil citogenético desses pacientes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

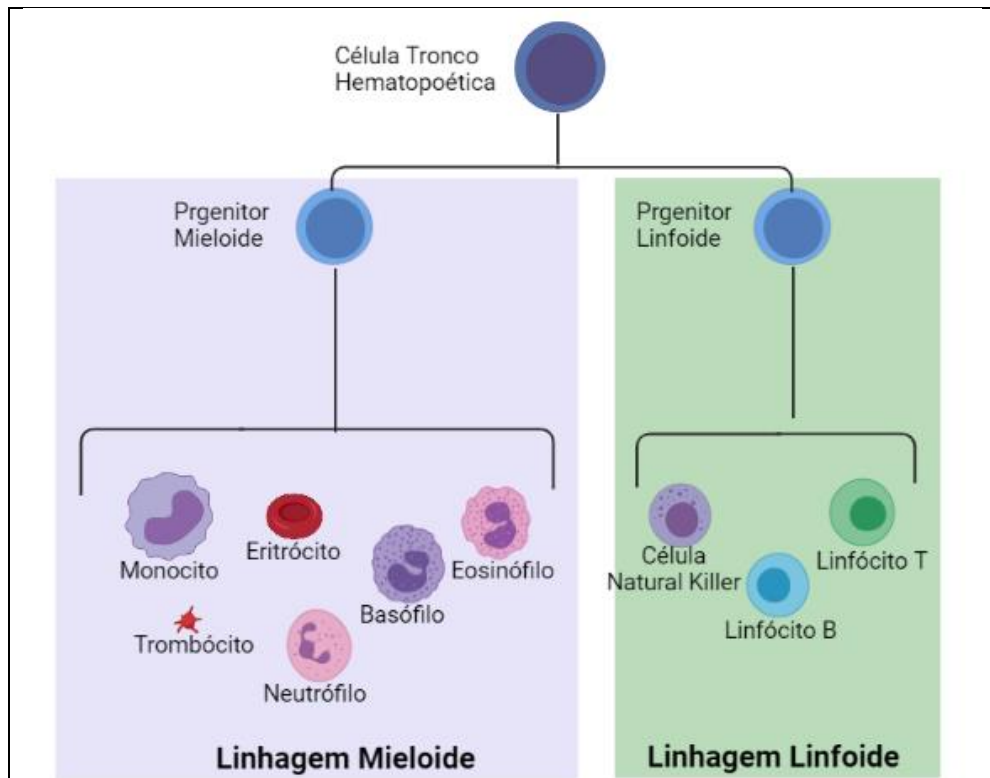
Nesta seção foi descritos os fundamentos teóricos usados na elaboração da pergunta condutora desta dissertação.

3.1 HEMATOPOESE

O tecido hematopoiético é responsável pela produção das células sanguíneas, sendo esse processo chamado de hematopoese. No período intrauterino, a hematopoese ocorre em ilhotas sanguíneas do saco vitelino, sendo essa função posteriormente transferida para o fígado e o baço. Após o nascimento, as células sanguíneas passam a ser produzidas na Medula Óssea (MO), enquanto nas crianças ocorre em todos os ossos, nos adultos essa ação ocorre no esterno, nos ossos do quadril, nas costelas e nas vértebras (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

O microambiente da MO é chamado de estroma e é constituído de um componente celular, contendo diversas células relacionadas a manutenção e regulação da hematopoese, e um componente acelular, formado por citocinas e moléculas responsáveis por modular as atividades celulares. A hematopoese é considerada um processo hierárquico, no qual uma célula comum, chamada de Célula Tronco Hematopoiética (CTH) dá origem as diversas células constituintes do sangue. Essas células sofrem dois tipos de divisão: uma divisão simétrica, que dá origem a duas CTHs idênticas e é responsável pela manutenção do *pool* de células tronco, e uma divisão assimétrica, que dá origem a uma CTH e um célula com comprometimento para uma das duas linhagens: mieloide ou linfoide. A linhagem linfoide dá origem aos linfócitos, e a linhagem mieloide dá origem as outras células hematológicas (Figura 1). As células comprometidas sofrem diversas divisões e se tornam cada vez mais diferenciadas, adquirindo características que possibilitam o seu reconhecimento, até que se tornam células maduras e desempenham funções específicas (BOWMAN; BUSQUE; LEVINE, 2018; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

Figura 1 - Hematopoese



Fonte: o autor com a ferramenta Biorrender.

Legenda: Esquema hierárquico mostrando o processo de diferenciação das células hematopoiéticas (Hematopoese).

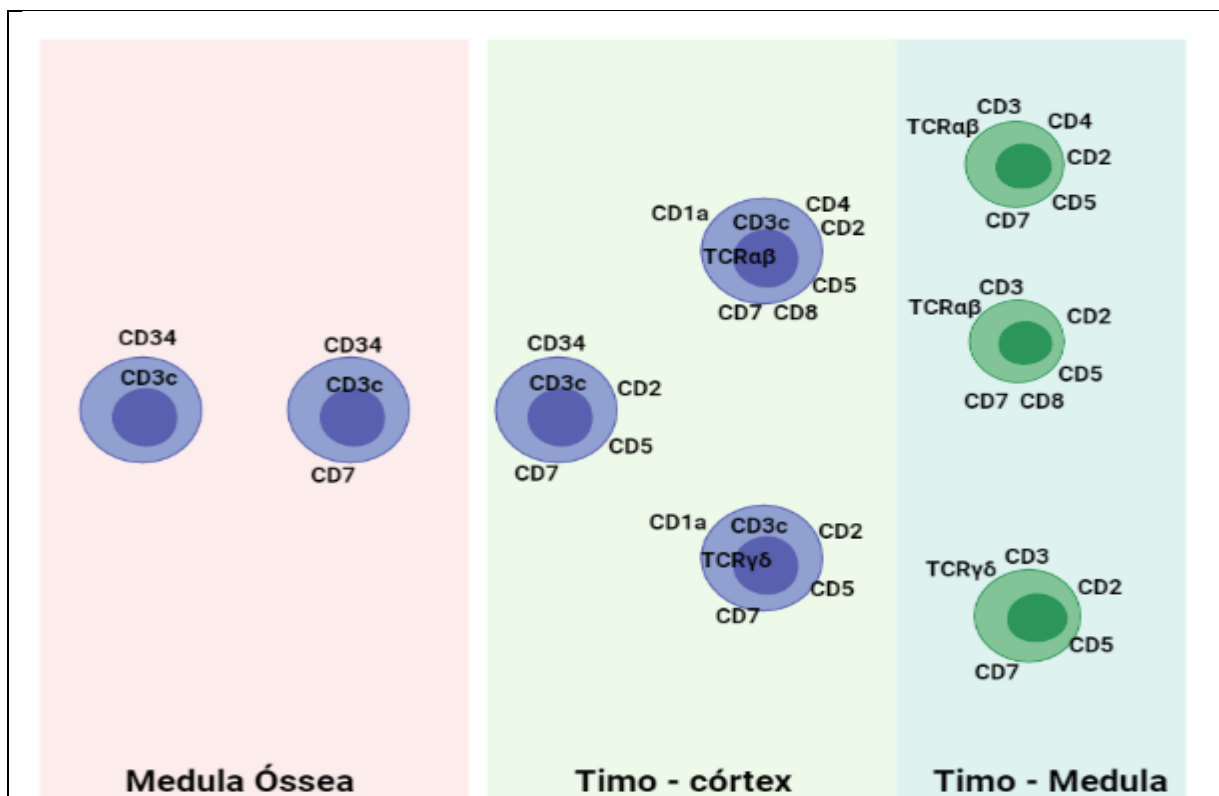
3.2 ONTOGENIA DE LINFÓCITOS T

As células precursoras da linhagem linfoide dão origem aos linfócitos T e linfócitos B. Na medula óssea, as células comprometidas com a linhagem T expressam em sua superfície os antígenos CD34 e CD7, enquanto aquelas comprometidas com a linhagem B expressam CD34 e CD19. O comprometimento das células precursoras com uma linhagem é regulado por citocinas e fatores de transcrição, que por mecanismo epigenéticos, ativam a expressão de diferentes genes, incluindo os que codificam os receptores específicos de cada linhagem. A maturação da linhagem de células B ocorre na medula e envolve a transcrição de genes das cadeias das imunoglobulinas, receptores de células B. A maturação de células precursoras comprometida com a linhagem T ocorre no Timo, órgão linfoide primário. Os genes *Notch1* e *GATA3* estão intimamente ligados ao comprometimento de linfócitos T, já que, em conjunto ativam a transcrição dos genes dos Receptores de Células T (TCRs) e aqueles envolvidos no recombinação V(D)J nessas células,

levando ao desenvolvimento do pré-TCR e a maturação das células T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

Ao atingirem a camada subcapsular do córtex tímico, as células precursoras T passam a expressar CD2 e CD5, tornando-se células pró-T. A maioria dessas células, 95%, irão se diferenciar em linfócitos pré-T corticais, expressando CD1a, TCR $\alpha\beta$, e dupla positividade para CD4 e CD8. Esses timócitos passam para a camada medular do timo, onde irão expressar CD3 de superfície, perdendo o antígeno CD1a, e ficam positivos para um dos dois: CD4 ou CD8. Apenas 5%, das células CD34⁺/CD7⁺/CD2⁺/CD5⁺ (5%) passa a expressar o TCR $\gamma\delta$, e são duplo negativos para CD4 e CD8 (Figura 2) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

Figura 2 - Ontogenia de Linfócitos T



Fonte: o autor com a ferramenta Biorrender

Legenda: Imagem mostrando a perda e ganha de Clusters de diferenciação (CDs) dos linfócitos T no processo de amadurecimento.

Um complexo processo conhecido como rearranjo V(D)J é responsável pela grande diversidade de imunoglobulinas em linfócitos B e pela diversidade de TCRs em linfócitos T. Essa ação é mediada pelos produtos dos Genes Ativadores de Recombinação (*RAG1* e *RAG2*) e pela enzima TdT (do inglês, *Terminal deoxynucleotidyl transferase*). Ao final, o Timo seleciona negativamente os linfócitos T autorreativos, já as células não autorreativas são liberadas na corrente sanguínea (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

As principais moléculas relacionadas aos linfócitos T são: (i) CD3, é um marcador exclusivo de linhagem T, cuja expressão está associada aos TCRs; (ii) CD7, pan-T, expresso durante toda a vida dos linfócitos T; (iii) CD2 e CD5, presentes em quase toda a vida dos timócitos; (iv) CD4 e CD8, moléculas de interação com o Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC), presente em dupla positividade no estágio cortical e em positividade individual no estágio medular; (v) CD1a, principal marcador do estágio cortical; (vi) e os TCR, responsáveis pelo reconhecimento de antígenos estranhos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BÉNÉ *et al.*, 2011; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

3.3 LEUCEMIA

A leucemia é uma neoplasia maligna que afeta o sistema hematopoiético, e é caracterizada pela proliferação clonal e desregulada das células sanguíneas. A leucemia, como a maioria dos cânceres, é uma doença multifatorial, produto da interação de fatores genéticos e ambientais. Geralmente ocorre com o acúmulo de mutações envolvendo genes relacionados a regulação do ciclo celular, tanto relacionados à proliferação e sobrevivência das células, quanto à maturação (ALMEIDA, 2017; FERRANDO, A. A.; LÓPEZ-OTÍN, 2017).

A evolução no conceito, classificação e tratamento da leucemia remota mais de um século. Em 1844, Donné, ao examinar o sangue de pacientes com esplenomegalia, notou um excesso de glóbulos brancos, o qual ele atribuiu à desregulação no processo de maturação. Em 1845, Bennet notou alterações no sangue periférico de um paciente com hepatoesplenomegalia, que não eram associadas à inflamação, concluindo haver uma doença hematológica sistemática, a qual ele chamou de leucocitemia. Foram alguns meses depois que Virchow atribuiu o

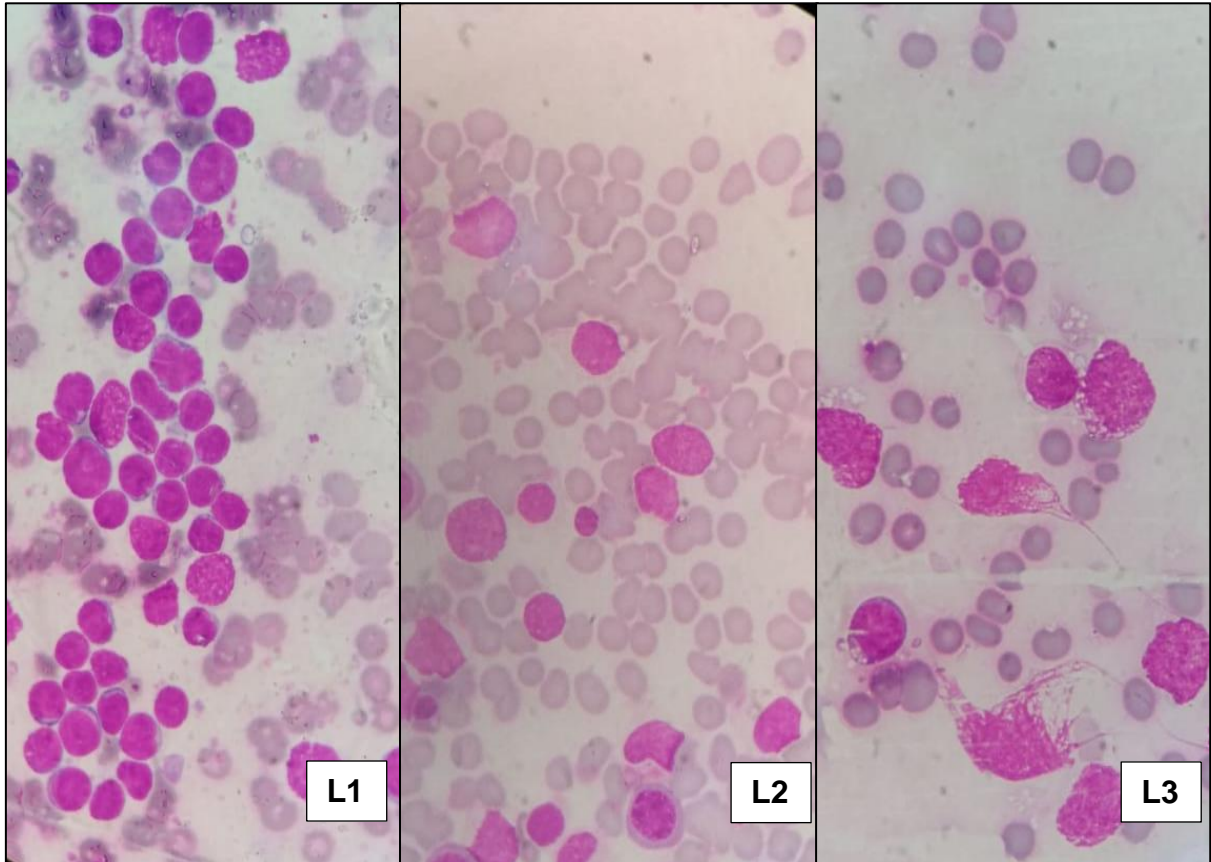
nome Leucemia ao processo de proliferação de células hematológicas, já o primeiro caso de leucemia infantil só foi descrito em 1850 por Fuller (KARRMAN; JOHANSSON, 2017).

As leucemias são classificadas de acordo com a linhagem celular atingida e o grau de maturidade das células. As leucemias agudas são conhecidas por afetarem células mais imaturas enquanto as leucemias crônicas são caracterizadas pela presença de células maduras. Diversos modelos de classificação de leucemias são utilizados em laboratórios, apresentando relação com prognóstico e protocolo de tratamento (ALMEIDA, 2017; ARBER *et al.*, 2016; LIMA, 2020).

O critério para o diagnóstico de leucemia, proposto pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB), define a leucemia aguda pela presença de 30% de células blásticas na medula óssea, mas a Organização Mundial da Saúde em sua última revisão de 2016 estabeleceu o valor de 20% de células blásticas (ARBER *et al.*, 2016; BENNETT *et al.*, 1976). Atualmente, o diagnóstico da leucemia é realizado pela análise morfológicas das células da MO (mielograma), Imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular, sendo esses exames necessários para a classificação e tratamento da leucemia (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

A primeira forma de classificação das leucemias agudas foi desenvolvida pelo grupo Franco-Américo-Britânico em 1976, tendo como base as características morfológicas: tamanho celular, citoplasma, nucléolo, vacuolização e basofilia. Nesse modelo, as Leucemias Linfóides Agudas são subdivididas em três subgrupos (Figura 3): L1, células blásticas pequenas, geralmente com núcleo regulares e nucléolos pequenos ou não visíveis; L2, células grandes com heterogeneidade de tamanho, núcleos irregulares com um ou mais nucléolos e citoplasma moderadamente abundante; e L3, células grandes com nucléolos proeminentes, citoplasmas com intensa basofilia e vacuolização (BENNETT *et al.*, 1976).

Figura 3 - Classificação morfológica de blastos linfóides segundo a FAB



Fonte: o autor

Legenda: Imagem de microscópio óptico mostrando as diferenças morfológicas entre as células blásticas das três classes de leucemia (L1, L2 e L3), segundo a classificação da FAB para LLAs (PAS 1000x).

Com o desenvolvimento da Imunofenotipagem, técnica de análise celular mais sensíveis, o Grupo Europeu para Caracterização Imunológica de Leucemias (do inglês, *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias – EGIL*) desenvolveu, em 1995, um método de classificação baseado em marcadores imunológicos dessas células, conhecidos como CD (do inglês, *Cluster of Differentiation*). As leucemias linfóides agudas eram subdivididas em três subgrupos: 1) de linhagem B, caracterizada pela expressão de CD19 e/ou CD79a e/ou CD22, e subdividida em pró-B (B-I), que não apresenta nenhum outro marcador de diferenciação, B comum (B-II), que apresenta CD10, pré-B (B-III), que apresenta o IGM citoplasmático e B madura (B-IV) que apresenta os marcadores Kappa ou Lambda; 2) de linhagem T, caracterizada pelo CD3, subdividida em pró-T (T-I), com CD7+, pré-T (T-II), com a presença do CD2 e/ou CD5 e/ou CD8, T cortical (T-III), com

CD1a, e T madura (T-IV), com CD3 de superfície e CD1a negativo e marcação de CD4 ou CD8, podendo ser ainda do grupo A, com o marcador TCR $\alpha\beta$ e grupo B, com o marcador TCR $\gamma\delta$ (Quadro 4); e 3) Leucemia Linfóide Aguda com marcadores aberrantes, pertencentes à linhagem mieloide (BENE *et al.*, 1995).

Quadro 1 - Classificação das Leucemias Ts segundo a EGIL

LLA-T	CD7	CD3	CD2, CD5 e CD8	CD1a	CD3s
TI	+	+	+	-	+
TII	+	+	+	-	+
TIII	+	+	-	+ (CD4 e CD8)	+
TIV	+	+	-	-	+ (CD4 ou CD8)

Fonte: Adaptado de Bene *et al.* (1995).

Com os avanços de análise genéticas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 2004 um método de classificação baseado em marcadores moleculares e mutações gênicas, relacionadas ao desenvolvimento da doença e que tinham impacto clínico e prognóstico. Após novas análises científicas houve uma revisão em 2008, e mais uma em 2016, sendo esta última a mais atual. Nessa revisão, as leucemias linfóides agudas foram classificadas em dois grupos: B, contendo 12 subgrupos relacionados às principais translocações cromossômicas com importância prognóstica; e T, que não possui alterações genéticas classificatórias, mas que apresenta dois subgrupos, a Leucemia de Early-T precursoras e a Leucemia de células Natural Killer (ARBER *et al.*, 2016).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para cada ano do triênio 2020-2022, são esperados 5.920 casos novos de leucemia para homens e 4.890 para mulheres. A projeção para o estado de Pernambuco é de 230 casos para homens e 250 para mulheres. Em 2017 foram contabilizados 4.795 óbitos por leucemia em homens e 4.401 em mulheres (INCA, 2019). Apesar de ocorrer mais frequentemente em adultos acima de 55 anos, a leucemia é o câncer mais comum em crianças menores de 15 anos. Em Recife, a taxa de incidência da leucemia pediátrica é de 48,5 a cada 1 milhão, com uma taxa de sobrevivência de 69,8%, sendo na Leucemia Linfóide Aguda (LLA) 73,2% e na Leucemia Mieloide Aguda (LMA) 37,8% (LINS *et al.*, 2017).

A LLA é a mais comum malignidade hematológica pediátrica, representando 80% dos casos de leucemias dessa faixa etária. Alguns fatores são considerados de

pré-disposição: doenças como Síndrome de Down, Ataxia Telangiectasia, Anemia de Fanconi, Síndrome de Bloom e Síndrome de Nijmegen; exposição à radiação ionizante, pesticidas e alguns solventes; e infecções virais como Epstein-Barr vírus e HIV. Porém na maioria dos casos a leucemia surge como uma alteração *de novo* em indivíduos previamente saudáveis (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

3.4 LLA-T

A LLA de células T acomete os timócitos e representa 15% das LLAs na infância. As características clínicas incluem leucometria elevada, adenomegalias, alargamento do mediastino e infiltração precoce do Sistema Nervoso Central (KARRMAN; JOHANSSON, 2017). A LLA-T e o linfoma linfóide agudo de células T representa duas unidades diferentes da mesma doença, e apesar de apresentarem a mesma morfologia celular e imunofenotipagem, o protocolo de tratamento é diferente. Assim sendo, considera-se linfoma quando há presença de massa composta de células blásticas T, com contagem menor de 20% de blastos na medula, enquanto que acima deste percentual é caracterizado leucemia aguda (ARBER *et al.*, 2016; VARDIMAN *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos de LLA-T realizados na população pernambucana foram conduzidos nos dois centros de referência em oncohematologia pediátrica do estado, desenvolvidos por Gueiros (2015) e Almeida (2017). O primeiro foi realizado no Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (CEOHNPE/HUOC), mostrando 26 pacientes com LLA-T no período de 2004 a 2014 (média de 2,6 casos por ano), com idade variando entre 3 a 18 anos (GUEIROS, 2015). Já o segundo foi realizado no Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), com 63 pacientes no período de 2005 a 2014 (média de 7 casos por ano) com idade variando de 4 meses a 16 anos (ALMEIDA, 2017).

A LLA-T apresenta um perfil genético muito heterogêneo. Dessa forma, a revisão da classificação de neoplasias hematológicas da OMS de 2016 estratifica a LLA-T por marcadores imunofenotípicos, que incluíram dois subgrupos: ETP e Natural Killer. Os blastos da ETP apresentam expressão de CD7, mas é negativo para CD1a e CD8, e apresenta um ou mais marcadores de células tronco ou da linhagem

mieloide. Devido ao baixo grau de maturidade, esse tipo de leucemia tende a apresentar um perfil genético semelhante a leucemias mieloide. Além disso, a revisão de 2016 incluiu no grupo das LLA-Ts a leucemia de células Natural Killer, caracterizada pela expressão do marcador CD56. O restante das leucemias desse tipo de célula são agrupadas simplesmente como LLA-T (ARBER *et al.*, 2016).

Alterações genéticas ainda não foram associadas a estratificação de tratamento devido a heterogeneidade genética da LLA-T, apesar de muitas terem sido associadas ao prognóstico. Porém, apesar de não haver uma subclassificação genética para LLA-T, em 2010, Meijerink propôs um modelo de classificação baseado em dois grupos de genes expressos a partir de mutações. O grupo A é composto pelas alterações classificatórias, formando subgrupos exclusivos, sendo esses: *TAL/LMO*, *TLX1/HOX11*, *TLX3/HOX11L2* e *HOXA*. O grupo B compreende as alterações que podem sobrepor as subclasses do grupo A, aparecendo em coexpressão, sendo esses: *Notch1*, *BCR-ABL*, *NUP214-ABL*, entre outros (MEIJERINK, J. P. P., 2010).

3.5 CITOGENÉTICA

A citogenética é uma importante ferramenta para auxílio no diagnóstico, estratificação de risco e escolha terapêutica nas neoplasias hematológicas. Na LLA-T, a citogenética convencional é capaz de identificar alterações cromossômicas em apenas 50% dos casos, sendo a maioria das alterações identificáveis apenas por técnicas de citogenética molecular como Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) (GRAUX *et al.*, 2006a).

As hiperdiploidias são raras nessa doença, com exceção da tetraploidia que ocorre em 5% dos casos. A maioria das alterações são crípticas e envolvem as regiões terminais dos cromossomos. Devido ao rearranjo V(D)J, boa parte dessas alterações envolve também as regiões onde se localizam os genes que codificam proteínas relacionadas aos receptores de células T (*TCR α / δ* – 14q11, *TCR β* – 7q34 e *TCR γ* – 7p15). Deleções de tamanho variável no braço curto do cromossomo nove envolvendo a região 9p21, onde se localiza o gene *CDKN2A*, também são comuns, além da deleção no 1p32, que leva à fusão SIL-TAL1. Além disso, translocações envolvendo o gene *MLL* podem ser encontradas concomitante a outras alterações e, recentemente, a fusão NUP214-ABL foi relatada levando à amplificação gênica do

ABL nesse tipo de leucemia (GRAUX *et al.*, 2006a; GUEIROS, 2015; KARRMAN; JOHANSSON, 2017; RAMDENY *et al.*, 2021).

Olshanskaya e colaboradores apresentaram um painel com 42 alvos de FISH para as alterações mais recorrentes na LLA-T, das quais as mais frequentes foram nos genes *TAL1* e *TLX3*. O melhor prognóstico reportado foi aquele associado ao cariótipo normal (OLSHANSKAYA *et al.*, 2019).

3.6 GENES

Nesta seção serão descritos alguns genes que desempenham papel importante na Leucemia Linfóide Aguda de células T.

3.6.1 *FLT3*

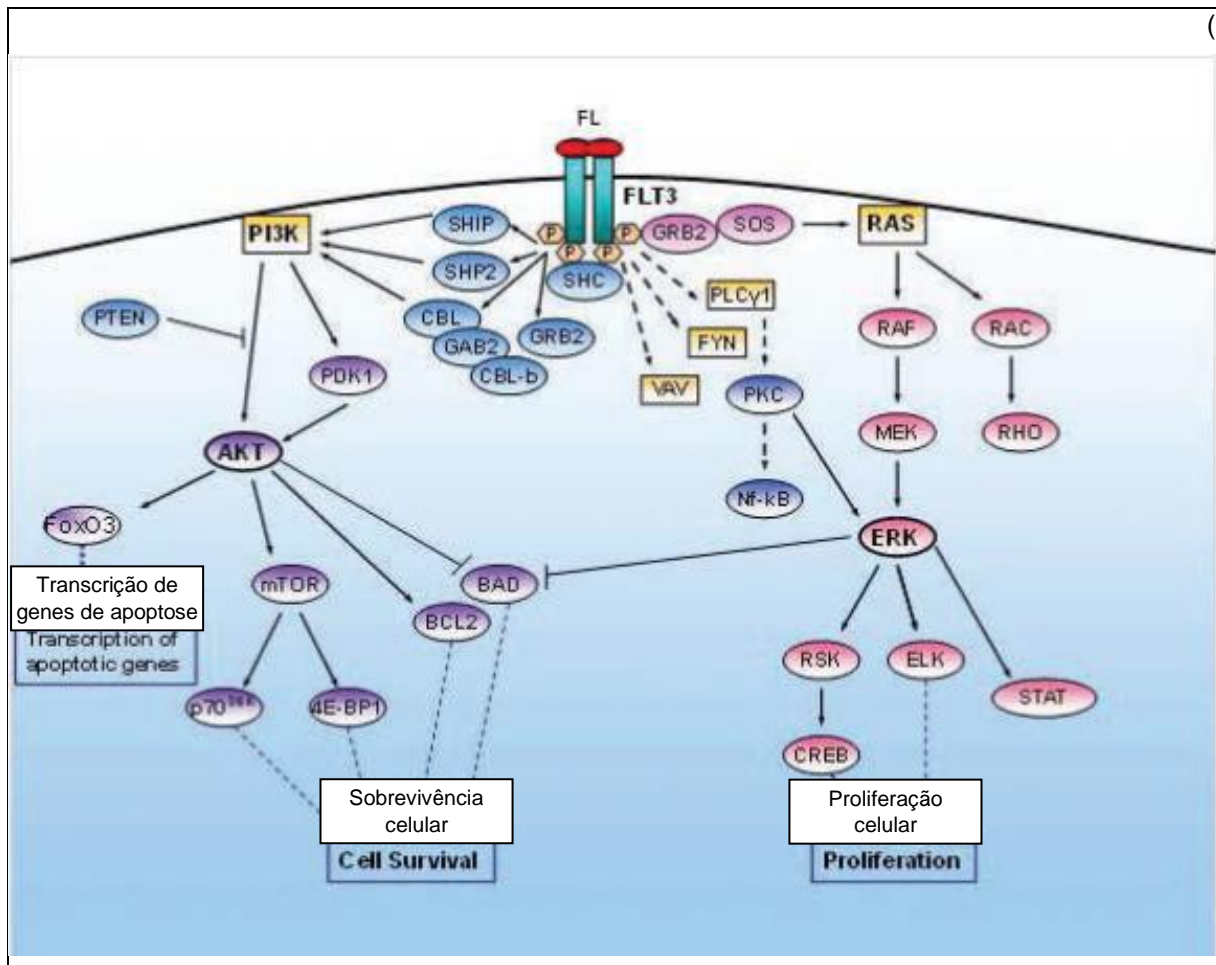
O *FLT3* é um gene conhecido pelo seu homólogo murino, que foi primeiramente descrito por dois grupos: um que o isolou de cDNA de células de testículos, chamando-o “FMS-like tyrosine kinase 3” (*FLT3*), e outro que o isolou do fígado, chamando-o “Fetal Liver Kinase 2” (*FLK2*). Em humanos, foi isolado de células tronco hematopoiéticas sendo chamado de “Stem cells Tyrosine Kinase 1”(STK1) (TSAPOGAS *et al.*, 2017)(SMALL, 2006). Localiza-se no cromossomo 13q12, com aproximadamente 97kb e 24 éxons.

A proteína FLT3, também conhecida como CD135, contém 993 aminoácidos. É um receptor transmembranar do tipo tirosina-quinase de classe III, pertencente a mesma família da FMS, KIT e PDGFR α e β . Sua estrutura consiste em quatro regiões: uma região extracelular N-terminal, formada por cinco domínios Immunoglobuline-like (IL); uma região transmembranar; um domínio justamembranar e uma região C-terminal intracelular, onde se localizam dois domínios kinase (TKD) (GRAFONE *et al.*, 2012; TSAPOGAS *et al.*, 2017).

A ativação do receptor ocorre na presença do ligante que interage com os três domínios IL mais externos, levando a homodimerização da proteína, mediada pelos dois domínios IL mais próximos a membrana. Esse processo provoca uma alteração conformacional que causa a fosforilação dos TKDs e internalização e degradação da

região extracelular. Os TKDs fosforilados interagem com diversas vias de sinalização responsáveis por proliferação e sobrevivência da célula, incluindo as vias RAS, STAT e AKT (Figura 5) (GRAFONE *et al.*, 2012).

Figura 4 - Vias de interação do *FLT3*



Fonte: Adaptado de Grafone *et al.* (2012).

Legenda: Imagem mostrando as diferentes cascatas gênicas que interagem com o *FLT3*, em sua forma selvagem, os produtos dessas cascatas.

O *FLT3* é amplamente expresso em células tronco hematopoiéticas em diferentes etapas do seu processo de maturação. Um estudo realizado por McKenna (2000) mostrou que camundongos knockout para o gene *FLT3* apresentavam considerável decaimento na contagem total de leucócitos em comparação com o grupo sem alterações no gene (45% no sangue periférico e 27% na medula óssea). As diferentes classes leucocitárias foram afetadas variavelmente, sendo os eritrócitos, plaquetas e monócitos pouco ou nada afetados (MCKENNA *et al.*, 2000). Em um

experimento mais recente envolvendo camundongos geneticamente modificados para superexpressarem o receptor FLT3, Tsapogas e colaboradores (2017) mostrou que esses animais desenvolviam alto grau de anemia, devido à baixa produção de eritrócitos. O estudo revelou ainda que células dendríticas expressavam essa proteína até a fase madura, e seu desenvolvimento era altamente dependente da FLT3 (TSAPOGAS *et al.*, 2017). Os estudos citados mostram a importância do gene *FLT3* no desenvolvimento do tecido hematopoiético e como ele afeta de forma diferente essas células, sugerindo que o *FLT3* tem atividade sobre as células granulocíticas e linfóides. Além de seu papel direto, o *FLT3* tem forte atividade sinérgica relacionada a outras citocinas responsáveis pelo desenvolvimento de células hematológicas, como diversos fatores de crescimento de cultura e interleucinas (GRAFONE *et al.*, 2012; MCKENNA *et al.*, 2000).

As principais mutações envolvendo o gene *FLT3* são duplicações internas em tandem, ITD, (do inglês, *internal tandem duplications*) nos domínios justa-membrana e a mutação pontual no TKD1 (do inglês, *tyrosine kinase domain 1*). Ambas as mutações levam a uma forma autofosforilada e constitutivamente ativa da proteína, levando ao aumento da proliferação e resistência à apoptose nas células neoplásicas. Alta expressão de receptores FLT3 anormais são comumente encontradas em malignidades hematológicas. Na Leucemia Mielóide Aguda (LMA) a alteração está presente em 30% dos casos tendo forte relação com o prognóstico, levando a Organização Mundial da Saúde a classificar a FLT3-ITD como um subtipo genético de alto risco (ARBER *et al.*, 2016; DAVER *et al.*, 2019). Está presente ainda em 5-10% das síndromes mielodisplásicas e 1-3% das LLAs, sendo mais raramente encontradas em crianças (TSAPOGAS *et al.*, 2017). Leucemias do tipo LLA-T-ETP e as de fenótipo misto mostram alta frequência de mutações no gene FLT3. Estas leucemias estão relacionadas a fenótipos imaturos com expressão de marcadores mielóides associados (ALEXANDER *et al.*, 2018).

Devido ao mau-prognóstico, o tratamento padrão para pacientes com LMA que apresentam alterações do *FLT3* é quimioterapia agressiva na fase de indução com Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) na fase de consolidação, porém existem inibidores de FLT3 em uso ou testes clínicos. Inicialmente eram inibidores de tirosina quinases adaptados para o gene, mas estudos recentes

trouxeram novos medicamentos alvo para esse tipo de alteração (AMBINDER; LEVIS, M., 2021).

3.6.2 *Notch1*

A família *Notch* é um conjunto de genes inicialmente descrito relacionado ao desenvolvimento do sistema nervoso de *Drosophila melanogaster*, que quando alterado, causava um aspecto de entalhes (em inglês: notches) nas asas, dando origem ao seu nome (BREUGEL, VAN; LANGHOUT, 1983). Em humanos, são conhecidos quatro homólogos da família *Notch* (*Notch1*, *2*, *3* e *4*). O *Notch1* contém aproximadamente 52kb, é dividido em 34 éxons e se localiza no cromossomo 9q34.3 (GENEBANK).

A proteína *Notch1*, contendo 2.555 aminoácidos, é um receptor transmembranar heterodimérico de classe I. A proteína é traduzida como um único precursor que sofre clivagem proteolítica no complexo de Golgi, por atividade de uma convertase Furin-like. Ela é dividida em duas subunidades, um N-Terminal Extracelular (N-EC) e uma C-Terminal Transmembranar e Intracelular (N-TMIC), unidas por interações não covalentes. A subunidade N-EC é constituída por 36 repetições de Epidermal Growth Factor (EGF)-Like, seguida de 3 repetições de LIN-12/NOTCH (LNR) que mantém a estabilidade do Domínio de Heterodimerização (HD). A subunidade N-TMIC é composta por uma curta região transmembranar seguida de um domínio de Molécula Associada ao RBPJ (RAM), seguida por uma série de repetições de Anquirinas (ANK) flanqueadas por Sinais de Localização Nuclear (NLS), um Domínio de Transativação (TAD) e uma região C-Terminal rica em prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T) conhecida como domínio PEST. O domínio EGF-Like é responsável pela interação com o ligante, o domínio HD é responsável por manter as duas subunidades unidas, impedindo a ativação na ausência do ligante, e o domínio PEST é responsável pela manutenção da meia vida da molécula ativa dentro da célula (MACDONALD; WILSON, A.; RADTKE, 2001; ROSATI *et al.*, 2018; SANCHEZ-MARTIN; FERRANDO, A., 2017a; SULIS *et al.*, 2008).

A via de sinalização do *Notch1* é desencadeada na interação célula-célula na Medula Óssea, por um ligante presente na superfície das células. O receptor *Notch1*

reconhece 2 ligantes da família Serrate, Jegger-1 e -2, e três da família Delta, Delta-like-1, -3 e -4. A interação Receptor-Ligante induz a clivagem do domínio N-EC pela metaloproteína ADAM10, permitindo que ocorra a próxima clivagem, realizada pelo complexo γ -secretase no domínio justamembranar. Esse processo então libera o Domínio Intracelular Ativo (DIC^A) que migra para o núcleo. No núcleo o DIC^A se associa às proteínas de ligação ao DNA RBPJ e proteínas Mastermind-Like (MAML) e outros cofatores, promovendo a expressão de diversos genes alvos. Por fim, um sítio degron no domínio PEST é ubiquitinado e o DIC^A é degradado por mecanismos dependentes de proteossomo (ROSATI *et al.*, 2018; SANCHEZ-MARTIN; FERRANDO, A., 2017b; SULIS *et al.*, 2008). Existe uma via de sinalização não canônica desempenhada por essa proteína, que independe de ligantes de cofatores de expressão, porém seus mecanismos ainda necessitam de esclarecimentos (ANDERSEN *et al.*, 2012; MILOUDI *et al.*, 2019).

A expressão do gene *Notch1* está relacionado com diversos processos fisiológicos, envolvendo regeneração de ossos fraturados e formação do sistema linfático (MICHELINI *et al.*, 2021; NOVAK *et al.*, 2020). Em relação ao tecido hematopoiético, desde o período fetal, quando a hematopoese ocorre nos sítios de hematopoese intra-aórticos, esse gene é importante para o desenvolvimento e manutenção das células tronco hematopoiéticas (SAITO *et al.*, 2018). Em adultos, o receptor Notch1 influencia ainda no desenvolvimento e homeostase de novos vasos (angiogênese) (MILOUDI *et al.*, 2019). Stier e colaboradores (2002) realizaram um estudo com camundongos, que foram irradiados e em seguida divididos em dois grupos: (1) que recebeu transplante de CTHs geneticamente modificadas para expressar o gene *Notch1*, e (2) que receberam CTHs normais. Observou-se que o grupo 1 apresentou um aumento significativo no *pool* de CTHs, especialmente em células da linhagem T, em relação ao grupo 2. Além disso, ele mostrou que as células precursoras T com superfície rica em receptores Notch1 migram para o timo, e no timo há células com ligantes Delta-Like em sua superfície, e essa interação permite o amadurecimento de células T (STIER *et al.*, 2002). Em etapas mais avançadas do desenvolvimento dos linfócitos T, o Notch1 é regulador da diferenciação em TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, e ainda em células CD4 ou CD8 (DEFTOS *et al.*, 2000; MACDONALD; WILSON, A.; RADTKE, 2001; SAITO *et al.*, 2018; SANCHEZ-MARTIN; FERRANDO, A., 2017b).

A expressão desregulada do gene *Notch1* está relacionada com diversas doenças, incluindo doença de Alzheimer, doenças linfáticas e cânceres como pulmão, mama, ovário, colorretal e próstata (CHO *et al.*, 2019; GHARAIBEH *et al.*, 2020; MICHELINI *et al.*, 2021; WAEL *et al.*, 2014). A primeira associação entre alteração nesse gene e a leucemogênese foi feita em 1991 quando Ellisen e colaboradores descreveram a translocação t(7;9) (q34;q34.3), uma rara translocação, que colocava o gene *Notch1* truncado justaposto ao *locus* do gene *TCRB*, produzindo uma proteína constitutivamente ativada. Porém, foi apenas em 2004 que Weng e colaboradores demonstraram que mais de 60% das LLA-Ts apresentavam alterações no gene. As alterações mais comuns são alterações de bases e mutações do tipo indel (inserção/deleção), ocorrendo principalmente nos domínios HD e PEST. Essas alterações levam à ativação constitutiva do gene e, conseqüentemente, a alteração na produção e maturação das células T, iniciando a leucemogênese (BRZOZOWA-ZASADA *et al.*, 2017; ELLISEN *et al.*, 1991; GARCÍA-PEYDRÓ *et al.*, 2018; SANCHEZ-MARTIN; FERRANDO, A., 2017b; SULIS *et al.*, 2008; WENG *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2006).

Devido ao exposto, o *Notch1* se tornou um dos principais alvos de estudos relacionados ao tratamento de câncer. Diversos inibidores da atividade do gene, que inclui anticorpos monoclonais, siRNAs, miRNAs, anticorpos Delta-like, inibidores pan-Notch1 mediados por interações proteína-proteína, dentre outros, vêm sendo estudados. Outra classe bastante estudada são os inibidores de γ -secretase, que impediriam a segunda etapa de clivagem que desencadeia a via de sinalização do Notch1 (BRZOZOWA-ZASADA *et al.*, 2017; GHARAIBEH *et al.*, 2020; SANCHEZ-MARTIN *et al.*, 2017).

3.6.3 ABL1

O gene *ABL1* é uma forma celular homóloga ao vírus Abelson da leucemia murina. Ele codifica uma proteína tirosina-quinase não receptora semelhante a família Scr de tirosina-quinases, altamente preservado em todos os metazoários. É um dos primeiros oncogenes estudados e relacionados ao desenvolvimento de leucemias, além de ser o primeiro a ter terapia alvo molecular. Se localiza no cromossomo 9q34,

possuindo 12 éxons e com um transcrito de aproximadamente 7kb (BRAHMACHARI *et al.*, 2017; NAGAR *et al.*, 2003; TURHAN, 2011; WANG, J. Y. J., 2014).

A proteína ABL1, de aproximadamente 1.150 aminoácidos, possui duas isoformas decorrentes de um *splicing* alternativo envolvendo os éxons 1a e 1b. A região N-terminal possui um cap de aproximadamente 80 resíduos seguido de dois domínios, sendo um com duas regiões de homologia Scr (SH3 e SH2) e um domínio quinase. A porção C-terminal inclui um domínio de ligação ao DNA contendo três sinais de localização nuclear (NLS) e três HGM-like Boxes (HLB) que possuem forte afinidade com regiões de DNA ricas em A/T e um domínio de ligação a actina, que contem três sinais de exportina nuclear (NES). A diferença entre as isoformas 1a e 1b é que a ABL1b é miristoilada na região N-terminal, enquanto a ABL1a não. Devido a presença dos NLSs e dos NESs, essa proteína tem atividade alternada no núcleo e no citoplasma, e é amplamente expressa em vários compartimentos celulares incluindo núcleo, citoplasma, mitocôndria e retículo endoplasmático (BRAHMACHARI *et al.*, 2017; CILLONI; SAGLIO, 2012; NAGAR *et al.*, 2003; TURHAN, 2011; WANG, J. Y. J., 2014).

Durante a vida celular, a ABL1 é encontrada em um estado auto inibitório provocado pela ligação do domínio SH3 com um motivo PxxP interno, que impede sua auto fosforilação. Esse processo é mediado pelo cap encontrado na região N-terminal da proteína. Proteínas contendo motivos PxxP interagem com a ABL1 levando a sua ativação. Os mecanismos de ativação da via ABL1 não são claramente conhecidos e ela parece se comportar diferente de outras tirosina-quinases, que interagem com um ligante e amplificam esse sinal através de fosforilação e ativação de vias. A proteína ABL1 interage com uma ampla variedade de sinalizadores, tanto exógenos, como vários fatores de crescimento, quanto endógenos, como dano no DNA, que levam a sua fosforilação e início da atividade catalítica. Isso leva acreditar que ela possui uma ativação restritiva, na qual partes do acervo dessa proteína na célula são ativadas por estímulos diferentes desempenhando papéis distintos. Porém sabe-se que a isoforma 1b tem sua atividade majoritariamente restrita ao núcleo, devido a sua miristoilação (BRAHMACHARI *et al.*, 2017; COLICELLI, 2010; KANNAN *et al.*, 2017; OFRAN; IZRAELI, 2017; WANG, J. Y. J., 2014).

Devido as diversas vias de sinalização, a ABL1 está relacionada a vários processos fisiológicos da célula dependendo do compartimento celular e tipo de tecido em que é expresso, estando envolvido na polimerização da actina, proliferação celular, apoptose, dentre outros processos. Tem papel fundamental desde a embriogênese ao desenvolvimento normal do sistema nervoso e de vasos circulatórios. Na hematopoese normal está intimamente relacionado a proliferação celular, e em linfócitos T, está envolvido com desenvolvimento, sinalização e migração dessas células (BRAHMACHARI *et al.*, 2017; OFRAN; IZRAELI, 2017; WANG, J. Y. J., 2014).

Alterações no gene *ABL1* já foram descritas relacionadas à diversas doenças, incluindo Doença de Parkinson e Alzheimer. Sua alteração mais característica é a translocação BCR-ABL (cromossomo Philadelphia), que leva a ativação constitutiva da Abl e sua permanência no citoplasma, e é conhecida por provocar Leucemia Mieloide Crônica (LMC), mas também é encontrada na LLA-B. Em LLA-T, essa alteração é raramente vista, porém a amplificação genômica do *ABL1*, está presente em 6% dos casos dessa doença. Já se sabe que ela é provocada pela translocação envolvendo os genes *NUP214* e *ABL*, que leva a sua auto fosforilação e formação de diversos epissomos no núcleo da célula que são visível pela técnica de FISH (BARBER *et al.*, 2004; BRAHMACHARI *et al.*, 2017; CILLONI; SAGLIO, 2012; OTHMAN *et al.*, 2018).

Um dos primeiros tratamentos alvos desenvolvidos para leucemia foi o mesilato de imatinibe, inibidor de tirosina-quinase direcionado para a alteração BCR-ABL. Ele é tratamento padrão para leucemias Ph+ e parte da sua responsividade se dar pelo desenvolvimento natural de linfócitos T com receptores específicos para BCR-ABL, levando a Comoli e colaboradores (2017) a propor um tratamento combinado com TKI e células T-BCR-ABL-específicas cultivadas *ex vivo*. Em relação à translocação NUP214-ABL vista em LLA-T, muitos autores indicam que esses casos poderiam se beneficiar da terapia envolvendo TKIs (CILLONI; SAGLIO, 2012; COMOLI *et al.*, 2017; OTHMAN *et al.*, 2018).

3.6.4 MLL (*KMT2A*)

O gene *MLL* (do inglês, *Mixed Lineage Leukemia*) é o homólogo do gene *trithorax* da *Drosophila*, e foi assim nomeado na década de 1980 por sua frequente associação com casos de leucemias com blastos que apresentavam marcadores para ambos os fenótipos, linfóide e mielóide. Foi recentemente renomeado de *KMT2A* referente a sigla do nome em inglês *Histone-Lysine (K) N-methyltransferase 2A* (FORGIONE *et al.*, 2020). É um gene de aproximadamente 16kb, localizado no cromossomo 11q23.3 e que contém 37 éxons.

A proteína MLL é traduzida em um polipeptídeo de 3.969 aminoácidos, e depois proteoliticamente clivada em dois módulos: o N-terminal (MLL^N) e o C-terminal (MLL^C). MLL^N é formado por um motivo de ligação ao MENIN e um domínio de ligação ao LEDGF (do inglês, Lens Epithelium-derived Growth Factor), três motivos AT-hook de ligação ao DNA, dois sinais de localização nuclear (SNL), um domínio CxxC, que se liga a regiões ricas em CG não metiladas, um bromodomínio, um PHD (do inglês, Plant Homeodomain) e o domínio de facilitação de homodimerização FYRN (do inglês, Phenylalanine(F)/Tyrosine(Y)-rich domain N-terminal). Já o MLL^C é constituído por um domínio de Transativação (TAD), um domínio SET (Su(Var)3-9, enhancer-of-zest, trithorax), e o domínio FYRC (do inglês, Phenylalanine(F)/Tyrosine(Y)-rich domain C-terminal) (CHAN; CHEN, C.-W., 2019; TAKAHASHI, Satoshi; YOKOYAMA, 2020).

As duas subunidades da proteína MLL formam um dímero através dos domínios PHD, FYRN e FYRC. O homodímero se liga então aos cofatores MENIN, HCF1/2, ASH2L, RBBP6, WDR5 e DPY30 formando um complexo multiprotéico que possui atividade modeladora da cromatina, mediado principalmente pelo seu motivo de ligação AT-hook e o domínio SET, que confere atividade metiltransferase. A metilação da histona leva a uma mudança conformacional que induz a transcrição dos genes alvos (CHAN; CHEN, C.-W., 2019; TAKAHASHI, Satoshi; YOKOYAMA, 2020).

No desenvolvimento normal o *MLL* é responsável por regular a expressão de uma grande variedade de genes Homeobox (Hox), que são genes responsável pelo desenvolvimento das células. Nas células hematopoiéticas, os principais genes regulados são os genes do grupo HoxA e o Meis Homeobox (*MEIS1*). Ambos são genes programados para diminuir sua expressão ao longo do desenvolvimento celular, e são responsáveis por garantir a sobrevivência da célula (CHAN; CHEN, C.-W., 2019; FORGIONE *et al.*, 2020; TAKAHASHI, Satoshi; YOKOYAMA, 2020).

Na leucemia, as principais alterações envolvendo o *MLL* são as fusões gênicas. Esse gene apresenta um grande variedade de genes-alvos com os quais ele pode se fundir, tendo Meyer et al (2017) mostrado 84 alvos na sua pesquisa do recombinoma do *MLL* em leucemias agudas (MEYER *et al.*, 2018). A fusão, na maioria das vezes, preserva a região N-terminal e compromete a região C-terminal, e a perda ou ganho de função é regulada pelo gene fusionado (AYTON; CLEARY, 2001; FERRANDO, A. A. *et al.*, 2003; TAKAHASHI, Satoshi; YOKOYAMA, 2020).

O rearranjo do gene *MLL* ainda não possui terapia alvo. A maioria dos possíveis alvos para essa alteração está relacionada a inibição da ligação proteína-proteína entre o *MLL* e o *MENIN*, mas também entre a ligação *MLL*-DNA. Outros possíveis alvos estão associados a mutações que ocorrem paralelamente e vias de sinalizações indiretamente reguladas, incluindo nesses casos os genes *FLT3* e *RAS* (KANG *et al.*, 2018; LIANG, K. *et al.*, 2017).

3.6.5 *TAL1*

O gene *TAL1* (*T-cell Acute Leukemia 1*) é um fator de transcrição de classe II pertencente à família das bHLH, que possuem um domínio Helix-loop-helix. A primeira vez em que ele foi clonado foi em um paciente com LLA-T que tinha uma translocação envolvendo os cromossomos 1 e 14, cujo ponto de quebra envolvia o gene. Ele se localiza no cromossomo 1p33 e contém 6 éxons (VAGAPOVA *et al.*, 2018).

Um processo de splicing alternativo pode ocorrer no qual os 4 primeiros éxons do gene são excisados do mRNA, sendo esse evento regulado pelo éxon 3. Por isso, a proteína *TAL1* possui duas isoformas: uma longa (*TAL1^L*), com 331 aminoácidos, e uma curta (*TAL1^C*) com 156 aminoácidos. As duas isoformas possuem um domínio de ligação ao DNA e um domínio Helix-loop-helix, mas diferem no restante da estrutura. A *TAL1^L* possui ainda um domínio de ligação de *ETO2* e um sítio de fosforilação, ambos ausentes na forma curta (VAGAPOVA *et al.*, 2018).

A proteína *TAL1* se liga ao domínio LIM da *LMO2*, que interage com *LBD1*. Esse complexo pode se ligar a outros fatores de transcrição como *ETO2*, *RUNX1*, *ERG* ou *FLI1*, desenvolvendo papel regulatório em diversas vias de sinalização envolvidas na diferenciação, proliferação e sobrevivência das células. Essa proteína tem

papel fundamental no desenvolvimento do tecido nervoso e tecido hematopoiético, sendo expresso desde o sétimo dia após a fertilização. Na hematopoiese, é responsável por manutenção do pool de CTHs e pela diferenciação na linhagem eritróide e megacariocítica, sendo $TAL1^C$ implicada na eritropoiese enquanto $TAL1^L$ está presente na megacariopoiese (SANDA; LEONG, 2017; VAGAPOVA *et al.*, 2018).

No desenvolvimento de células T, o *TAL1* está normalmente silenciado, porém algumas alterações genéticas levam a expressão desse gene em LLA-T. A mais comum dessas alterações é uma microdeleção de 90kb na região entre o gene *SIL* e o *TAL1*, que leva a fusão SIL-TAL1, fazendo com que a expressão do *TAL1* seja regulada pelo promotor do gene *SIL*, altamente expresso em células T. Essa alteração está presente em 20-25% dos casos de LLA-T e é considerada críptica pela citogenética convencional, sendo detectada apenas por biologia molecular ou por citogenética molecular (SANDA; LEONG, 2017; VAGAPOVA *et al.*, 2018).

3.6.6 *Hox11 (TLX1)* e *Hox11L2 (TLX3)*

Os genes *Hox11* e *Hox11L2*, também chamados de *TLX1* e *TLX3*, pertencem a família dos genes *Homeobox* (HOX) responsáveis pela formação morfológica dos organismos multicelulares e que apresentam grande homologia. Eles são HOXs de classe II, também conhecidos como genes órfãos, por não se localizarem nos 4 clusters comuns dos HOX, estando eles dispersos no genoma. O gene *TLX1* se localiza no cromossomo 10q24, enquanto o gene *TLX3* se localiza no 5q35 (GRAUX *et al.*, 2006a; GUEIROS, 2015; MANSUR, 2008).

Ambos os genes codificam fatores de transcrição e, ao contrário dos HOX de classe I, não possuem papel na hematopoiese normal. O *TLX1* está relacionado à organogênese do baço, enquanto que o *TLX3* tem função importante no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) e na formação de neurônios sensoriais (GRAUX *et al.*, 2006a).

O papel oncogênico desses genes na LLA-T se dá pela sua ativação ectópica. Em torno de 7% dos pacientes com essa leucemia apresentam expressão do gene *TLX1* devido a translocação t(10;14) (q24;q11), que sobrepõe este gene aos *TCRs*, porém sua superexpressão também pode apresentar sem translocações, devido a

mecanismos epigenéticos. A expressão do *TLX3* é mais comum, estando presente em 20% dos casos de LLA-T, em sua maioria, devido a translocação t(5;14) (q35;q32) que justapõe esse gene com o gene *BCL11B*, amplamente expresso em células T. Ambas as translocações são crípticas, sendo necessário o emprego de ferramentas de citogenética molecular e biologia molecular (GRAUX *et al.*, 2006a; GUEIROS, 2015; MULLIGHAN, 2012).

Esses genes representam um subgrupo molecular da LLA-T, e sua expressão está geralmente associado ao perfil imunofenotípico CD1a⁺/CD4⁺CD8⁺. O seu prognóstico ainda é controverso na literatura (BARDELLI *et al.*, 2021; GUEIROS, 2015; SANDA; LEONG, 2017).

4 JUSTIFICATIVA

A leucemia de células T é uma doença agressiva, com risco de recaída variável, com um grupo apresentando alto risco para recaída e óbito, e apesar dos avanços nos estudos genéticos dessa enfermidade, pouco se sabe sobre o seu perfil genético na população Pernambucana. A alteração do gene *FLT3* relacionada a inserção de segmentos de DNA de tamanho variado é sabidamente relacionada a mau prognóstico em malignidades mieloides, porém pouco se sabe sobre o impacto na LLA-T, especialmente em pacientes pediátricos. O gene *Notch1* é sujeito a diferentes mutações em LLA-T, cujo impacto na patogênese da doença ainda não foi esclarecido. A análise da frequência de anormalidades genéticas nas crianças com LLA-T e o impacto no desfecho da doença permite a avaliação do seu potencial como marcador de gravidade. O encontro de anormalidades genéticas recorrentes que tenham impacto no prognóstico tem ajudado a definir a gravidade da doença, para alocar os pacientes nos protocolos terapêuticos ajustados pra o grupo de risco: baixo risco, risco intermediário e alto risco de recaída. O desenho desses protocolos serve para ofertar ao paciente o tratamento adequado para eliminar as células blásticas com menor efeito adverso.

O Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e o Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (CEONHPE/HUOC) são referências no diagnóstico e tratamento de doenças oncohematológicas, e recebem crianças de diversas regiões de Pernambuco e estados vizinhos. Esse estudo de colaboração entre as duas instituições permitirá a descrição do perfil clínico e laboratorial de um maior número de casos de LLA-T, com o intuito de identificar marcadores moleculares com significância no prognóstico, e que poderão ser adicionados ao painel de rotina diagnóstica das LLA-T pediátrica, contribuindo para a elaboração de um protocolo de tratamento direcionado ao risco da doença, sendo de acesso aos pacientes atendido pelo SUS.

5 HIPÓTESE

As alterações nos genes *FLT3* e *Notch1*, assim como algumas alterações moleculares previamente descritas, possuem impacto prognóstico na Leucemia de células T em pacientes pediátricos atendidos em dois centros de referência de Pernambuco (CEONHPE/HUOP e SOP/IMIP).

6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

6.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídos no estudo pacientes pediátricos (0 a 18 anos) diagnosticados com LLA-T no Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (CEOHNPE/HUOC) no período de 2003 a 2021.

6.2 DADOS CLÍNICOS-LABORATORIAIS

Os dados clínicos e laboratoriais (leucometria, mielograma e Imunofenotipagem) foram obtidos através de análise de prontuários médicos. Na avaliação de prognóstico foram avaliados: idade, leucometria, quantidade de blastos na medula óssea ao diagnóstico, recaída e desfecho.

6.3 ESTUDOS MOLECULARES

Abaixo descrito as etapas dos estudos moleculares desenvolvidos neste projeto de pesquisa.

6.3.1 Processamento de amostra

As amostras de medula óssea (MO) dos pacientes do IMIP foram obtidas em EDTA, e submetidas ao método de separação por gradiente de densidade utilizando o reagente Ficoll (Cytiva, Uppsala, Sweden). O anel de células mononucleadas foi aspirado e lavado com PBS, e em seguida distribuído em tubos com TRIzol ou DNazol (Invitrogen, Carlsbad-EUA).

O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol seguindo o protocolo do fabricante. Em resumo, 1 mL de trizol foi adicionada a cada amostra de medula óssea ou sangue periférico e homogeneizado, após incubação por 3 min, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e a amostra foi homogeneizada. Em seguida a amostra foi submetida à centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C, e a fase aquosa removida

para tubo limpo para proceder a precipitação do RNA com a adição de 500 μL de isopropanol e 0,5 μL de glicogênio 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, e incubação a -20°C *overnight*. Após esse período, realizou-se nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C , sendo o isopropanol descartado e adicionado 1 mL de etanol 75% para lavagem do RNA, que foi recuperado por centrifugação. O precipitado de RNA foi eluído em 20 μL de água DEPC e armazenado em freezer -80°C até o uso.

A construção do cDNA ocorreu de acordo com o protocolo da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen). O RNA extraído da amostra foi adicionado em um mix contendo 10 mM de dNTPs e 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *Radom Primers*. Essa solução foi incubada por 5 min a 65°C para desnaturação do RNA e em seguida, posta imediatamente em gelo para evitar renaturação. Adicionou-se um novo mix, contendo Tampão 5X, 0,1M de DTT e 40 $\text{u}/\mu\text{L}$ de RNase out, e essa solução foi incubada por 2min a 37°C para ação da RNase out. Por fim, foi adicionado 200 U de M-MLV RT e a solução foi levada ao termociclador para que ocorra a síntese, as condições de ciclagem foram: 10min a 25°C , 50min a 37°C e 15min a 70°C .

Para extração do DNA foi utilizado o protocolo do DNAzol (Invitrogen). O tubo contendo as células em DNAzol foi levado ao vórtex para lise celular. Em seguida foi adicionado Etanol 100% gelado para precipitação do DNA e centrifugado a 13.000 x g por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e, após lavagens, foi adicionado etanol 75% e centrifugado a 12.000 x g por 5min a 4°C . Por fim, o tubo foi posto em papel toalha para que ocorresse a secagem do etanol e o DNA foi eluído em 100-300 μL de água DEPC, colocando-se o tubo por 1h a 55°C para auxiliar na eluição, e armazenado a -20°C .

Para avaliação da qualidade das amostras, foi realizada inicialmente uma PCR para o gene constitutivo *GAPDH*, utilizando-se tampão de PCR 1X, 1,75 μM de MgCl_2 , 30 μM de dNTPs, 1U de *Taq* polimerase e 0,5 μM de cada *primer* (Quadro 2). As condições da PCR estão descritas no quadro 3. O produto dessa reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% para observação do resultado.

As amostras de RNA de MO dos pacientes do CEOHNPE/HUOC foram obtidas a partir do biorepositório dos laboratórios.

Quadro 2 - Primers utilizados para os estudos moleculares

Alvo	Primer	Sequência (5'-3')
GAPDH (DNA)	GAPDH F	GTCTCCACCACCATGGAGAAGGCT
	GAPDH R	CATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA
GAPDH (cDNA)	GAPDH2 F	AGAAGGCTGGGGCTCATTG
	GAPDH2 R	GTGGTCATGAGTCCTTCCAC
SIL-TAL1	SIL	CCGCGACCCCAACGT
	TAL1	CTCATTCTTGCTGAGCTTCTTGTC
t(9;11)	MLLT3	TATGCCTTGTCACATTCACC
	KMT2A	CGCCTCAGCCACCTACTACA
t(10;11)	MLLT10	CTGTTCTATGCTGGCTGCTA
	KMT2A	CCCAAAGAAAAGCAGTAGTGA
t(11;19)	KMT2A	CCCAAAGAAAAGCAGTAGTGA
	MLLT1	CGTACCCCGACTCCTCTACT
<i>Hox11(TLX1)</i>	HOX11 F	AGGTACTTCTGGCGGTGGAA
	HOX11 R	TGGATGGAGAGTAACCGCAGAT
<i>Hox11L2(TLX3)</i>	HOX11L2 F	CGCCAAGTCCCTCAAATGA
	HOX11L2 R	CGGGAACCTTGGA ACTATCCT
<i>FLT3</i>	FLT3 11F	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC
	FLT3 12R	CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC
<i>Notch1</i> – PEST 1.6	PEST 16F	TGGAGTCACCCCATGGCTAC
	PEST 16R	CTCGGCTCTCCACTCAGGAA
<i>Notch1</i> – PEST 1.7	PEST 17F	GCTGCACAGTAGCCTTGCTG
	PEST 17R	GCGCGCCGTTTACTTGAAG

6.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para o perfil molecular, utilizando cDNA, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) para o painel de translocações previamente estabelecido no Laboratório de Biologia Molecular do IMIP. Foram investigadas as fusões SIL-TAL, KMT2A-MLLT3 (t(9;11)), KMT2A-MLLT10 (t(10;11)) e KMT2A-MLLT1 (t(11;19)), e a expressão dos genes *Hox11* e *Hox11L2*. Utilizou-se a mistura com tampão de PCR 1X, 1,75µM de MgCl₂, 300µM de dNTPs, 1U de *Taq* polimerase e 0,5 µM de *primers*

senso e antisenso para cada alvo (quadro 2). As condições de reação estão descritas no quadro 3. O produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2%, por 60 minutos a 100V.

Quadro 3 - Ciclagens utilizadas para os estudos moleculares

Alvo	Desnaturação Inicial	Ciclagem 1	Ciclagem 2	Extensão final
<i>GAPDH</i>	94°C, 3'	30x	94°C, 1' 62°C, 1' 72°C, 1'	72°C, 7'
t(9;11)	94°C, 3'	1x	94°C, 1' 52°C, 1' 72°C, 1'	94°C, 1' 55°C, 1' 72°C, 1' 72°C, 7'
t(10;11), t(11;19), <i>SIL-TAL1</i> , <i>HOX11</i> , <i>HOX11L2</i> .	94°C, 3'	30x	94°C, 1' 62°C, 1' 72°C, 1'	72°C, 7'
<i>FLT3</i>	94°C, 3'	40X	94°C, 1' 62°C, 1' 72°C, 1'	72°C, 7'
<i>Notch1</i>	95°C, 3'	40X	94°C, 1' 65°C, 1' 72°C, 1'30"	72°C, 7'

6.3.3 Sequenciamento do FLT3

Para estudo da alteração ITD no gene *FLT3* foi utilizado DNA. A mistura da PCR foi preparada com tampão de PCR 1X, 1,5 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 5% de DMSO, 1U de *Taq* polimerase e 0,5 µM de cada *primer* (quadro 2). As condições de ciclagem estão descritas no quadro 3.

O produto foi submetido a eletroforese vertical com gel de poliacrilamida a 10% preparado com acrilamida/bisacrilamida na proporção 29:1, tampão TBE 1X, 7%

glicerol polimerizado com solução de amônio persulfato a 20% e TEMED. A corrida foi iniciada a 45 V por 30 min, seguida por 80 V por 2 horas. As amostras que apresentaram banda dupla, indicativo de presença da duplicação interna em *tandem* (IDT), foram enviadas para sequenciamento e os resultados foram analisados com auxílio dos programas SeqMan e Mega X, utilizando como referência a sequência do gene *FLT3* obtida através do site NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi, referência: NM_004119.3).

6.3.4 Sequenciamento do Notch1

Para análise das alterações no gene *Notch1* foi utilizado DNA e cDNA das amostras. A análise do cDNA consistiu na amplificação de dois segmentos na região PEST (PEST1.6 e PEST1.7) utilizando-se uma mistura com tampão de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 300 mM de dNTPs, 1U de *Taq* polimerase e 0,5 µM de cada *primer* (Tabela 1) e 1,5 µL do cDNA.

A análise do DNA consistiu na amplificação de um fragmento de DNA com o *primer* senso do segmento PEST1.6 e o *primer* antisenso do segmento PEST1.7, na mistura de reação preparada com Tampão de PCR 1X, 1,25 mM de MgCl₂, 300 mM de dNTPs, 5% de DMSO, 1U de *Taq* polimerase e 0,5 µM de cada *primer* (quadro 2). As condições reação estão descritas no quadro 3.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, e os que apresentaram amplificação da região de interesse foram enviados para sequenciamento capilar na plataforma tecnológica da Fiocruz de Pernambuco utilizando o protocolo do BigDye (Applied Biosystem) para a detecção de mutações. As análises da qualidade e da sequência dos cromatogramas obtidos foram realizadas no software SeqMan, utilizando como referência a sequência do gene *Notch1* obtida através do site NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi, referência: NG_007458.1).

6.4 ESTUDOS CITOGENÉTICOS

Abaixo descrito as etapas dos estudos citogenéticos desenvolvidos neste projeto de pesquisa.

6.4.1 Cultura

A citogenética foi realizada em parte dos pacientes de acordo com a disponibilidade de amostra. A cultura foi realizada a partir de aspirado de medula óssea colhido em seringa heparinizada seguindo a metodologia de Testa *et al* (1985). Foram feitos tubos para cada paciente com 1×10^7 células em 5 ml de meio contendo 20% de Soro Bovino Fetal em RPMI1640, incubados por 24h em estufa de CO₂ a 37°C. Para obtenção de metáfases, foi adicionado 20µl de colcemid 10µg/µl em cada tubo 16h antes do fim da cultura. Ao fim do período, foi realizado o choque hipotônico com Cloreto de Potássio 0,75M, e em seguida as células foram fixadas e lavadas em solução de 25% de Ácido Acético em Metanol.

6.4.2 Citogenética Convencional

A citogenética convencional foi realizada pela técnica de Bandamento G seguindo recomendações de Seabright (1971). Foram confeccionadas lâminas que foram tratadas em solução de tripsina 1:250 a 0,1% em tampão Dulbeco e, em seguida, coradas em solução de Giemsa 2% em tampão fosfato. Vinte metáfases foram analisadas e documentadas utilizando-se microscópio Zeiss com software de captura Ikaros MetaSystem, e os cariótipos foram descritos seguindo o ISCN (2020).

6.4.3 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

Para citogenética molecular foi utilizada a técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), seguindo recomendações do fabricante da sonda. As lâminas foram desidratadas em sequência de etanol 70%, 90% e 100%, tratadas em solução de pepsina/HCL e lavadas em PBS, para eliminação do citoplasma e proteínas. Em seguida, receberam solução pós-fix para inicial desnaturação do material genético, lavadas em PBS e desidratadas novamente. Por fim, foi realizada desnaturação total

da amostra e da sonda a 74°C. A hibridização foi feita na estufa de CO₂ a 37°C em câmara úmida por 24h. Ao fim, foram realizadas lavagens de exstringência em Solução Salina-Citrato, e a contra coloração foi feita com solução de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). A análise foi feita em 100-200 núcleos em microscópio de fluorescência Zeiss, utilizando o programa de captura Isis MetaSystem, seguindo o ISCN (2020). As sondas utilizadas foram: para avaliação da amplificação gênica epissomal do *ABL* foi utilizada a sonda *BCR/ABL single fusion Vysis*; e as sondas *Break apart* para investigação do rearranjo dos genes *Hox11 (TLX1)*, *Hox11L2 (TLX3)* e *TCR-AD*.

7 RESULTADOS

Os resultados foram descritos em seções de acordo com o aspecto estudado.

7.1 PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL E MOLECULAR DOS PACIENTES.

Entre 2005 e 2021, 90 pacientes foram admitidos no IMIP e 39 no CEONHPE, diagnosticados com LLA-T. A maioria era do sexo masculino (79%), com idade variando de 0 a 18 anos, a maioria (53,8%) com mais de 10 anos (mediana de 13,2 anos). O hemograma mostrou leucocitose com mediana de 114.000 leucócitos/mm³, a maioria (72,6%) com mais de 100.000 leucócitos/mm³; anemia com mediana de 8g/dL de hemoglobina; trombocitopenia com mediana de 60.000 trombócitos/mm³, com 41% entre 50-100.000/mm³ e 41% com menos de 50.000/mm³. A Desidrogenase Láctica teve uma mediana de 1.599U/L e uma média de 2.129,3 U/L ($\pm 2,732$). Características clínicas foram hepatoesplenomegalia (70%), linfadenopatia (80%) e massa mediastinal (45%) (Tabela 1).

A análise morfológica das células hematológicas da medula óssea ao diagnóstico pela citometria de fluxo a presença dos marcadores de linhagem T CD3 citoplasmático em 94%, CD2 em 94%, CD5 em 93%, CD7 em 94% dos casos, associados a marcadores de imaturidade TdT em 94% e CD99 em 86%. O fenótipo mais frequente das células leucêmicas foi o pré-T expressando os marcadores CD5+ e/ou CD8+.

Em relação às variantes de desfecho, observou-se um alto número de remissão completa, com 90%, e baixa taxa de recaída, 1% dos pacientes morreram antes da remissão. Dentre os que recaíram, 27% morreram durante o curso da doença, 42% não apresentaram evento no período de 5 anos após o tratamento, 4% estão no período de 5 anos após o tratamento e 27% ainda se encontram em tratamento.

Em relação ao perfil molecular, apenas 110 pacientes foram analisados devido a disponibilidade de amostra. Desses, 25% apresentaram alterações, sendo: 4,5% a fusão SIL-TAL1, 6,3% apresentaram fusões envolvendo o gene *KMT2A*, 1,8% apresentou a expressão ectópica do gene *Hox11* e 12,7% do gene *Hox11L2*.

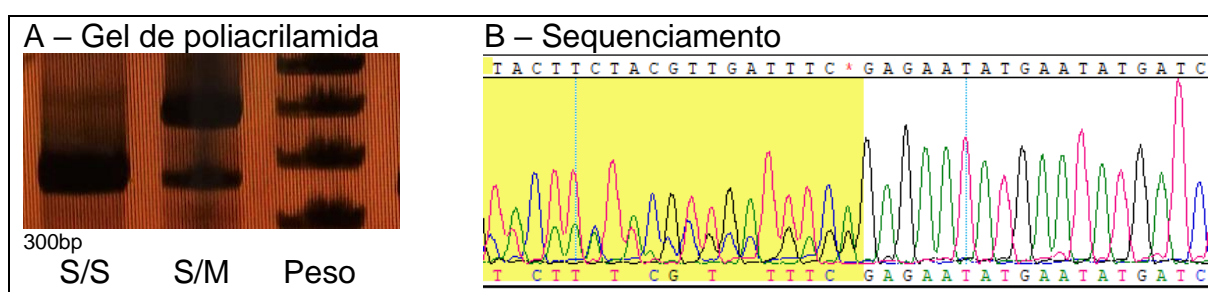
Tabela 1 - Perfil clínico, laboratorial e genético dos pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda de células T tratados em dois centros de referência em Pernambuco

Características clínicas	N	Características Laboratoriais	N
Idade (anos)		Leucócitos (/mm ³)	
<1	1/117	Mediana	114.630
1-10	51/117	≤50,000	20
>10	65/117	>50,000	53
Gênero		Hemoglobina (g/dL)	
Masculino	98/129	Mediana	8
Feminino	31/129	<5	5
Visceromegalia		5-10	26
Hepatomegalia	5/51	>10	23
Esplenomegalia	6/51	Plaquetas (/mm ³)	
Hepatoesplenomegalia	36/51	Mediana	60.500
Nenhuma	4/51	≤50.000	22
Linfadenomegalia		50-150.000	22
Sim	57/72	>150.000	10
Não	15/72	Blastos em MO (%)	
Massa mediastinal		Média ± SD	80 ± 10,2
Sim	30/67	DHL (U/L)	
Não	37/67	Média ± SD	2.732 ± 2.129,3
Doença Residual		Mediana	1.599
D19 ≥1% blastos em MO	7/27	Biologia Molecular	
D49 ≥1% blastos em MO	1/23	Sil/Tal1	5/88
Remissão completa		<i>Hox11</i>	0/86
Sim	67/74	<i>HOX11L2</i>	10/85
Não	7/74	t(9;11)	3/88
Recaída		t(10;11)	2/88
Sim	8/59	t(11;19)	2/88
Não	51/59		
Óbito			
Sim	30/74		
Não	44/74		

7.2 FREQUÊNCIA DA ALTERAÇÃO FLT3-ITD E O IMPACTO NO PROGNÓSTICO DA LLA-T

Em relação ao gene *FLT3*, 90 pacientes foram investigados, dos quais apenas 3 apresentaram inserção de 25 a 35 bases nitrogenadas, de diferentes sequências, em heterozigose (Figura 5).

Figura 5 - Imagem representativa da alteração FLT3-ITD



Fonte: o autor

Legenda: Imagem mostrando a presença da alteração FLT3-ITD em heterozigose: Em gel de poli-acrilamida (A) mostrando o tipo Selvagem (S/S) com uma única banda e o alterado heterozigoto (S/M) com duas bandas, seguido do peso molecular. E a sequência (B) com picos duplos, mostrando a duplicação em Heterozigose.

Dois dos três pacientes com alteração no gene *FLT3* apresentaram também a alteração na expressão do gene *Hox11L2*. O terceiro paciente foi diagnosticado com ETP. Nenhum dos três pacientes foram a óbito dentro de um período de 5 anos de acompanhamento pós-tratamento.

7.3 ALTERAÇÃO NA REGIÃO PEST DO NOTCH1 E IMPACTO NO PROGNÓSTICO DA LLA-T

Para o estudo do *Notch1*, foram estudadas 90 pacientes, dos quais 21 apresentaram o sequenciamento com qualidade questionável e não foram incluídos nas análises subsequentes. Dos 69 pacientes analisados, 26 apresentara mutação sendo: 13 (50%) mutação não sinônimas, 3 (12%) apresentaram mutações não sinônimas associadas a mutações sinônimas, 5 (19%) apenas alterações sinônimas

e 5 (19%) mutações com alteração de frame de leitura. Foram encontrados 22 diferentes tipos de mutação, sendo 16 mutações pontuais, três inserções, duas deleções, e uma alteração de mutação pontual seguida de inserção. Dentre as mutações pontuais, 10 eram sinônimas (quadro 4). A alteração mais frequente foi 6853G>A, que corresponde a mudança de aminoácido V2285I, presente em nove indivíduos.

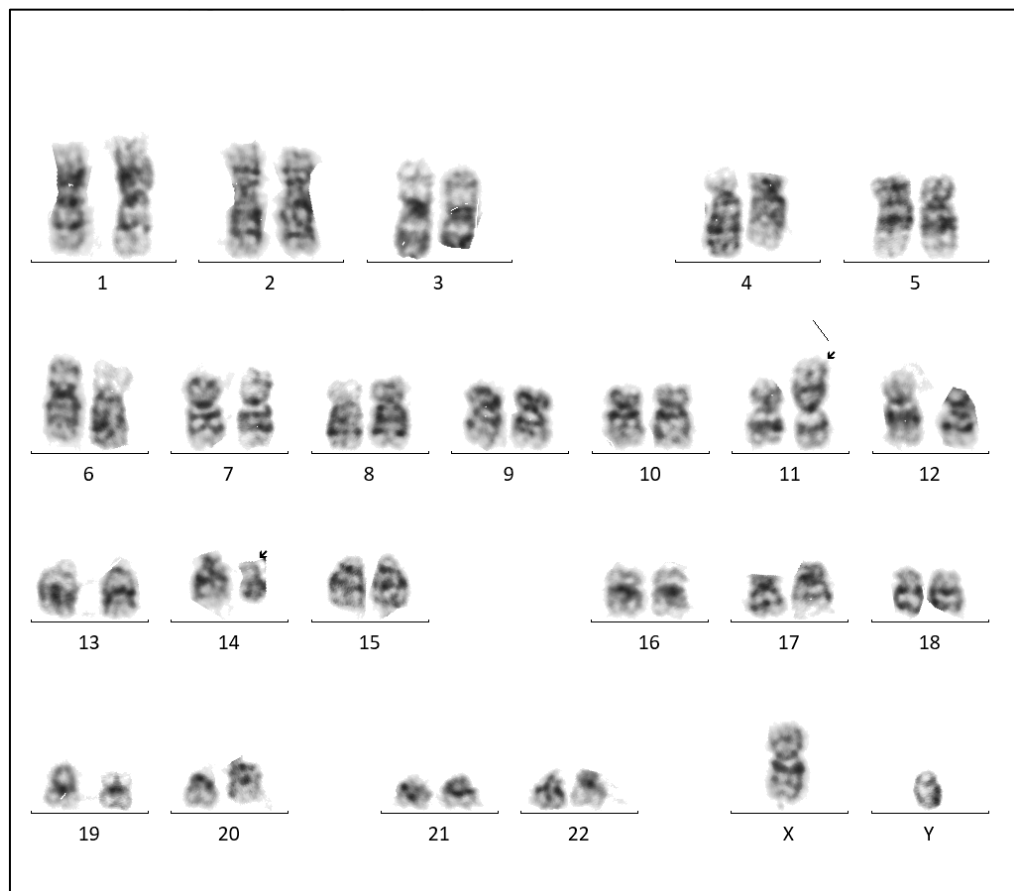
Quadro 4 - Lista de alterações genéticas na região PEST do gene *Notch1* em crianças com LLA-T.

Posição da base mutada	Aminoácido mutado	Tipo de mutação	n
6648G>C	P2216P	Mutação sinônima	1
6777T>C	G2259G	Mutação sinônima	1
6853G>A	V2285I	Troca de aminoácido	9
6870C>T	S2290S	Mutação sinônima	1
6991G>A	A2331T	Troca de aminoácido	2
7170insTGAGTAGAGGGGT	L2390F	Mudança de frame	1
7209G>A	Q2403Q	Mutação sinônima	2
7233A>G	P2411P	Mutação sinônima	3
7249insGTCCGTAA	P2417V	Mudança de frame	1
7318C>T	Q2440*	Inserção código de parada	1
7328T>G.7329insGG	V2443G	Mudança de frame	1
7338G>A	L2446L	Mutação sinônima	1
7369delC	L2457C	Mudança de frame	1
7387delG	A2463P	Troca de aminoácido	1
7390C>T	L2464L	Mutação sinônima	1
7398insC		Alteração no frame	1
7470C>A	Y2490*	Inserção código de parada	1
7505T>A	L2502Q	Troca de aminoácido	2
7514C>T	P2505L	Troca de aminoácido	1
7515T>G	P2505P	Mutação sinônima	2
7536G>A	P2512P	Mutação sinônima	2
7554C>T	D2518D	Mutação sinônima	1

7.4 PERFIL CITOGENÉTICO

Os 39 pacientes do CEONHPE realizaram estudo citogenéticos sendo que em 27 casos (quadro 5), o cariótipo pode ser determinado. Oito (~30%) dos 27 apresentaram cariótipo normal. Entre os cariótipos alterados foram observadas alterações numéricas em 12 casos, sendo três tetraploidias, uma triploidia, seis casos com trissomia e duas com monossomia. Cinco translocações foram observadas, sendo duas $t(11;14)(p13;q11)$, que são recorrentes na doença, e três não recorrente: uma $t(3;13)(p25.1;q13)$, outra $t(17;19)(p11.2;q12)$ e uma *three-way* $t(6;11;17)(q25;q23;q12)$, todas esclarecidas por técnicas de citogenética molecular (BAC-FISH, WCP-FISH e MCB). Outras alterações estruturais incluíram $i(Xq)$, $del7q$, $del11q$, $del12p$ e $del14q$.

Figura 6 – Figura mostrando cariótipo com translocação $t(11;14)$ por banda G



Fonte: o autor

Quadro 5 - Resultados da citogenética convencional confirmados por citogenética molecular

Casos	Cariótipo
HUOC.01	46,XX,del7q[7]/46,XX[9]
HUOC.03	45,XX,-7[6]/46,XX[1]
HUOC.04	46,XX,der(17)(17p11.2->17p11.2::19p?->19q?:),der(19)t(17;19)(p11.2;q13)del(17)(p12)
HUOC.06	46,XX[26]
HUOC.07	46,XY[17]
HUOC.08	46,XY[15]
HUOC.09	74-92,XXXX[11]/46,XX[13]
HUOC.10	46,XY[20]
HUOC.11	90-92XXYY[6]/46,XY[12]
HUOC.12	46,XY,i(Xq)[4]/46,XY[15]
HUOC.13	45,XY, -19[6]/46,XY,del11q,del12p, -19, + mar[5]/
HUOC.14	46,XY[28]
HUOC.15	47,XY, +9[4]/46,XY[16]
HUOC.16	48,XX, +6,+8[3]/46XX[16]
HUOC.17	47,XX, t(6;11;17)(q25;q23;q12),+21[12]/46XX[5]
HUOC.18	46,XY[20]
HUOC.21	46,XY, t(11;14) (p13;q11) [8] /46, XY [5]
HUOC.22	46,XY,t(11;14)(p13;q11)[9] / 46,XY [11]
HUOC.23	72-105,XXYY[4]/46,XY[7]
HUOC.25	46,XY,del(14q)[11]/46,XY[13]
HUOC.26	52-54, XY [10]
HUOC.27	46,XY
HUOC.28	46,XY, t(3;13)(p25.1;q13)
HUOC.35	46,XY
HUOC.37	46,XX/47,XX,+21/ 48,XX,+8,+21/48,XX,+2,+21/ 48,XX,+18,+21/ 48,XX,+8,+18
HUOC.38	46,XX/47,XX,+20
HUOC.39	46,XX/47,XX,+21/47,XX,+8/49,XX,+8,+9,+21/48,XX,+21,+21

Citogenética molecular por FISH foi realizada em 16 pacientes e mostrou em quatro casos o gene *Hox11L2* (*TLX3*) rearranjado e em dois deletado; em um caso foi observado o *Hox11* (*TLX1*) rearranjado; e em 3 casos o gene *TCR- $\alpha\beta$* estava rearranjado, sendo dois devido a translocação t(11;14) (p13;q11). A investigação da amplificação epissomal do gene *ABL* foi feita em 20 pacientes, mas foi negativo em todos.

Uma paciente (caso 37) foi diagnosticada com mosaicismo de Síndrome de Down a partir de cultura de linfócitos de SP estimulada com Fitohepatoglutamina, pelo achado da trissomia constitucional. Esse resultado foi confirmado com FISH em células de mucosa bucal utilizando a sonda Vysis ETO/AML1 dual fusion. A paciente foi diagnosticada com baixo mosaicismo e não apresentava sinais fenotípicos da doença.

8 DISCUSSÃO

Apesar da LLA ser a leucemia mais comum entre os pacientes pediátricos, a LLA-T representa apenas 15% desses casos. A baixa incidência desse câncer dificulta seu estudo. A idade de diagnóstico média encontrada entre os pacientes incluídos nesse estudo foi de 9,9 anos, sendo esse número ligeiramente maior que o encontrado em literatura. Em um estudo desenvolvido em pacientes de Taiwan, realizado por Yeh e colaboradores (2019), esse número foi de 8,6; já na França, Petit e colaboradores (2018) encontraram a média de 9,5 anos ao diagnóstico (PETIT *et al.*, 2018; YEH *et al.*, 2019). Uma revisão entre estudos diferentes do Hospital St. Jude nos Estados Unidos mostrou uma média de 8,9 anos (TEACHEY; PUI, 2019). A leucocitose, visceromegalias e adenomegalias foram achados comuns, concordante com a literatura. Já a massa mediastinal, achado esperado para a LLA-T, esteve presente em 45% dos casos, tendo Yeh encontrado em 50% dos casos, enquanto que Teachey & Pui encontraram em apenas 30% (TEACHEY; PUI, 2019; YEH *et al.*, 2019) (Tabela 5).

Em relação as alterações moleculares, observou-se um valor significativamente menor de mutações no gene *Notch1* em relação aos estudos citados anteriormente. Porém isso pode ser justificado por nesse estudo só ter sido avaliado a região PEST, enquanto que nos outros estudos o avaliou-se também a região HD, além da ANK e TAD. A fusão *Sil-Tal1*, as translocações envolvendo o gene *KMT2A*, e a expressão ectópica dos genes *Hox11* e *Hox11L2* foram significativamente menos presentes na nossa população que nas populações dos outros estudos, podendo indicar uma diferença na base genética da doença na população pernambucana (PETIT *et al.*, 2018; TEACHEY; PUI, 2019; YEH *et al.*, 2019). A tabela 2 apresenta um comparativo entre esses estudos e o estudo aqui descrito.

Tabela 2 - Comparativo entre estudos

Estudo	Teachey & Pui (2019)	Petit et al. (2018)	Yeh et al. (2019)	Atual estudo
População	St. Jude Hospital (EUA)	França	Taiwan	Pernambuco
Idade (anos)	8,9	9,5	8,6	9,9
Sexo (M:F)	2,6:1	4,8:1	2,9:1	3,1:1
	Leucocitose (84%)	WBC mediana 100x10 ⁶	WBC mediana 99x10 ⁶	WBC mediana 114x10 ⁶
Clínica	Massa Mediastinal (30%)	-	Massa mediastinal (50,5%)	Massa Mediastinal (45%)
sobrevida	78,4%	72,8%	96,6%	60%
Sil-Tal1	33%	13%	19,6%	4,5%
Hox11	10%	7%	9,2%	1,8%
Hox11L2	16%	26%	17,2%	12,7%
KMT2A	79%	57%	47,4%	38%
Notch1	79%	57%	47,4%	38%

Apesar de amplamente estudado na LMA, pouco se sabe do *FLT3* na LLA-T. O baixo número de *FLT3*-ITD (3,3%) encontrado nas crianças pernambucanas corrobora com o estudo polonês que reportou a presença da alteração *FLT3*-ITD em apenas 3% (2/65) dos casos de LLA-T pediátrica (KRASZEWSKA; DAWIDOWSKA; KOSMALSKA; SEDEK; *et al.*, 2013).

Consensualmente, a mutação do *FLT3* é uma *passenger mutation*, ou seja, uma mutação que não dá início à leucemogênese, mas pode dar a célula cancerígena vantagens em relação a proliferação e apoptose. A exceção é uma mutação no domínio extracelular dessa proteína, identificada por Vicente e colaboradores (2015) que parece ser uma *driver mutation*, ou seja, uma mutação capaz de levar ao desenvolvimento do processo leucêmico (KRASZEWSKA; DAWIDOWSKA; KOSMALSKA; SEDEK; *et al.*, 2013; VICENTE *et al.*, 2015).

Dois dos pacientes aqui descritos apresentam alteração no *FLT3* com repetições de 25 a 35 bases nitrogenadas e expressão ectópica do *Hox11L2*. O conjunto de alteração não pareceu impactar no prognóstico, já que os pacientes não foram a óbito no período de 5 anos após o tratamento. Van Vlierberghe e colaboradores (2005) reportaram dois dentre 72 (2,7%) casos de LLA-T em crianças holandesas também com alteração no *FLT3*, caracterizadas por repetições de 51 e 57 bases, e expressão do *Hox11L2* (VLIERBERGHE, VAN *et al.*, 2005). A importância da variação de tamanho da duplicação do *FLT3* entre os pacientes no prognóstico da doença e como controle de DRM ainda é controversa (KRASZEWSKA; DAWIDOWSKA; KOSMALSKA; SEDEK; *et al.*, 2013).

Já em relação ao *Notch1*, um estudo envolvendo 65 pacientes pediátricos e adultos, Zhu e colaboradores (2006) encontraram mutação em quatro segmentos do gene *Notch1* (HD, PEST, TAD e ANK) em 29 pacientes (44,6%), sendo 32 mutações diferentes, das quais 5 (15% das mutações) ocorriam na região PEST, sendo 3 mutações pontuais (ZHU *et al.*, 2006). Kraszewska e colaboradores (2013) estudaram alterações no gene *Notch1* exclusivamente em pacientes pediátricos com LLA-T, e mostraram uma frequência de 40% (26/65) de mutações, sendo em 18% dos pacientes as mutações na região correspondente ao domínio PEST, relacionadas a degradação do ICN1, e predominantemente associada a mudança de fase de leitura ou introdução de código de parada (KRASZEWSKA; DAWIDOWSKA; KOSMALSKA; SEDEK; *et al.*, 2013). Nossos achados mostraram uma frequência maior (30%) de mutações na região PEST do gene *Notch1* das crianças brasileiras com LLA-T do que a reportada em crianças polonesas. Outra diferença foi que as mutações não sinônimas no domínio PEST corresponderam a mudança em aminoácido (14 de 21, 66%) e em menor proporção a mudança de fase de leitura (5 de 21, 24%) ou introdução de código de parada (2 de 21, 10%). Ainda, encontramos cinco casos com

mutações sinônimas sem mudança de aminoácido na sequência da proteína, porém mais estudos são necessários para esclarecer se essas alterações podem influenciar na interação com microRNAs e, em consequência, regulando a expressão do gene. De uma forma geral, a presença dessas mutações não esteve associada a resposta ao tratamento, cujo protocolo considera a LLA-T uma doença de alto risco de recaída, por conseguinte a quimioterapia é mais intensa. Entretanto, mutações em outras regiões no gene *Notch1* ainda precisam ser analisadas.

Em relação a citogenética, dos 27 casos estudados 12 apresentavam alterações numéricas, sendo 10 (37%) hiperdiploidias, diferindo da literatura que diz que esse tipo de alteração é raro para a doença (GUEIROS, 2015; KARRMAN; JOHANSSON, 2017; OLSHANSKAYA *et al.*, 2019). Entre os 12 paciente com alterações numéricas, 11 apresentaram 5 anos livre de eventos após o tratamento, podendo indicar um bom prognóstico relacionado a este perfil citogenético. Entre as translocações, dos 5 casos encontrados 3 eram alterações não recorrentes, sendo uma delas uma translocação em três vias envolvendo os cromossomos 6, 11 e 17. Alterações estruturais envolvendo os cromossomos 7 e 14 são comumente observadas nas LLA-T, nesses cromossomos se localizam os genes que codificam os TCRs (GUEIROS, 2015). A t(11;14) envolve esses genes, e apesar de recorrente nesse tipo de leucemia, seu impacto ainda é desconhecido (MEIJERINK, 2010). A amplificação epissomal do gene *Abl1* não foi encontrada em nenhum dos 20 casos avaliados, possivelmente pelo fato da alteração ser rara, estando presente em aproximadamente em 6% dos casos (GRAUX *et al.*, 2006b). Nesse caso o número de amostras analisadas foi uma limitação do estudo. As translocações t(3;13) e (17;19) haviam sido reportadas anteriormente, porém envolvendo diferentes pontos de quebra e em outras malignidades (MINSON *et al.*, 2013; TROADEC *et al.*, 2017). O ponto de quebra na translocação t(3;13) aqui descrita era próximo da região onde se localiza o gene *FLT3*, porém o sequenciamento deste gene não pode ser executado neste paciente devido a disponibilidade da amostra.

A leucemia da infância é em si uma doença rara, e a LLA-T corresponde a apenas 15% das leucemias pediátricas, por isso a dificuldade de se estudar e a pouca literatura específica. Apesar dessas limitações, nosso estudo respondeu as questões propostas, esclarecendo a frequência dessas alterações na LLA-T pediátrica, seu

impacto no prognóstico da doença e a relevância na inclusão do teste na rotina diagnóstica.

9 CONCLUSÃO

A LLA-T da criança é uma doença que ainda carece de esclarecimentos em relação a sua base genética, com a taxa de mortalidade variável de acordo com a população de estudo, o protocolo de tratamento, e as condições de suporte médico-hospitalar.

Apesar do prognóstico reservado associado as alterações no *FLT3* em LMA, nenhum dos pacientes com LLA-T e mutação no *FLT3* morreram no período de 5 anos após o tratamento. As mutações na região PEST do *Notch1*, também indicativo de mal prognóstico na LMA, e o *Hox11L2* não foram associadas a um pior prognóstico.

Esse estudo mostrou ainda a importância da citogenética molecular como ferramenta auxiliar para a citogenética convencional. Os pacientes com as translocações t(11:14), t(17:19) e t(3;13) recidivaram precocemente e foram a óbito, sugerindo um mal prognóstico dessas alterações.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunologia Molecular e Celular. 8 ed; Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ALEXANDER, T. B. *et al.* The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. Nature, v. 562, n. 7727, p. 373–406, Outubro. 2018.
- ALMEIDA, R. S. Avaliação do papel de moléculas imunológica solúveis, polimorfismos genéticos e microRNAs em Leucemia Linfoblástica Aguda de células T da infância. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.
- ALMEIDA, R. S. *et al.* Cytokines and soluble HLA-G levels in bone marrow stroma and their association with the survival rate of patients exhibiting childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Cytokine, v. 102, p. 94–101, Fevereiro. 2018.
- AMBINDER, A. J.; LEVIS, M. Potential targeting of FLT3 acute myeloid leukemia. Haematologica, v. 106, n. 3, p. 671–681, Julho. 2020.
- ANDERSEN, P. *et al.* Non-canonical Notch signaling: Emerging role and mechanism. Trends in Cell Biology, v. 22, n. 5, p. 257–265, Maio. 2012.
- ARBER, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, Maio. 2016.
- AYTON, P. M.; CLEARY, M. L. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. Oncogene, v. 20, n. 40, p. 5695–5707, Setembro. 2001.
- BARBER, K. E. *et al.* Amplification of the ABL gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia, v. 18, n. 6, p. 1153–1156, Abril. 2004.
- BARDELLI, V. *et al.* T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biomarkers and Their Clinical Usefulness. Genes, v. 12, n. 8, p. 1118-1138, Julho. 2021.
- BENE, M. C. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia, v. 9, n. 10, p. 1783–1786, Outubro. 1995.
- BÉNÉ, M. C. *et al.* Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. Leukemia, v. 25, n. 4, p. 567–574, Abril. 2011.
- BENNETT, J. M. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. British Journal of Haematology, v. 33, n. 4, p. 451–458. 1976.
- BOWMAN, R. L.; BUSQUE, L.; LEVINE, R. L. Clonal Hematopoiesis and Evolution to Hematopoietic Malignancies. Cell Stem Cell, v. 22, n. 2, p. 157–170, Fevereiro. 2018.
- BRAHMACHARI, S. *et al.* c-Abl and Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. Journal of Parkinson's disease, v. 7, n. 4, p. 589–601, Janeiro. 2017.
- BREUGEL, F. M. VAN; LANGHOUT, B. V. The NOTCH Locus of DROSOPHILA

- HYDEI: Alleles, Phenotypes and Functional Organization. Genetics, v. 103, n. 2, p. 197–217, Fevereiro. 1983.
- BRZOZOWA-ZASADA, M. *et al.* Notch and its oncogenic activity in human malignancies. European surgery : ACA : Acta chirurgica Austriaca, v. 49, n. 5, p. 199–209, Fevereiro. 2017.
- CHAN, A. K. N.; CHEN, C.-W. Rewiring the Epigenetic Networks in MLL-Rearranged Leukemias: Epigenetic Dysregulation and Pharmacological Interventions. Frontiers in cell and developmental biology, v. 7, p. 81, Maio. 2019.
- CHO, S. *et al.* Altered expression of Notch1 in Alzheimer's disease. Plos one, v. 14, n. 11, p. 1-18, Novembro. 2019.
- CILLONI, D.; SAGLIO, G. Molecular pathways: BCR-ABL. Clinical cancer research, v. 18, n. 4, p. 930–937, Fevereiro. 2012.
- COLICELLI, J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. Science signaling, v. 3, n. 139, p. 1-27, Setembro. 2010.
- COMOLI, P. *et al.* BCR-ABL-specific T-cell therapy in Ph+ ALL patients on tyrosine-kinase inhibitors. Blood, v. 129, n. 5, p. 582–586, Fevereiro. 2017.
- DAVER, N. *et al.* Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. Leukemia, v. 33, n. 2, p. 299–312, Janeiro. 2019.
- DEFTOS, M. L. *et al.* Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. Immunity, v. 13, n. 1, p. 73–84, Julho. 2000.
- ELLISEN, L. W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell, v. 66, n. 4, p. 649–661, Agosto. 1991.
- FERRANDO, A. A. *et al.* Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. Blood, v. 102, n. 1, p. 262–268, Julho. 2003.
- FERRANDO, A. A.; LÓPEZ-OTÍN, C. Clonal evolution in leukemia. Nature medicine, v. 23, n. 10, p. 1135–1145, Outubro. 2017.
- FORGIONE, M. O. *et al.* KMT2A rearranged acute lymphoblastic leukaemia: Unravelling the genomic complexity and heterogeneity of this high-risk disease. Cancer letters, v. 469, p. 410–418. 2020.
- GARCÍA-PEYDRÓ, M. *et al.* The NOTCH1/CD44 axis drives pathogenesis in a T cell acute lymphoblastic leukemia model. The Journal of clinical investigation, v. 128, n. 7, p. 2802–2818, Julho. 2018.
- GHARAIBEH, L. *et al.* Notch1 in Cancer Therapy: Possible Clinical Implications and Challenges. Molecular pharmacology, v. 98, n. 5, p. 559–576, Setembro. 2020.
- GRAFONE, T. *et al.* An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. Oncology reviews, v. 6, n. 1, p. 64–74, Março. 2012.
- GRAUX, C. *et al.* Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic

leukemia: from thymocyte to lymphoblast. Leukemia, v. 20, n. 9, p. 1496–1510, Julho. 2006.

GUEIROS, E. B. Perfil Citogenético e Molecular da Leucemia Linfóide Aguda de Linhagem T, em Pacientes Pediátricos do Centro de Oncohematologia do Hospital Oswaldo Cruz. Tese (Doutorado) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2015.

HOEHN, D. *et al.* CD117 Expression Is a Sensitive but Nonspecific Predictor of FLT3 Mutation in T Acute Lymphoblastic Leukemia and T/Myeloid Acute Leukemia. American Journal of Clinical Pathology, v. 137, n. 2, p. 213–219, Fevereiro. 2012.

INCA. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ, 2019.

KANG, H. *et al.* Dysregulated transcriptional networks in KMT2A- and MLLT10-rearranged T-ALL. Biomarker Research, v. 6, n. 1, p. 1–6, Agosto. 2018.

KANNAN, R. *et al.* The Abl pathway bifurcates to balance Enabled and Rac signaling in axon patterning in *Drosophila*. Development, v. 144, n. 3, p. 487–498, Fevereiro. 2017.

KARRMAN, K.; JOHANSSON, B. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. Genes, chromosomes & cancer, v. 56, n. 2, p. 89–116, Fevereiro. 2017.

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

LIANG, K. *et al.* Therapeutic Targeting of MLL Degradation Pathways in MLL-Rearranged Leukemia. Cell, v. 168, n. 1–2, p. 59–72, Janeiro. 2017.

LIMA, L. P. O. DE. Polimorfismos De Genes Da Imunidade Em Pacientes Infantojuvenis Diagnosticados Com Leucemia Linfoblástica Aguda E Infecções Bacterianas. Tese (Doutorado) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2020.

LINS, M. M. *et al.* Incidence and survival of childhood leukemia in Recife, Brazil: A population-based analysis. Pediatric Blood and Cancer, v. 64, n. 8, p. 1–6, 2017.

MACDONALD, H. R.; WILSON, A.; RADTKE, F. Notch1 and T-cell development: insights from conditional knockout mice. Trends in immunology, v. 22, n. 3, p. 155–160, Março. 2001.

MANSUR, M. B. Mutações no gene NOTCH1 e outras alterações moleculares relacionadas à etiopatogênese das Leucemias Linfoblásticas Agudas de Linhagem T. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 2008.

MCKENNA, H. J. *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. Blood, v. 95, n. 11, p. 3489–3497, Junho. 2000.

MEIJERINK, J. P. P. Genetic rearrangements in relation to immunophenotype and outcome in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Best practice & research. Clinical haematology, v. 23, n. 3, p. 307–318, Setembro. 2010.

MEYER, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. Leukemia, v. 32, n. 2, p. 273–284, Fevereiro. 2018.

- MICHELINI, S. *et al.* NOTCH1: Review of its role in lymphatic development and study of seven families with rare pathogenic variants. Molecular genetics & genomic medicine, v. 9, n. 1, p.1-11. 2021.
- MILOUDI, K. *et al.* NOTCH1 signaling induces pathological vascular permeability in diabetic retinopathy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 116, n. 10, p. 4538–4547, Março. 2019.
- MINSON, K. A. *et al.* t(17;19) in children with acute lymphocytic leukemia: a report of 3 cases and a review of the literature. Case Reports in Hematology, v.2013, p. 1-4, 2013.
- MULLIGHAN, C. G. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *In*: PUI, C.-H. (Org.). Childhood Leukemias. Londres: Cambridge University Press, 2012. cap. 7, p. 168–203.
- NAGAR, B. *et al.* Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. Cell, v. 112, n. 6, p. 859–871, Março. 2003.
- NOVAK, S. *et al.* Modulation of Notch1 signaling regulates bone fracture healing. Journal of orthopaedic research, v. 38, n. 11, p. 2350–2361, Novembro. 2020.
- OFRAN, Y.; IZRAELI, S. BCR-ABL (Ph)-like acute leukemia-Pathogenesis, diagnosis and therapeutic options. Blood reviews, v. 31, n. 2, p. 11–16, Março. 2017.
- OLSHANSKAYA, Y. *et al.* Clinical significance of cytogenetic changes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the multicenter group Moscow-Berlin (MB). Leukemia & lymphoma, v. 60, n. 2, p. 426–432, 2019.
- OTHMAN, M. A. . *et al.* Cryptic NUP214-ABL1 fusion with complex karyotype, episomes and intra-tumor genetic heterogeneity in a T-cell lymphoblastic lymphoma. Journal of Cancer Metastasis and Treatment, v. 4, n. 9, p. 50-59, Setembro. 2018.
- PETIT, A. *et al.* Oncogenetic mutations combined with MRD improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood, v. 131, n. 3, p. 289–300, Janeiro. 2018.
- RAMDENY, P. S. *et al.* Infant T-cell acute lymphoblastic leukaemia with t(6;7) (TCRB-MYB) translocation. British journal of haematology, v. 194, n. 3, p. 613–616, Maio. 2021.
- ROSATI, E. *et al.* NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. Frontiers in oncology, v. 8, n. 229, p. 1-20, Julho. 2018.
- SAITO, K. *et al.* Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells in fetal intra-aortic hematopoietic clusters by the Sox17-Notch1-Hes1 axis. Experimental cell research, v. 365, n. 1, p. 145–155, Abril. 2018.
- SANCHEZ-MARTIN, M. *et al.* Synergistic antileukemic therapies in NOTCH1-induced T-ALL. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 114, n. 8, p. 2006–2011, Fevereiro. 2017.
- SANCHEZ-MARTIN, M.; FERRANDO, A. The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood, v. 129, n. 9, p. 1124–1133, Março. 2017.
- SANDA, T.; LEONG, W. Z. TAL1 as a master oncogenic transcription factor in T-cell

acute lymphoblastic leukemia. Experimental hematology, v. 53, p. 7–15, Setembro. 2017.

SMALL, D. FLT3 mutations: biology and treatment. Hematology. American Society of Hematology, v. 2006, n. 1, p. 178–184, Janeiro. 2006.

STIER, S. *et al.* Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. Blood, v. 99, n. 7, p. 2369–2378, Abril. 2002.

SULIS, M. L. *et al.* NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL. Blood, v. 112, n. 3, p. 733–740, Agosto. 2008.

TAKAHASHI, Satoshi; YOKOYAMA, A. The molecular functions of common and atypical MLL fusion protein complexes. Biochimica et biophysica acta - Gene regulatory mechanisms, v. 1863, n. 7, p. 1-42, Julho. 2020.

TEACHEY, D. T.; PUI, C.-H. Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. The Lancet Oncology, v. 20, n. 3, p. 142–154, Março. 2019.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. Blood cancer journal, 30 jun. 2017. v. 7, n. 6, p. 577-589, Junho. 2017.

TROADEC, E. *et al.* A novel t(3;13)(q13;q12) translocation fusing *FLT3* with *GOLGB1*: towards Myeloid/Lymphoid neoplasms with eosinophilia and rearrangement of *FLT3*?. Leukemia, v. 31, n. 13, p. 514-517, Fevereiro. 2017.

TSAPOGAS, P. *et al.* The Cytokine Flt3-Ligand in Normal and Malignant Hematopoiesis. International journal of molecular sciences, v. 18, n. 6, p. 1–23, Maio. 2017.

TURHAN, A. ABL1 v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, v. 13, n. 7, p. 462–466, Novembro. 2011.

VAGAPOVA, E. R. *et al.* The Role of TAL1 in Hematopoiesis and Leukemogenesis. Acta naturae, v. 10, n. 1, p. 15–23, Janeiro. 2018.

VARDIMAN, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood, v. 114, n. 5, p. 937–951, Julho. 2009.

VICENTE, C. *et al.* Targeted sequencing identifies associations between IL7R-JAK mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Haematologica, v. 100, n. 10, p. 1301–1310, Outubro. 2015.

VLIERBERGHE, P. VAN *et al.* Activating FLT3 mutations in CD4+/CD8- pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias. Blood, v. 106, n. 13, p. 4414–4415, Dezembro. 2005.

WAEL, H. *et al.* Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. Lung cancer, v. 85, n. 2, p. 131–140, Agosto. 2014.

WANG, J. Y. J. The capable ABL: what is its biological function? Molecular and

cellular biology, v. 34, n. 7, p. 1188–1197, Abril. 2014.

WENG, A. P. *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science, v. 306, n. 5694, p. 269–271, Outubro. 2004.

YEH, T. C. *et al.* Clinical and biological relevance of genetic alterations in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. Pediatric Blood & Cancer, v. 66, n. 1, p. 1-9. 2019.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

ZHU, Y.-M. *et al.* NOTCH1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance and implication in multifactorial leukemogenesis. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, v. 12, n. 10, p. 3043–3049, Maio. 2006.

APENDICE A – ARTIGO

ALTERAÇÕES DOS GENES FLT3-ITD E Notch1 PEST EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA AGUDA DE CÉLULAS T EM PERNAMBUCO

Authors: João Lucas Cruz Souza^{1,2}, Renan Garcia Gomes³, Rossana do Nascimento Santos³, Terezinha de Jesus Marques-Salles², Norma Lucena-Silva^{1,3}.

¹Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brasil.

²Laboratório de Citogenética, Centro de Oncohematologia Pediátrica, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Brasil.

³Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Medicina Integral professor Fernando Figueira, Recife, Brasil.

RESUMO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) de células T é uma neoplasia maligna hematológica agressiva que representa 15% das LLAs da infância. Atualmente, são descritas anormalidades genéticas específicas com importância no diagnóstico e prognóstico da doença. Através de estudos citogenéticos e moleculares é possível identificar oncogenes envolvidos na patogenia da doença. O objetivo do trabalho foi determinar a frequência e o impacto das alterações nos genes FLT3 e Notch1 em pacientes pediátricos com Leucemia de células T em Pernambuco e estabelecer seu perfil genético. Foram estudados 129 pacientes com LLA-T no IMIP e no HUOC. A citogenética foi avaliada por banda G e FISH, o perfil genético por PCR com o painel estabelecido pelo Laboratório de Biologia Molecular do IMIP, e as alterações FLT3-ITD e mutação na região PEST do Notch1 por sequenciamento. Em relação ao painel molecular, dos 110 pacientes do IMIP, 14 foram positivos para a expressão do gene TLX3 e 2 para o TLX1. A fusão SIL-TAL1 foi positiva em 5, a t(9;11) foi positiva em 3, a t(10;11) em 2 e a t(11;19) em 2. A citogenética clássica foi analisada em 27 pacientes e mostrou cariótipos normais em 30%, alterações numéricas em 37%, e estruturais em 41%. Foram observadas as translocações t(3;13), t(17;19), t(6;11;17) e duas t(11;14), todas definidas por citogenética molecular. A técnica de FISH mostrou rearranjo do gene TLX3 em 4 casos e deleção em 2. Três tiveram rearranjo do gene TCR- $\alpha\beta$; cinco o rearranjo SIL-TAL1 (sendo estes diferentes dos avaliados pela molecular); e 1 rearranjo do TLX1. A amplificação do gene ABL1 foi negativa em todos os investigados. Foram encontradas ainda as alterações estruturais i(Xq) e del7q, 11q, 12p e 14q. Em relação à alteração FLT3-ITD, 90 pacientes foram avaliados dos quais 3 positivos, dois deles sendo associado com o Hox11L2, e o terceiro sendo uma ETP. Em relação ao Notch1, 69 pacientes foram analisados, dos quais 26 pacientes apresentaram 22 mutações diferentes, sendo predominantemente mutação pontual.

Apesar do mal prognóstico do FLT3 na Leucemia Mieloide Aguda, todos estão vivos no período de 5 anos após o tratamento. O impacto do Notch1 na LLA-T ainda necessita de esclarecimentos. Em relação a citogenética, esse estudo mostra a necessidade da citogenética molecular como auxílio diagnóstico. As translocações t(11;14), t(17;19) e t(3;13) sugeriram mal prognóstico, já que esses pacientes recaíram precocemente e foram a óbito.

INTRODUÇÃO

O gene *FMS-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3)* é amplamente expresso em células tronco hematopoiéticas (CTH), associado a processos de proliferação e sobrevivência (GRAFONE *et al.*, 2012; MCKENNA *et al.*, 2000). Ele possui forte atividade sinérgica associado com outras citocinas relacionadas ao desenvolvimento de células hematopoiéticas, incluindo fatores de crescimento e interleucinas, e em linfócitos esta proteína tem impacto nos estágios iniciais de sua ontogenia (TSAPOGAS *et al.*, 2017).

Duas alterações são comumente descritas no gene *FLT3*: Duplicação interna in tandem (FLT3-ITD) no domínio justamembranar e mutações no domínio tirosina quinase (FLT3-TKD) (ARBER *et al.*, 2016; DAVER *et al.*, 2019). A presença da mutação provoca autofosforilação e ativação constitutiva da proteína, e garante a célula leucêmica vantagem na proliferação e escape da apoptose (ARBER *et al.*, 2016; DAVER *et al.*, 2019; TSAPOGAS *et al.*, 2017). O impacto dessas alterações é bem estabelecido na Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e Leucemia Aguda de Fenótipo Misto (LAFM), conhecido pelo mal prognóstico (ALEXANDER *et al.*, 2018; HOEHN *et al.*, 2012). Nas malignidades linfoides, estudos envolvendo essa alteração são escassos, especialmente em pacientes pediátricos da população brasileira.

O gene *Notch1* é expresso em muitos sistemas e sua expressão está relacionada a uma grande variedade de processos, incluindo regeneração óssea e formação do sistema linfático (MICHELINI *et al.*, 2021; NOVAK *et al.*, 2020). No sistema hematopoiético, esses genes são responsáveis pela manutenção do pool de CTHs e intimamente relacionado ao desenvolvimento de células T, especialmente nos estágios iniciais no Timo (SAITO *et al.*, 2018; STIER *et al.*, 2002). Essa proteína é ativada na presença de um ligante que pode ser de duas famílias: A família Serrate,

sendo Jegger-1 e -2, e a família Delta, sendo Delta-Like-1, -3 e -4 (ROSATI *et al.*, 2018; SANCHEZ-MARTIN *et al.*, 2017). O contato entre a proteína e o ligante ocorre durante a interação célula-célula (ROSATI *et al.*, 2018; SANCHEZ-MARTIN *et al.*, 2017).

Muitas alterações no *Notch1* foram descritas, sendo as mutações de base e mutações do tipo indel as mais comuns, especialmente em duas regiões: o domínio de heterodimerização (HD) e a região rica em prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T) (região PEST) (BRZOZOWA-ZASADA *et al.*, 2017; GARCÍA-PEYDRÓ *et al.*, 2018). Essas alterações causam a alteração constitutiva da proteína *Notch1*, levando ao processo leucêmico (BRZOZOWA-ZASADA *et al.*, 2017).

A Leucemia Linfóide Aguda de células T (LLA-T) é uma doença agressiva que afeta timócitos, e representa 15% das LLAs, com uma média de 9,6 casos por ano na população de Pernambuco (ALMEIDA *et al.*, 2018; GUEIROS, 2015; KARRMAN; JOHANSSON, 2017). Seu perfil genético é muito heterogêneo, o que dificulta sua estratificação (ARBER *et al.*, 2016). O objetivo desse estudo foi estabelecer a frequência e o impacto da alteração FLT3-ITD e alteração na região PEST do gene *Notch1* em pacientes pediátricos com LLA-T em Pernambuco.

MÉTODOS

FLT3-ITD

O DNA genômico foi obtido a partir de células da Medula Óssea (MO) de pacientes pediátricos admitidos no IMIP e diagnosticados com LLA-T, usando o DNAzol, seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, EUA). O DNA extraído foi submetido a PCR usando os iniciadores: 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC and 3'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC para amplificação de um fragmento de 360pb na região justa-membranar do gene *FLT3*. Eletroforese com gel de poliacrilamida a 10% com o produto de PCR confirmou a presença da alteração esperada. Amostras com banda única foram consideradas do tipo selvagem, enquanto a banda dupla foi considerado indicativo da presença da mutação em heterozigose. Todas as amostras mostrando bandas de tamanhos diferentes foram enviadas para sequenciamento na plataforma multiuso da Fiocruz de Pernambuco para confirmação da presença da mutação ITD pelo método de Sanger,

usando o protocolo Big Dye e o equipamento 3500-ABI (Applied Biosystems. XXX). Apenas cromatogramas mostrando alta qualidade de sequenciamento foram considerados, e a análise foi feita utilizando os softwares SeqMan e MegaX.

Notch1 PEST

Para a investigação da região PEST do gene *Notch1*, o DNA foi submetido a técnica de PCR utilizando os iniciadores: 5'- GCTGCACAGTAGCCTTGCTG and 3'- CTCGGCTCTCCACTCAGGAA. O produto era então submetido a eletroforese em gel de agarose a 2%. As amostras que mostraram amplificação foram submetidos ao sequenciamento por Sanger como citado anteriormente. Os resultados foram avaliados usando o software SeqMan tendo como referência a sequência disponibilizada no NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi, referência: NG_007458.1).

RESULTADOS

Entre 2005 e 2021, 90 pacientes foram admitidos no IMIP e diagnosticados com LLA-T. A maioria era do sexo masculino (79%), com idade variando de 0 a 16 anos, a maioria (53,8%) com mais de 10 anos (mediana de 13,2 anos). O hemograma mostrou leucocitose com mediana de 114.000 leucócitos/mm³, a maioria (72,6%) com mais de 100.000 leucócitos/mm³; anemia com mediana de 8g/dL de hemoglobina; trombocitopenia com mediana de 60.000 trombócitos/mm³, com 41% entre 50-100.000/mm³ e 41% com menos de 50.000/mm³. A Desidrogenase Láctica teve uma mediana de 1.599U/L e uma média de 2.129,3 U/L ($\pm 2,732$). O imunofenótipo mais comum era LLA pré-T com 25% dos casos. Características clínicas foram hepatoesplenomegalia (70%), linfadenopatia (80%) e massa mediastinal (45%).

A taxa de remissão completa foi alta, com 87%, e a de recaída foi baixa com 12%. Entre esses pacientes, 27% morreram durante o curso da doença, 42% não apresentaram eventos no período de 5 anos após o tratamento, 4% finalizaram o tratamento e estão em remissão e 27% ainda estão em tratamento.

FLT3-ITD

Apenas 3 pacientes foram positivos para FLT3-ITD. As regiões duplicadas variaram de 25 a 35pb com sequências diferentes. Dois desses paciente também

foram positivos para a expressão ectópica do gene *Hox11L2*, e o terceiro foi diagnosticado com LLA-ETP. Um paciente que apresentava FLT3-ITD e expressão do *Hox11L2* também tinha uma mutação sinônima no gene *Notch1* (7209G>A). Nenhum dos pacientes com a mutação morreram no período de 5 anos após tratamento.

Notch1 PEST

Entre os 90 pacientes estudado, 21 sequências apresentaram qualidade questionável e foram descartados. Mutações foram encontradas em 26 amostras das 69 avaliadas, 3 amostras apresentavam 2 mutações e uma amostra cada apresentava 3, 4 e 5 mutações. No total, 22 mutações diferentes foram identificadas, sendo 16 mutações de base, 3 inserções, 2 deleções, e 1 mutação de base seguida de inserção. Mutações sinônimas representaram 10 das 16 mutações de base, a mutação mais comum foi 6853G>A(V2285I), presente em 9 amostras. Entre os pacientes com essa mutação, nenhum recaiu e 5 morreram durante o curso da doença.

DISCUSSÃO

Apesar da LLA ser a leucemia mais comum entre os pacientes pediátricos, a LLA-T representa apenas 15% desses casos. A baixa incidência desse câncer dificulta seu estudo. A idade de diagnóstico média encontrada entre os pacientes incluídos nesse estudo foi de 13,2 anos, sendo esse número ligeiramente maior que o encontrado em literatura. Em um estudo desenvolvido em pacientes de Taiwan, realizado por Yeh e colaboradores (2019), esse número foi de 8,6; já na França, Petit e colaboradores (2018) encontraram a média de 9,5 anos ao diagnóstico (PETIT *et al.*, 2018; YEH *et al.*, 2019). Uma revisão entre estudos diferentes do Hospital St. Jude nos Estados Unidos mostrou uma média de 8,9 anos (TEACHEY; PUI, 2019). A leucocitose, visceromegalias e adenomegalias foram achados comuns, concordante com a literatura. Já a massa mediastinal, achado esperado para a LLA-T, esteve presente em 45% dos casos, tendo Yeh encontrado em 50% dos casos, enquanto que Teachey & Pui encontraram em apenas 30% (TEACHEY; PUI, 2019; YEH *et al.*, 2019).

Apesar de amplamente estudado na LMA, pouco se sabe do FLT3 na LLA-T. O baixo número de FLT3-ITD (3,3%) encontrado nas crianças pernambucanas corrobora com o estudo polonês que reportou a presença da alteração FLT3-ITD em

apenas 3% (2/65) dos casos de LLA-T pediátrica(KRASZEWSKA; DAWIDOWSKA; KOSMALSKA; SEDEK; *et al.*, 2013).

Consensualmente, a mutação do FLT3 é uma passenger mutation, ou seja, uma mutação que não dá início à leucemogênese, mas pode dar a célula cancerígena vantagens em relação a proliferação e apoptose. A exceção é uma mutação no domínio extracelular dessa proteína, identificada por Vicente e colaboradores (2015) que parece ser uma driver mutation, ou seja, uma mutação capaz de levar ao desenvolvimento do processo leucêmico(KRASZEWSKA; DAWIDOWSKA; KOSMALSKA; SEDEK; *et al.*, 2013; VICENTE *et al.*, 2015).

Dois dos pacientes aqui descritos apresentam alteração no FLT3 com repetições de 25 a 35 bases nitrogenadas e expressão ectópica do Hox11L2. O conjunto de alteração não pareceu impactar no prognóstico, já que os pacientes não foram a óbito no período de 5 anos após o tratamento. Van Vlierberghe e colaboradores (2005) reportaram dois dentre 72 (2,7%) casos de LLA-T em crianças holandesas também com alteração no FLT3, caracterizadas por repetições de 51 e 57 bases, e expressão do Hox11L2(VLIERBERGHE, VAN *et al.*, 2005). A importância da variação de tamanho da duplicação do FLT3 entre os pacientes no prognóstico da doença e como controle de DRM ainda é controversa(KRASZEWSKA; DAWIDOWSKA; KOSMALSKA; SEDEK; *et al.*, 2013).

Já em relação ao Notch1, um estudo envolvendo 65 pacientes pediátricos e adultos, Zhu e colaboradores (2006) encontraram mutação em quatro segmentos do gene Notch1 (HD, PEST, TAD e ANK) em 29 pacientes (44,6%), sendo 32 mutações diferentes, das quais 5 (15% das mutações) ocorriam na região PEST, sendo 3 mutações pontuais(ZHU *et al.*, 2006). Kraszewska e colaboradores (2013) estudaram alterações no gene Notch1 exclusivamente em pacientes pediátricos com LLA-T, e mostraram uma frequência de 40% (26/65) de mutações, sendo em 18% dos pacientes as mutações na região correspondente ao domínio PEST, relacionadas a degradação do ICN1, e predominantemente associada a mudança de fase de leitura ou introdução de código de parada(KRASZEWSKA; DAWIDOWSKA; KOSMALSKA; SEDEK; *et al.*, 2013). Nossos achados mostram uma frequência maior (30%) de mutações na região PEST do gene Notch1 das crianças brasileiras com LLA-T do que a reportada em crianças polonesas. Outra diferença foi que as mutações não

sinônimas no domínio PEST corresponderam a mudança em aminoácido (14 de 21, 66%) e em menor proporção a mudança de fase de leitura (5 de 21, 24%) ou introdução de código de parada (2 de 21, 10%). Ainda, encontramos cinco casos com mutações sinônimas sem mudança de aminoácido na sequência da proteína, porém mais estudos são necessários para esclarecer se essas alterações podem influenciar na interação com microRNAs e, em consequência, regulando a expressão do gene. De uma forma geral, a presença dessas mutações não esteve associada a resposta ao tratamento, cujo protocolo considera a LLA-T uma doença de alto risco de recaída, por conseguinte a quimioterapia é mais intensa. Entretanto, mutações em outras regiões no gene Notch1 ainda precisam ser analisadas.

Em relação a citogenética, dos 27 casos estudados 12 apresentavam alterações numéricas, sendo 10 (37%) hiperdiploidias, sendo um achado considerado raro para a doença. Entre as translocações, dos 5 casos encontrados 3 eram alterações não recorrentes, sendo uma delas uma translocação complexa envolvendo os cromossomos 6, 11 e 17. Alterações estruturais envolvendo os cromossomos 7 e 14 são mais comumente observadas nas LLA-T, nesses cromossomos se localizam os genes que codificam os TCRs. A amplificação epissomal do gene Abl1 não foi encontrada em nenhum dos 20 casos avaliados, possivelmente pelo fato da alteração ser rara, estando presente em aproximadamente em 6% dos casos. Nesse caso o número de amostras analisadas foi uma limitação do estudo.

A leucemia da infância é em si uma doença rara, e a LLA-T corresponde a apenas 15% das leucemias pediátricas, por isso a dificuldade de se estudar e a pouca literatura específica. Apesar dessas limitações, nosso estudo respondeu as questões propostas, esclarecendo a frequência dessas alterações na LLA-T pediátrica, seu impacto no prognóstico da doença e a relevância na inclusão do teste na rotina diagnóstica.

CONCLUSÃO

A LLA-T da criança é uma doença que ainda carece de esclarecimentos em relação a sua base genética, com a taxa de mortalidade variável de acordo com a

população de estudo, o protocolo de tratamento, e as condições de suporte médico-hospitalar.

Apesar do prognóstico reservado associado as alterações no FLT3 em LMA, nenhum dos pacientes com LLA-T e mutação no FLT3 morreram no período de 5 anos após o tratamento. As mutações na região PEST do Notch1, também indicativo de mal prognóstico na LMA, e o Hox11L2 não foram associadas a um pior prognóstico.

Esse estudo mostrou ainda a importância da citogenética molecular como ferramenta auxiliar para a citogenética convencional. Os pacientes com as translocações t(11:14), t(17:19) e t(3;13) recidivaram precocemente e foram a óbito, sugerindo um mal prognóstico dessas alterações.

REFERÊNCIA

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Molecular e Celular**. [S.l.]: [s.n.], 2015. V. 8ed.

ALEXANDER, T. B. *et al.* The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. **Nature**, 2018. v. 562, n. 7727, p. 373–406.

ALMEIDA, R. S. **Avaliação do papel de moléculas imunológica solúveis, polimorfismos genéticos e microRNAs em Leucemia Linfoblástica Aguda de células T da infância**. [S.l.]: Fundação Oswaldo Cruz, 2017.

ALMEIDA, R. *et al.* Cytokines and soluble HLA-G levels in bone marrow stroma and their association with the survival rate of patients exhibiting childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cytokine**, 1 fev. 2018. v. 102, p. 94–101.

AMBINDER, A. J.; LEVIS, M. Potential targeting of FLT3 acute myeloid leukemia. **Haematologica**, 2021. v. 106, n. 3, p. 671–681.

ANDERSEN, P. *et al.* Non-canonical Notch signaling: Emerging role and mechanism. **Trends in Cell Biology**, maio. 2012. v. 22, n. 5, p. 257–265.

ARBER, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, 19 maio. 2016. v. 127, n. 20, p. 2391–2405.

- AYTON, P. M.; CLEARY, M. L. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. **Oncogene**, 10 set. 2001. v. 20, n. 40, p. 5695–5707.
- BARBER, K. E. *et al.* Amplification of the ABL gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia [8]. **Leukemia**, 2004. v. 18, n. 6, p. 1153–1156.
- BARDELLI, V. *et al.* T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biomarkers and Their Clinical Usefulness. **Genes**, 23 jul. 2021. v. 12, n. 8, p. 1118.
- BENE, M. C. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia**, out. 1995. v. 9, n. 10, p. 1783–6.
- BÉNÉ, M. C. *et al.* Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. **Leukemia**, 21 abr. 2011. v. 25, n. 4, p. 567–74.
- BENNETT, J. M. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. **British Journal of Haematology**, 1976. v. 33, n. 4, p. 451–458.
- BOWMAN, R. L.; BUSQUE, L.; LEVINE, R. L. Clonal Hematopoiesis and Evolution to Hematopoietic Malignancies. **Cell Stem Cell**, 2018. v. 22, n. 2, p. 157–170.
- BRAHMACHARI, S. *et al.* c-Abl and Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. **Journal of Parkinson's disease**, 1 jan. 2017. v. 7, n. 4, p. 589–601.
- BREUGEL, F. M. VAN; LANGHOUT, B. V. The NOTCH Locus of DROSOPHILA HYDEI: Alleles, Phenotypes and Functional Organization. **Genetics**, fev. 1983. v. 103, n. 2, p. 197–217.
- BRZOZOWA-ZASADA, M. *et al.* Notch and its oncogenic activity in human malignancies. **European surgery : ACA : Acta chirurgica Austriaca**, 2017. v. 49, n. 5, p. 199–209.
- CHAN, A. K. N.; CHEN, C.-W. Rewiring the Epigenetic Networks in MLL-Rearranged Leukemias: Epigenetic Dysregulation and Pharmacological Interventions. **Frontiers in cell and developmental biology**, 15 maio. 2019. v. 7, n. May, p. 81.

CHO, S. *et al.* Altered expression of Notch1 in Alzheimer's disease. **PloS one**, 2019. v. 14, n. 11, p. e0224941.

CILLONI, D.; SAGLIO, G. Molecular pathways: BCR-ABL. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, 15 fev. 2012. v. 18, n. 4, p. 930–7.

COLICELLI, J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. **Science signaling**, 14 set. 2010. v. 3, n. 139, p. re6.

COMOLI, P. *et al.* BCR-ABL-specific T-cell therapy in Ph+ ALL patients on tyrosine-kinase inhibitors. **Blood**, 2017. v. 129, n. 5, p. 582–586.

DAVER, N. *et al.* Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. **Leukemia**, 2019. v. 33, n. 2, p. 299–312.

DEFTOS, M. L. *et al.* Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. **Immunity**, 1 jul. 2000. v. 13, n. 1, p. 73–84.

ELLISEN, L. W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. **Cell**, 23 ago. 1991. v. 66, n. 4, p. 649–61.

FERRANDO, A. A. *et al.* Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. **Blood**, 1 jul. 2003. v. 102, n. 1, p. 262–8.

FERRANDO, A. A.; LÓPEZ-OTÍN, C. Clonal evolution in leukemia. **Nature medicine**, 6 out. 2017. v. 23, n. 10, p. 1135–1145.

FORGIONE, M. O. *et al.* KMT2A rearranged acute lymphoblastic leukaemia: Unravelling the genomic complexity and heterogeneity of this high-risk disease. **Cancer letters**, 2020. v. 469, p. 410–418.

GARCÍA-PEYDRÓ, M. *et al.* The NOTCH1/CD44 axis drives pathogenesis in a T cell acute lymphoblastic leukemia model. **The Journal of clinical investigation**, 2018. v. 128, n. 7, p. 2802–2818.

GHARAIBEH, L. *et al.* Notch1 in Cancer Therapy: Possible Clinical Implications and Challenges. **Molecular pharmacology**, 2020. v. 98, n. 5, p. 559–576.

GRAFONE, T. *et al.* An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. **Oncology reviews**, 5 mar. 2012. v. 6, n. 1, p. 64–74.

GRAUX, C. *et al.* Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. **Leukemia** 2006 **20:9**, 6 jul. 2006a. v. 20, n. 9, p. 1496–1510.

GUEIROS, E. B. **Perfil Citogenético e Molecular da Leucemia Linfóide Aguda de Linhagem T, em Pacientes Pediátricos do Centro de Oncohematologia do Hospital Oswaldo Cruz.** [S.l.]: Universidade de Pernambuco, 2015.

HOEHN, D. *et al.* CD117 Expression Is a Sensitive but Nonspecific Predictor of FLT3 Mutation in T Acute Lymphoblastic Leukemia and T/Myeloid Acute Leukemia. **American Journal of Clinical Pathology**, 1 fev. 2012. v. 137, n. 2, p. 213–219.

INCA. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: [s.n.], 2019.

KANG, H. *et al.* Dysregulated transcriptional networks in KMT2A- and MLLT10-rearranged T-ALL. **Biomarker Research**, 23 ago. 2018. v. 6, n. 1, p. 1–6. Disponível em:

KANNAN, R. *et al.* The Abl pathway bifurcates to balance Enabled and Rac signaling in axon patterning in *Drosophila*. **Development (Cambridge, England)**, 1 fev. 2017. v. 144, n. 3, p. 487–498.

KARRMAN, K.; JOHANSSON, B. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Genes, chromosomes & cancer**, 1 fev. 2017. v. 56, n. 2, p. 89–116.

KRASZEWSKA, M. D.; DAWIDOWSKA, M.; KOSMALSKA, M.; SĘDEK, Ł.; *et al.* BCL11B, FLT3, NOTCH1 and FBXW7 mutation status in T-cell acute lymphoblastic leukemia patients. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, jan. 2013. v. 50, n. 1, p. 33–38.

KRASZEWSKA, M. D.; DAWIDOWSKA, M.; KOSMALSKA, M.; SEDEK, Ł.; *et al.* BCL11B, FLT3, NOTCH1 and FBXW7 mutation status in T-cell acute lymphoblastic leukemia patients. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 1 jan. 2013. v. 50, n. 1, p. 33–38.

LIANG, K. *et al.* Therapeutic Targeting of MLL Degradation Pathways in MLL-Rearranged Leukemia. **Cell**, 12 jan. 2017. v. 168, n. 1–2, p. 59- 72.e13.

LIMA, L. P. O. DE. **Polimorfismos De Genes Da Imunidade Em Pacientes Infantojuvenis Diagnosticados Com Leucemia Linfoblástica Aguda E Infecções Bacterianas**. [S.l.]: Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Pernambuco, 2020.

LINS, M. M. *et al.* Incidence and survival of childhood leukemia in Recife, Brazil: A population-based analysis. **Pediatric Blood and Cancer**, 2017. v. 64, n. 8, p. 1–6.

MACDONALD, H. R.; WILSON, A.; RADTKE, F. Notch1 and T-cell development: insights from conditional knockout mice. **Trends in immunology**, mar. 2001. v. 22, n. 3, p. 155–60. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11286731>>.

MANSUR, M. B. **Mutações no gene NOTCH1 e outras alterações moleculares relacionadas à etiopatogênese das Leucemias Linfoblásticas Agudas de Linhagem T**. [S.l.]: Instituto Nacional do Câncer, 2008.

MCKENNA, H. J. *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. **Blood**, 1 jun. 2000. v. 95, n. 11, p. 3489–97.

MEIJERINK, J. P. P. Genetic rearrangements in relation to immunophenotype and outcome in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Best practice & research. Clinical haematology**, set. 2010. v. 23, n. 3, p. 307–18.

MEYER, C. *et al.* The MLL recombinoome of acute leukemias in 2017. **Leukemia**, 1 fev. 2018. v. 32, n. 2, p. 273–284.

MICHELINI, S. *et al.* NOTCH1: Review of its role in lymphatic development and study of seven families with rare pathogenic variants. **Molecular genetics & genomic medicine**, 1 jan. 2021. v. 9, n. 1, p. e1529.

MILOUDI, K. *et al.* NOTCH1 signaling induces pathological vascular permeability in diabetic retinopathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2019. v. 116, n. 10, p. 4538–4547.

MULLIGHAN, C. G. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *In*: PUI, C.-

H. (Org.). **Childhood Leukemias**. [S.l.]: Cambridge University Press, 2012, V. 1, p. 168–203.

NAGAR, B. *et al.* Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. **Cell**, 21 mar. 2003. v. 112, n. 6, p. 859–71.

NOVAK, S. *et al.* Modulation of Notch1 signaling regulates bone fracture healing. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, 1 nov. 2020. v. 38, n. 11, p. 2350–2361.

OFRAN, Y.; IZRAELI, S. BCR-ABL (Ph)-like acute leukemia-Pathogenesis, diagnosis and therapeutic options. **Blood reviews**, 1 mar. 2017. v. 31, n. 2, p. 11–16.

OLSHANSKAYA, Y. *et al.* Clinical significance of cytogenetic changes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the multicenter group Moscow-Berlin (MB). **Leukemia & lymphoma**, 2019. v. 60, n. 2, p. 426–432.

OTHMAN, M. A. . *et al.* Cryptic NUP214-ABL1 fusion with complex karyotype, episomes and intra-tumor genetic heterogeneity in a T-cell lymphoblastic lymphoma. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, 21 set. 2018. v. 4, n. 9, p. 50.

PETIT, A. *et al.* Oncogenetic mutations combined with MRD improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 18 jan. 2018. v. 131, n. 3, p. 289–300.

RAMDENY, P. S. *et al.* Infant T-cell acute lymphoblastic leukaemia with t(6;7) (TCRB-MYB) translocation. **British journal of haematology**, 2021. v. 194, n. 3, p. 613–616.

ROSATI, E. *et al.* NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Frontiers in oncology**, 2018. v. 8, n. 229, p. 229.

SAITO, K. *et al.* Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells in fetal intra-aortic hematopoietic clusters by the Sox17-Notch1-Hes1 axis. **Experimental cell research**, 1 abr. 2018. v. 365, n. 1, p. 145–155.

SANCHEZ-MARTIN, M. *et al.* Synergistic antileukemic therapies in NOTCH1-induced T-ALL. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2017. v. 114, n. 8, p. 2006–2011.

- SANCHEZ-MARTIN, M.; FERRANDO, A. The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia. 2017a. v. 129, n. 9, p. 1124–1133.
- SANCHEZ-MARTIN, M.; FERRANDO, A. The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 2 mar. 2017b. v. 129, n. 9, p. 1124–1133.
- SANDA, T.; LEONG, W. Z. TAL1 as a master oncogenic transcription factor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Experimental hematology**, 1 set. 2017. v. 53, p. 7–15.
- SMALL, D. FLT3 mutations: biology and treatment. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, 2006. p. 178–84.
- STIER, S. *et al.* Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. **Blood**, 1 abr. 2002. v. 99, n. 7, p. 2369–78.
- SULIS, M. L. *et al.* NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL. **Blood**, 1 ago. 2008. v. 112, n. 3, p. 733–40.
- TAKAHASHI, Satoshi; YOKOYAMA, A. The molecular functions of common and atypical MLL fusion protein complexes. **Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms**, 1 jul. 2020. v. 1863, n. 7, p. 194548.
- TEACHEY, D. T.; PUI, C.-H. Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet Oncology**, mar. 2019. v. 20, n. 3, p. e142–e154.
- TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, 30 jun. 2017. v. 7, n. 6, p. e577.
- TSAPOGAS, P. *et al.* The Cytokine Flt3-Ligand in Normal and Malignant Hematopoiesis. **International journal of molecular sciences**, 24 maio. 2017. v. 18, n. 6, p. 1–23.
- TURHAN, A. ABL1 (v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1). **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, nov. 2011. v. 13, n. 7, p. 462–466.
- VAGAPOVA, E. R. *et al.* The Role of TAL1 in Hematopoiesis and Leukemogenesis.

Acta naturae, 2018. v. 10, n. 1, p. 15–23.

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

VICENTE, C. *et al.* Targeted sequencing identifies associations between IL7R-JAK mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia.

Haematologica, out. 2015. v. 100, n. 10, p. 1301–10.

VLIERBERGHE, P. VAN *et al.* Activating FLT3 mutations in CD4+/CD8- pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias. **Blood**, 15 dez. 2005. v. 106, n. 13, p. 4414–4415.

WAEL, H. *et al.* Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, 1 ago. 2014. v. 85, n. 2, p. 131–40.

WANG, J. Y. J. The capable ABL: what is its biological function? **Molecular and cellular biology**, 1 abr. 2014. v. 34, n. 7, p. 1188–97.

WENG, A. P. *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. **Science (New York, N.Y.)**, 8 out. 2004. v. 306, n. 5694, p. 269–71.

YEH, T. C. *et al.* Clinical and biological relevance of genetic alterations in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. **Pediatric Blood & Cancer**, 1 jan. 2019. v. 66, n. 1, p. e27496.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

ZHU, Y.-M. *et al.* NOTCH1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance and implication in multifactorial leukemogenesis. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, 15 maio. 2006. v. 12, n. 10, p. 3043–9.

ANEXO A – TCLE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadora responsável: Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz / Ministério da Saúde. Endereço: Av. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420. Tel: 21012618, 99623975.

Nós gostaríamos de convidar o Sr(a)

.....

CPF: a participar da pesquisa intitulada “**Atividade regulatória da molécula HLA-G nas leucemias da infância**” na condição de responsável legal pelo menor

Essa pesquisa tem por objetivo estudar a variação da resposta do organismo do paciente a leucemia na infância, estudando moléculas de defesa encontrada no nosso corpo.

A participação do menor consistirá em autorizar o uso das informações sobre a doença e condições de vida do paciente contidas no prontuário e banco de dados do hospital, além do uso de amostras de sangue da medula já coletados nos exames de rotina do Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira. Gostaria de informar que para esse estudo não será necessária nenhuma outra coleta de amostra.

Esclarecemos que os resultados desse estudo poderão não beneficiá-lo diretamente, mas certamente contribuirão para o entendimento de doença e melhoria de tratamento futuro; e que os resultados desse estudo serão divulgados com a garantia de sigilo sobre a identidade dos participantes.

O senhor (a) estará livre para interromper a autorização de participação do menor nesse estudo a qualquer momento sem que haja nenhum constrangimento ou prejuízo do tratamento dele.

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz do Ministério da Saúde, e qualquer dúvida poderei contactar o pesquisador responsável pelo telefone acima.

Sendo assim, autorizo, como responsável legal do menor, a participação do mesmo como voluntário não remunerado estando ciente dos riscos e benefícios conforme esclarecimento acima; e desta forma assino o presente termo em duas vias ficando uma sob a minha guarda e a outra com o pesquisador responsável.

Recife, _____, _____, _____

Responsável legal do menor

1º testemunha

Assinatura

Pesquisador responsável

ANEXO B – TCLE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Responsáveis legais de criança ou adolescente)

Seu filho (a) ou o menor sob sua responsabilidade está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “Acurácia de um nanodispositivo flexível baseado em sondas de DNA e polímeros condutores para diagnóstico ultrasensível de oncogenes quiméricos associados à leucemia linfóide da criança em unidades de saúde do Brasil e decisão terapêutica no âmbito do protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia da Infância (GBTLI) – 2020” Para que você possa decidir se ele (a) deve participar ou não, precisa conhecer os benefícios, os riscos e as consequências da sua participação.

Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e tem esse nome porque você só deve aceitar a participação do menor na pesquisa depois de ter lido e entendido este documento. Leia as informações com atenção e converse com o pesquisador responsável e com a equipe da pesquisa sobre quaisquer dúvidas que você tenha. Caso haja alguma palavra ou frase que você não entenda, converse com a pessoa responsável por obter este consentimento, para mais esclarecimentos. Caso prefira, converse com os seus familiares, amigos e com a equipe médica antes de tomar uma decisão. Se você tiver dúvidas depois de ler estas informações, entre em contato com o pesquisador responsável.

Após receber todas as informações, e o esclarecimento de suas dúvidas, você poderá fornecer seu consentimento, rubricando e/ou assinando em todas as páginas deste Termo, em duas vias (uma do pesquisador responsável e outra do responsável pelo (a) menor participante da pesquisa), caso concorde com a participação.

Este estudo pretende criar um equipamento pequeno e barato para testar a presença de erros no DNA das suas células. O DNA é a parte da célula que você recebe do seu pai e de sua mãe, que determina como você é, quando existe erro no DNA, as células não funcionam direito e quando ocorre nas células do sangue, aí temos a leucemia. Alguns erros podem fazer com que as células doentes sejam mais resistentes ao tratamento. Se a gente não estuda esses erros no DNA da célula, que tornam o tratamento mais difícil, a doença pode retornar, por isso é preciso encontrar

quem tem esses erros para que possamos montar um tratamento para evitar que ocorra o retorno da doença, ou seja, que a criança ou adolescente tenha uma recaída.

Para participar da pesquisa é preciso que você autorize o pesquisador a pegar uma pequena parte do material que foi coletado durante a realização do mielograma, que foi feito na primeira consulta para o diagnóstico, e nos demais mielogramas que o menor será submetido para acompanhamento do tratamento, e que fica armazenado no laboratório. Esse material será encaminhado para avaliação dos erros no DNA da célula doente usando novos testes e equipamento, em busca de melhorar o diagnóstico da leucemia. Precisaremos também buscar no prontuário do menor informações, como idade, tipo da doença, se já fez algum tratamento antes e como foi, quais as queixas do paciente quando chegou no hospital e resultado dos exames que foram realizados, desta forma poderemos comparar os resultados do teste com essas informações.

Os benefícios deste estudo vão demorar um pouco para serem vistos, porque vai ser preciso primeiro construir esse dispositivo chamado biosensor, que tem a capacidade de identificar o erro das células. O sucesso desse projeto permitirá que outras instituições, que hoje não realizam os testes que nossa instituição faz para confirmar a leucemia, possam ter acesso ao teste a um menor custo para benefício das crianças e adolescentes com leucemia.

Este estudo não apresenta risco de vida para o menor, pois a amostra de medula do paciente utilizada na pesquisa será parte restante da amostra coletada para diagnóstico realizada sob anestesia, por médica experiente, em ambiente calmo e bem equipado.

O mielograma é feito no primeiro dia da consulta para confirmação da leucemia, onde é retirado o sangue grosso, chamado medula óssea porque é retirado do “tutano do osso” da cintura com o paciente deitado ou sentado, após anestesia por médico experiente. A quantidade coletada depende do peso do paciente e varia de 1,0 a 4,0 mL (equivalente a 1 colher de chá ou sopa). Esse líquido é utilizado para determinar qual o tipo de células estão alteradas e como elas estão alteradas, e o restante da amostra é guardada congelada para estudo sempre que necessário. É uma fração desse material guardado que gostaríamos de utilizar neste estudo. O menor NÃO será

submetido a nova coleta só para a pesquisa, a pesquisa utiliza as amostras armazenadas no laboratório.

O mielograma é repetido durante o tratamento para investigação de doença residual, ou seja, para saber se o tratamento está fazendo efeito, ou se precisa ser ajustado. Se eu estou conversando com você, é porque o menor representado pelo Sr(a) já foi submetido ao mielograma para diagnóstico, mas é bom falar novamente, que é possível que o lado do corpo do menor onde o mielograma foi realizado fique um pouco dolorido, e a equipe médica sempre estará a disposição para atendimento, realizando compressas e dando medicação se for preciso.

Em relação as informações que nós pegaremos do prontuário hospitalar, elas serão utilizadas durante a pesquisa sem sua identificação. Apenas os pesquisadores autorizados terão acesso aos dados individuais, resultados de exames e testes bem como às informações do registro médico. Mesmo que estes dados sejam utilizados para propósitos de divulgação e/ou publicação científica, sua identidade e a do menor permanecerá em segredo.

Os dados genéticos coletados das amostras serão armazenados no Instituto de Medicina Integral no Brasil.

Você não precisará pagar nada por isso, assim como não receberá nada para que o menor participe do estudo. A participação do menor é voluntária e se você não autorizar a sua participação não vai trazer nenhuma mudança no tratamento e acompanhamento médico. Fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a participação do menor serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Caso decida interromper a participação do (a) menor na pesquisa, a equipe de pesquisadores deverá ser avisada e as amostras e dados serão imediatamente excluídos

Você pode ter acesso a qualquer resultado relacionado à esta pesquisa. Estes resultados serão enviados ao médico e ele falará com você. Se você tiver interesse, você poderá receber uma cópia dos resultados.

A pessoa responsável por pegar sua assinatura neste documento lhe explicou claramente o que será realizado e se colocou à disposição para responder às suas perguntas sempre que tiver novas dúvidas. Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e inclusive para tomar conhecimento dos resultados desta pesquisa. Neste caso, por favor, ligue para Norma Lucena-Silva no telefone (081) 99962-3975 ou (081) 21224764 de 8:00h – 16:00h. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IMIP. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre esta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do IMIP (CEP-IMIP) ou com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), que objetiva defender os interesses dos participantes, respeitando seus direitos e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa desde que atenda às condutas éticas. O CEP-IMIP está situado à Rua dos Coelhos, nº 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa do IMIP, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar tel: 2122-4756 – Email: comitedeetica@imip.org.br O CEP/IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 h (manhã) e 13:30 às 16:00h (tarde) e o CONEP está situado à SRTV 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar – Asa Norte CEP: 70719-040, Brasília – DF. Horário de funcionamento: 09:00 às 18:00. Telefone: (61) 3315-5878.

Este termo está sendo elaborado em duas vias, sendo que uma via ficará com você e outra será arquivada com os pesquisadores responsáveis.

Li as informações acima e entendi o propósito do estudo. Ficaram claros para mim quais são procedimentos a serem realizados, riscos, benefícios e a garantia de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação do menor sob minha responsabilidade é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos dados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo.

Entendo que o nome do menor não será publicado e toda tentativa será feita para assegurar o anonimato. Concordo voluntariamente que o (a) menor sob minha responsabilidade participe desta pesquisa e sei que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o andamento da pesquisa, sem prejuízo ou penalização alguma.

Eu, _____, e responsável pelo menor _____ por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar nesta pesquisa, no dia ____ / ____ / ____.

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo mesmo. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação desta pesquisa.

Eu concordo que o (a) menor sob minha responsabilidade participe desta pesquisa e CONCORDO que suas amostras sejam armazenadas e utilizadas em pesquisas futuras após nova avaliação e aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do IMIP e para isto deverei assiná-lo no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, se eu concordar.

OU

Eu, por intermédio deste,

CONCORDO, dou livremente meu consentimento para que o (a) menor sob minha responsabilidade participe desta pesquisa.

NÃO CONCORDO.

Nome e Assinatura do Responsável pelo (a) Participante de Pesquisa

_____/_____/_____

Data ____/____/____

Nome e Assinatura da Testemunha Imparcial

Data

Impressão

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa ao responsável pelo (a) participante da

_____ / _____ /
Nome e Assinatura do Responsável pela

Rubri do
Participante da

pel (a)

Rubrica do

ANEXO C – TALE 1

TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR – 8 a 10 anos

Olá! Nós que trabalhamos no laboratório no quinto andar estudamos o seu sangue que é colhido pela médica durante o mielograma que é feito em você na sala de procedimentos.



A gente estuda seu sangue e procura nele as células doentes. Depois a gente guarda ele na geladeira do laboratório para poder examinar novamente e tirar dúvidas se precisar. Fazendo isso, a gente consegue saber o que está doente e diz para o médico, e assim ele escolhe o melhor remédio para curar as suas células doentes.

Cada criança aqui no hospital pode ter células doentes diferentes, e por isso cada criança faz um tratamento diferente. A escolha do remédio que vai ser dado a você, depende do exame feito no laboratório. Esse exame é caro e demorado, e no IMIP você tem esse exame de graça, mas tem outros hospitais no Brasil não tem esse exame.



Por causa disso, estamos tentando criar um teste barato e rápido que possa ser enviado para outros hospitais, para que outras crianças também possam fazer esse exame, e o médico possa escolher o melhor remédio para tratar a doença delas. Para criar esse teste, nós precisamos de sua ajuda!



A gente estuda seu sangue e procura nele as células doentes. Depois a gente guarda ele na geladeira do laboratório para poder examinar novamente e tirar dúvidas se precisar. Fazendo isso, a gente consegue saber o que está doente e diz para o médico, e assim ele escolhe o melhor remédio para curar as suas células doentes.

Nós precisamos usar um pouquinho do seu sangue que já está guardado no laboratório para saber se esse novo teste realmente funciona. Então nem se preocupe, você não vai precisar levar nenhuma furadinha nova. Mas só podemos usar seu sangue se você deixar. Nós também precisamos saber se você nos deixa ler algumas informações que o médico anota sobre você em um documento chamado prontuário, para entender sua doença.

Para te ajudar a decidir, vamos separar o que é bom e o que seria ruim para te ajudar a entender melhor esse estudo:

	<p>Vamos fazer um teste barato e rápido para outros hospitais poderem usar. Vamos ajudar ao médico a escolher o melhor tratamento para as crianças de outros hospitais que tem a mesma doença das suas células. Assim, as crianças vão receber o mesmo cuidado que você está recebendo durante seu tratamento. Você não vai precisar levar outra furadinha para ajudar.</p>
	<p>As pessoas do laboratório vão usar seu sangue guardado na geladeira do laboratório e eles vão ficar sabendo sobre sua doença.</p>

Não vamos contar para ninguém que você está participando desse estudo e nem vamos falar para estranhos as informações que você deixar a gente ler no papel que o médico escreve (chamado registro hospitalar). Quando tivermos os resultados e fomos mostrar para outros pesquisadores e médicos, também não iremos dizer o seu nome.

Você não precisa participar se não quiser, é um direito seu e também não terá nenhum problema se desistir depois de assinar.



Caso você queira tirar alguma dúvida sobre esse estudo, você pode pedir para seu responsável nos procurar pelos telefones (081) 99962-3975 ou (81) 21224764 da pesquisadora Dra. Norma Lucena-Silva.

Eu

aceito

participar do estudo que tem o objetivo de criar um teste que identifica erros nas minhas células doentes que ajuda ao médico dar o melhor tratamento para outras crianças com a mesma doença que eu, em locais no Brasil que não tem laboratório como no IMIP. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e não será um problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste documento e li e concordo em participar.

Marque a primeira opção se você quer participar ou a segunda opção se você não quer participar desta experiência:

	QUERO PARTICIPAR () permitindo o uso de minha amostra clinica que está no laboratório e das informações anotadas pelo médico.
	NÃO QUERO PARTICIPAR ().

Eu concordo participar desta pesquisa e **CONCORDO** que minhas células sejam guardadas e utilizadas em pesquisas futuras após avaliação e aprovação pelo Conselho Nacional de Ética aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do IMIP e para isto deverei assinar meu nome em outro papel igual a esse, se eu concordar.

OU

() Eu concordo em participar desta pesquisa, mas **NÃO CONCORDO** que minhas células guardadas e utilizadas em pesquisas futuras.

Assinatura do pesquisador

Assinatura do responsável

Data:

ANEXO D – TALE 2

TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR – 10 a 18 anos

OBS: O termo de assentimento não elimina a necessidade de fazer o termo de consentimento livre e esclarecido que deve ser assinado pelo responsável ou representante legal do menor.

Nós que trabalhamos no laboratório de diagnóstico do setor da oncologia fazemos os exames no sangue que o médico coletou de você no primeiro dia que você veio pro hospital, quando fez mielograma. Com esses exames nós conseguimos dizer ao médico qual o tipo de célula do seu sangue que está doente, e essa informação permite que o médico escolha o melhor tratamento para sua doença.

Estes exames são caros e demorados, e no IMIP você tem acesso a todos eles, mas em outros hospitais do Brasil outros pacientes não tem acesso a esses exames (imunofenotipagem, biologia molecular e mielograma) porque eles são caros, difíceis de realizar e precisam de um laboratório com equipamentos grandes e caros. Então, estamos fazendo um estudo para criar um novo equipamento que seja pequeno e barato para fazer esses testes de forma mais rápida, e queríamos perguntar se você gostaria de participar.

O nome do projeto é: “Acurácia de um **nanodispositivo** flexível baseado em sondas de DNA e polímeros condutores para diagnóstico ultrasensível de oncogenes quiméricos associados à leucemia linfóide da criança em unidades de saúde do Brasil e decisão terapêutica no âmbito do protocolo GBTLI-2020”. **Isso quer dizer:**

- (1) Acurácia quer dizer que queremos saber se o equipamento vai funcionar com o sangue de outros pacientes que também tem leucemia.
- (2) O equipamento se chama nanodispositivo porque ele é bem pequeno.
- (3) O DNA é a estrutura da célula que recebemos do nosso pai e nossa mãe, que faz a gente ser parecido com eles, e que produz todo o material necessário para nossas células. Quando o DNA da célula está alterado, a célula fica doente. Esse equipamento está sendo feito para descobrir se existe DNA alterado dentro da célula.
- (4) Quando a gente identifica o tipo de alteração, o médico pode escolher melhor o tratamento que irá destruir as células doentes.
- (5) No final do projeto gostaríamos de testar esse equipamento em outros hospitais do Brasil que não tem condições de fazer esse exame. Se nós conseguirmos, mais pacientes poderão receber um tratamento melhor.

POR QUÊ precisamos de sua ajuda?

Porque na construção desse equipamento nós precisamos testar se ele está funcionando, e nós só podemos fazer isso com o sangue da medula de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA), que já tem essa alteração. A sua amostra de sangue está guardada no nosso laboratório desde o primeiro dia que você chegou para fazer tratamento. Então não se preocupe, você não vai precisar levar outra furada e nem fazer novos exames.

Seu sangue precisou ficar guardado, porque a cada vez que você faz um novo mielograma durante o tratamento, nós acompanhamos se o números das células da doença estão diminuindo.

Como essas células são suas, nós gostaríamos de lhe pedir para utilizar um pouco delas para testar nesse novo equipamento. Além disso, nós também vamos precisar de algumas informações que o médico anotou sobre a sua doença no seu prontuário, por isso também gostaríamos de lhe pedir para ler essas informações. Elas são importantes para comparar os resultados do teste com outros dados da doença. Mas, não se preocupe, em nenhum momento o seu nome será divulgado.

É IMPORTANTE falar sobre o que é bom e o que pode ser ruim no estudo:

<p>O que é bom</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vamos fazer um teste barato e rápido para outros hospitais poderem usar. 2. Vamos ajudar o médico a escolher o melhor tratamento para os pacientes de outros hospitais que tem a mesma doença das suas células. 3. Assim outros pacientes vão receber o mesmo cuidado que você está recebendo durante o seu tratamento. 4. Você não vai precisar levar outra furada e nem fazer outros exames para isso. 5. Nós vamos tomar todos os cuidados com suas informações para que elas sejam preservadas e fiquem entre nós.
<p>O que pode ser ruim</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. A equipe do laboratório irá utilizar seu sangue e vai ficar sabendo sobre seus dados e sua doença.

Quando terminarmos o estudo iremos publicar os resultados para que outros pesquisadores também tenham esse conhecimento e possam ajudar outros pacientes, assim como você. Quando formos apresentar os resultados do estudo, o seu nome não será divulgado.

É importante também lhe dizer que **você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. É um direito seu. Você não terá nenhum problema se desistir e continuará a ser tratado com a mesma atenção.** Caso aconteça algo errado ou você tenha alguma dúvida, você pode nos procurar pelos telefones (81) 99962-3975 ou (81) 21224764 da pesquisadora Dra. Norma Lucena Silva.

Eu,

_____ac

eito participar do estudo de “Acurácia de um nanodispositivo flexível baseado em sondas de DNA e polímeros condutores para diagnóstico ultrasensível de oncogenes quiméricos associados à leucemia linfóide da criança em unidades de saúde do Brasil e decisão terapêutica no âmbito do protocolo GBTLI- 2020”, **que tem o objetivo de desenvolver um teste diagnóstico mais simples para identificação de erros no DNA das células doentes, para disponibilizar a outros hospitais que não tem estrutura de laboratório.** Entendi as coisas boas e as coisas ruins que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir, e isso não será um problema. Os pesquisadores tiraram as minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo e li e concordo em participar da pesquisa.

Eu não concordo em participar desta pesquisa.

Eu concordo participar desta pesquisa e CONCORDO que minhas amostras armazenadas sejam utilizadas em pesquisas futuras após avaliação e aprovação pelo Conselho Nacional de Ética e Pesquisa e Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do IMIP, e para isto deverei assinar no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

OU

Recife, _____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Assinatura do(a) pesquisador(a)

ANEXO E – TALE 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Maiores de 18 anos

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “Acurácia de um nanodispositivo flexível baseado em sondas de DNA e polímeros condutores para diagnóstico ultrasensível de oncogenes quiméricos associados à leucemia linfóide da criança em unidades de saúde do Brasil e decisão terapêutica no âmbito do protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia da Infância (GBTLI) – 2020” Para que você possa decidir se participa ou não, precisa conhecer os benefícios, os riscos e as consequências da sua participação.

Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e tem esse nome porque você só deve aceitar sua participação na pesquisa depois de ter lido e entendido este documento. Leia as informações com atenção e converse com o pesquisador responsável e com a equipe da pesquisa sobre quaisquer dúvidas que você tenha. Caso haja alguma palavra ou frase que você não entenda, converse com a pessoa responsável por obter este consentimento, para mais esclarecimentos. Caso prefira, converse com os seus familiares, amigos e com a equipe médica antes de tomar uma decisão. Se você tiver dúvidas depois de ler estas informações, entre em contato com o pesquisador responsável.

Após receber todas as informações, e o esclarecimento de suas dúvidas, você poderá fornecer seu consentimento, rubricando e/ou assinando em todas as páginas deste Termo, em duas vias (uma do pesquisador responsável e outra sua), caso concorde com a participação.

Este estudo pretende criar um equipamento pequeno e barato para testar a presença de erros no DNA das suas células. O DNA é a parte da célula que você recebe do seu pai e de sua mãe, que determina como você é, quando existe erro no DNA, as células não funcionam direito e quando ocorre nas células do sangue, aí temos a leucemia. Alguns erros podem fazer com que as células doentes sejam mais resistentes ao tratamento. Se a gente não estuda esses erros no DNA da célula, que tornam o tratamento mais difícil, a doença pode retornar, por isso é preciso encontrar quem tem esses erros para que possamos montar um tratamento para evitar que ocorra o retorno da doença, ou seja, que você tenha uma recaída.

Para participar da pesquisa é preciso que você autorize o pesquisador a pegar uma pequena parte do material que foi coletado durante a realização do mielograma, que foi feito na primeira consulta para o diagnóstico, e nos demais mielogramas que você será submetido para

acompanhamento do tratamento, e que fica armazenado no laboratório. Esse material será encaminhado para avaliação dos erros no DNA da célula doente usando novos testes e equipamento, em busca de melhorar o diagnóstico da leucemia. Precisaremos também buscar no seu prontuário médico informações, como idade, tipo da doença, se você já fez algum tratamento antes e como foi, quais as suas queixas quando chegou no hospital e resultado dos exames que foram realizados, desta forma poderemos comparar os resultados do teste com essas informações.

Os benefícios deste estudo vão demorar um pouco para serem vistos, porque vai ser preciso primeiro construir esse dispositivo chamado biosensor, que tem a capacidade de identificar o erro das células. O sucesso desse projeto permitirá que outros hospitais, que hoje não realizam os testes que nossa instituição faz para confirmar a leucemia, possam ter acesso ao teste a um menor custo para benefício das pessoas com leucemia.

Este estudo não apresenta risco de vida para você, pois a amostra de medula do paciente utilizada na pesquisa será parte restante da amostra coletada para diagnóstico realizada sob anestesia, por médica experiente, em ambiente calmo e bem equipado.

O mielograma é feito no primeiro dia da consulta para confirmação da leucemia, onde é retirado o sangue grosso, chamado medula óssea porque é retirado do “tutano do osso” da cintura com o paciente deitado ou sentado, após anestesia por médico experiente. A quantidade coletada depende do peso do paciente e varia de 1,0 a 4,0 mL (equivalente a 1 colher de chá ou sopa). Esse líquido é utilizado para determinar qual o tipo de células estão alteradas e como elas estão alteradas, e o restante da amostra é guardada congelada para estudo sempre que necessário. É um pouco desse material guardado que gostaríamos de utilizar neste estudo. Você NÃO precisará fazer uma nova coleta só para a pesquisa, pois ela utiliza as amostras armazenadas no laboratório.

O mielograma é repetido durante o tratamento para investigação de doença residual, ou seja, para saber se o tratamento está fazendo efeito, ou se precisa ser alterado. Se eu estou conversando com você, é porque você já coletou o mielograma para diagnóstico, mas é bom falar novamente, que é possível que o lado da cintura onde o mielograma foi realizado fique um pouco dolorido, e a equipe médica sempre estará a disposição para seu atendimento, realizando compressas e dando medicação se for preciso.

A coleta de sangue da veia ou do osso da cintura é realizada para diagnóstico e guardada no laboratório para comparar com a amostra de acompanhamento e saber se o número de células doentes está diminuindo com o tratamento. Se o médico ver que as células doentes não estão respondendo, ele poderá mudar o tratamento. A pesquisa vai usar um pouco da sua amostra que já esta guardada se você autorizar. Caso não seja autorizada, ela continuará guardada e usada

para as avaliações que são necessárias, não havendo nenhum prejuízo para o seu tratamento, já que isso ocorre independente da pesquisa.

Em relação as informações que nós pegaremos do seu prontuário hospitalar, elas serão usadas durante a pesquisa sem aparecer seu nome. Apenas os pesquisadores autorizados terão acesso aos dados individuais, resultados de exames e testes como também das informações do registro médico. Mesmo que estes dados sejam utilizados para divulgação e/ou publicação científica, sua identidade permanecerá em segredo.

Os dados genéticos coletados das amostras serão armazenados no Instituto de Medicina Integral no Brasil.

Você não precisará pagar nada por isso, assim como não receberá nada para participar do estudo. A sua participação é voluntária e se você não autorizar a sua participação não vai trazer nenhuma mudança no tratamento e acompanhamento médico. Fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Caso decida interromper sua participação na pesquisa, a equipe de pesquisadores deverá ser avisada e as amostras e dados serão imediatamente excluídos

Você pode ter acesso a qualquer resultado relacionado à esta pesquisa. Estes resultados serão enviados ao seu médico e ele falará com você. Se você tiver interesse, você poderá receber uma cópia dos resultados.

A pessoa responsável por pegar sua assinatura neste documento lhe explicou claramente o que será realizado e se colocou à disposição para responder às suas perguntas sempre que tiver novas dúvidas. Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e inclusive para tomar conhecimento dos resultados desta pesquisa. Neste caso, por favor, ligue para Norma Lucena-Silva no telefone (081) 99962-3975 ou (081) 21224764 de 8:00h – 16:00h. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IMIP e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre esta pesquisa, entre em contato com o CEP-IMIP ou CONEP. O CEP-IMIP está situado à Rua dos Coelhos, nº 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa do IMIP, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar tel: 2122-4756 – Email: comitedeetica@imip.org.br O CEP/IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 h (manhã) e 13:30 às 16:00h (tarde) e o CONEP está situado à SRTV 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

– Asa Norte CEP: 70719-040, Brasília – DF. Horário de funcionamento: 09:00 às 18:00. Telefone: (61) 3315-5878.

Este termo está sendo feito em duas vias, sendo que uma via ficará com você e outra será arquivada com os pesquisadores responsáveis.

Li as informações acima e entendi o propósito do estudo. Ficaram claros para mim quais são procedimentos a serem realizados, riscos, benefícios e a garantia de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos dados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo.

Entendo que meu nome não será publicado e toda tentativa será feita para assegurar o anonimato. Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e sei que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o andamento da pesquisa, sem prejuízo ou penalização alguma.

Eu _____, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar nesta pesquisa, no dia _____ / / _____.

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo mesmo. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação desta pesquisa.

() Eu concordo em participar desta pesquisa e CONCORDO que minhas amostras sejam armazenadas e utilizadas em pesquisas futuras após nova avaliação e aprovação do Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do IMIP e para isto deverei assinar no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, se eu concordar.

Eu, por intermédio deste:

- () CONCORDO, dou livremente meu consentimento para participar desta pesquisa.
 () NÃO CONCORDO.

Nome e Assinatura do Participante de Pesquisa

_____/_____/_____
Data

Nome e Assinatura da Testemunha Imparcial Data

Rubrica do participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisa

ANEXO F – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA 1



Título do Projeto: " Cenário do câncer infantil em Pernambuco: desenvolvendo ferramentas diagnósticas acessíveis à rede pública, de impacto no tratamento e prognóstico da criança com câncer".

Pesquisador responsável: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 07/03/2013

Registro no CAAE: 13296913.3.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 400.655

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 04 de setembro de 2016.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 26 de fevereiro de 2015.

Vice-Coordenador do CEP/CPqAM

Paul Hadenburg Nobre de V. Silva
Análise de Gestão em Saúde
Vice-Coordenador
Mat. SIAPE 155896
CEP/CPqAM/Fiocruz



ANEXO G – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA 2

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Acurácia de um nanodispositivo flexível baseado em sondas de DNA e polímeros condutores para diagnóstico ultrasensível de oncogenes quiméricos associados à leucemia linfóide da criança em unidades de saúde do Brasil e decisão terapêutica no âmbito do protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia da Infância (GBTLI) - 2020

Pesquisador: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

Versão: 4

CAAE: 40319220.3.0000.5201

Instituição Proponente: Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP/PE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.592.419

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos contendo as Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1669304.pdf de 03/03/2021) e do Projeto Detalhado.

INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento de crianças com leucemias nos países desenvolvidos foi atribuído a adoção de protocolos de tratamento intensivos com múltiplas drogas e suporte médico para resolver problemas decorrentes do tratamento, como infecções, distúrbios metabólicos, reação alérgica, e outros efeitos colaterais e adversos que potencializam o risco de óbito precoce (ref). Entre 1980 e 1990, diversos protocolos foram criados por diferentes grupos na América do Norte, Europa e Japão todos com resultados positivos, levando as taxas de sobrevivida livre de eventos (SLE) de 30% para 80% rapidamente, mas com importantes efeitos colaterais a longo prazo, como segunda neoplasia, comprometimento cardíaco e outros (refAIEOP82). Com objetivo semelhante, em 1980, Dr Brandelise funda o Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Infantil (GBTLI),

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF **Município:** BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

ANEXO H – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA 3

COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL CLÍNICO E LABORATORIAL DA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA DE LINHAGEM T DA INFÂNCIA NO NORDESTE DO BRASIL

Pesquisador: Terezinha de Jesus Marques Salles

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 24198013.7.0000.5192

Instituição Proponente: Complexo Hospital HUOC/PROCAPE

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 705.960

Data da Relatoria: 02/07/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo descritivo do tipo série de casos em pacientes portadores de LLA- T , entre 0 e 18 anos admitidos no HUOC/UPE/ CEONHPE que visa descrever características clínicas e laboratoriais destes pacientes e correlaciona-las com a sobrevida e com os dados da literatura, permitindo uma melhor avaliação dos riscos e perfil dos casos de LLA T no Nordeste do Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar as alterações cromossômicas na LLA-T, utilizando as técnicas de citogenética convencional e molecular; Determinar a frequência das alterações cromossômicas nos pacientes com LLA-T; Determinar aploidia cromossômica (índice do DNA), em pacientes com LLA-T ; Identificar por técnicas moleculares rearranjos moleculares tais como: SIL-TAL1, MLL-ENL, MLL-AF9, HOX11L2; Relacionar as alterações genéticas com o fator do prognóstico; Avaliar monoclonalidade na de LLA-T pela técnica da PCR-TCR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá riscos adicionais além do existente ao procedimento da rotina do diagnóstico da doença. O material a ser estudado são obtidos da punção da medula óssea e/ ou sangue periférico necessários ao diagnóstico da doença. Desta forma não haverá necessidade de procedimentos

Endereço: Rua Arnóbio Marques, 310
Bairro: Santo Amaro **CEP:** 50.100-130
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3184-1460 **Fax:** (81)3184-1271 **E-mail:** cep_huoc.procaprocape@yahoo.com.br