



**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA**  
**CENTRO DE PESQUISAS - CPq**  
**PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU EM ONCOLOGIA**  
**DIVISÃO DE MEDICINA EXPERIMENTAL - MEDEX**

**MUTAÇÕES DO GENE *NOTCH1* E OUTRAS ALTERAÇÕES MOLECULARES  
RELACIONADAS À ETIOPATOGENESE DAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS  
AGUDAS DE LINHAGEM T (LLA-T)**

**MARCELA BRAGA MANSUR**

**RIO DE JANEIRO**

**Mai de 2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MUTAÇÕES DO GENE *NOTCH1* E OUTRAS ALTERAÇÕES MOLECULARES  
RELACIONADAS À ETIOPATOGENESE DAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS  
AGUDAS DE LINHAGEM T (LLA-T)

**MARCELA BRAGA MANSUR**

**Sob a orientação da Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação do Instituto  
Nacional de Câncer, como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre  
em Oncologia.

RIO DE JANEIRO

2008

**MUTAÇÕES DO GENE *NOTCH1* E OUTRAS ALTERAÇÕES MOLECULARES  
RELACIONADAS À ETIOPATOGENESE DAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS  
AGUDAS DE LINHAGEM T (LLA-T)**

**Marcela Braga Mansur**

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

APROVADA EM: 26 / 05 / 2008

BANCA EXAMINADORA:

**Dr. João Paulo de Biaso Viola**

**Dr. Marcelo T. Bozza**

**Dra. Claudete Klumb**

**Dra. Rosane Vianna Jorge (Suplente Interno)**

**Dra. Elaine Sobral da Costa (Suplente Externo)**

Mutações do Gene *NOTCH1* e Outras Alterações Moleculares Relacionadas à Etiopatogênese das Leucemias Linfoblásticas Agudas de Linhagem T (LLA-T)/ Marcela Braga Mansur. Páginas: 1-102. Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Câncer, INCA, Maio de 2008.

Orientadora: Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira.

Dissertação de Mestrado em Oncologia

Palavras-chave: 1. *NOTCH1*; 2. Mutações; 3. Alterações Moleculares; 4. Leucemia Linfoblástica Aguda de Célula - T.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus** por me dar forças para enfrentar meus momentos mais difíceis, me permitindo realizar todos os meus projetos e sonhos, e por abençoar a minha vida com pessoas tão especiais.

Aos meus pais **Nélio Mansur** e **Maria do Carmo Braga Mansur**, que são o meu porto seguro na vida! Obrigada por me apoiarem em tudo sempre, pelo amor e dedicação em todos os momentos, e por minha formação como pessoa. Eu muito mais do que amo vocês!

Ao meu irmão **André Braga Mansur**, que como eu sempre digo, é o amor da minha vida, por me dar forças todas às vezes que pensei em fraquejar, e por ser além de meu irmão, meu melhor amigo e uma das pessoas mais maravilhosas que conheço e tenho o privilégio de poder conviver. Te amo!

Ao meu tio, e padrinho de coração, **Márcio Mansur** que considero como segundo pai e amo muito, por acreditar em mim de várias maneiras, e por me incentivar sempre a querer chegar lá, valeu mesmo Dindo, sem você eu com certeza não estaria aqui. Espero ainda te dar muitos motivos para se orgulhar e pensar que valeu à pena “apostar” em mim!

A **Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira**, pela orientação, e, principalmente, por acreditar em mim e na minha capacidade, me acolhendo e me incentivando sempre! E por permitir a realização do meu sonho que é trabalhar com a ciência em prol de um bem maior. Espero ter sido merecedora de fazer parte da sua “Gaiola das Loucas”! Muito, muito, muito obrigada Help, a próxima etapa será um grande desafio!

A toda **minha família**, meus primos e primas, minhas tias e ao meu tio, adoro vocês!

Aos **meus AMIGOS**, que amo tanto e que são minha segunda família, aquela que eu pude me dar ao luxo e ao privilégio de “escolher”! Principalmente a **Álan Ribeiro, Bruno Aguiar, Carlos Renato Falcão, Diogo da Matta, Girseli Laranja, Juliana Souza, Larissa**

**Ribeiro, Lília Lima, Marcel Ribeiro, Priscila Faria, Rafael Stelmann e Renata Amorim** (em ordem alfabética porque não existem preferências, rs!), obrigada por todos os momentos de descontração, por me fazerem esquecer dos problemas e por me ajudar a resolvê-los quando não deu para esquecer. Cada um de vocês faz parte da minha vida de um jeito muito particular e especial! Valeu mesmo pelo companheirismo e por cada pequeno detalhe!

A **Mariana Emerenciano** e **Alexandre Figueiredo** que se mostraram muito mais que apenas companheiros de lab, se tornando de fato meus grandes amigos, pessoas mais do que muito especiais que, com certeza, vou levar comigo para vida toda! Quem sabe um dia a gente não monta o nosso próprio lab, rs (deixa a Help ler isso)! Muito obrigada por fazerem parte do meu caminho. Agora não tem mais jeito, vocês dois são para sempre na minha vida e no meu coração, amo vocês!

A **todo pessoal** do laboratório que nesta nossa convivência diária aprendeu a “me aturar”, isso já é muito né, e já se vão 4 longos anos! Em especial quero agradecer a **Alessandra Faro, Eliane Esteves, e Mariana Sant’Ana** que bom que tenho vocês por perto!

O meu agradecimento muito sincero a **Lílian Brewer**, meu braço direito, uma menina que me surpreendeu principalmente pelo esforço! Alguém que me fez sempre acreditar que tudo daria certo no final, para você meu carinho sempre!

A **Cristiane Novaes** por toda contribuição na parte estatística, por ter sido tão atenciosa, paciente e querida quando eu precisei da sua ajuda! Essas coisas a gente não esquece viu Cris, obrigada de verdade pelo apoio em muitos sentidos!

A **todos** da Medicina Experimental pelo convívio durante todo esse tempo, o meu carinho especial para **Su** (Suely) e **Tia Rose** (Rosemar). Vocês são umas queridas, adoro vocês!

A **Alessandra Splendore** pela enorme contribuição nas análises dos seqüenciamentos. Nossa parceria foi imprescindível para a realização deste trabalho. Desafios maiores virão e espero poder continuar contando contigo! Muito obrigada!

A Dra **Rosane** e ao **Diogo** da Farmacologia por serem tão atenciosos comigo, me ajudando muito em alguns “momentos tensos” da minha tese, não só com apoio científico, mas também com uma boa dose de boa vontade e paciência! Vocês foram 10!

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>1.1) HEMATOPOESE NORMAL</b>	<b>18</b>
1.1.1) ASPECTOS GERAIS	18
1.1.2) ONTOGENIA E MATURAÇÃO DE LINFÓCITOS T	20
1.1.3) MOLÉCULAS CARACTERÍSTICAS DOS LINFÓCITOS T	23
1.1.4) GENES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA CÉLULA T	24
<b>1.2) LEUCEMIAS AGUDAS</b>	<b>29</b>
1.2.1) ASPECTOS GERAIS	29
1.2.2) LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	31
<b>1.3) LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS DE LINHAGEM T</b>	<b>32</b>
1.3.1) ASPECTOS GERAIS	32
1.3.2) LLA-T <i>versus</i> LLb-T	33
<b>1.4) MARCADORES IMUNO-MOLECULARES IMPORTANTES NAS LLAs-T</b>	<b>35</b>
1.4.1) MARCADORES E ALTERAÇÕES GENÉTICAS RELEVANTES NA LLA-T	35
1.4.2) MUTAÇÕES DO GENE <i>NOTCH1</i>	41
<b>2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO</b>	<b>43</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
3.1) OBJETIVOS PRINCIPAIS	45
3.2) OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	45
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>46</b>
<b>4.1) AMOSTRAS</b>	<b>46</b>
4.1.1) DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	46
4.1.2) PROCEDIMENTOS INICIAIS	47
4.1.3) IMUNOFENOTIPAGEM	48
<b>4.2) TESTES MOLECULARES</b>	<b>50</b>
4.2.1) EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	50
4.2.2) QUANTIFICAÇÃO DO RNA	51
4.2.3) TRATAMENTO DO RNA COM DNase	52
4.2.4) SÍNTESE DE cDNA	52
4.2.5) PCR DO GENE <i>GAPDH</i>	53
4.2.6) REAÇÕES DE RT-PCR	54
4.2.7) EXTRAÇÃO DE DNA PARA REALIZAÇÃO DOS PCRS DO <i>NOTCH1</i>	56
4.2.8) QUANTIFICAÇÃO DO DNA	57
4.2.9) PCRS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO <i>NOTCH1</i>	58
4.2.10) DHPLC NA DETECÇÃO INICIAL DAS MUTAÇÕES DO <i>NOTCH1</i>	60

4.2.11) SEQÜENCIAMENTO DIRETO PARA DETECÇÃO APURADA DE MUTAÇÕES DO <i>NOTCH1</i> -----	62
4.3) ANÁLISE ESTASTÍSTICA-----	63
<b>5. RESULTADOS-----</b>	<b>65</b>
<b>5.1) ANÁLISES DE FREQUÊNCIAS-----</b>	<b>65</b>
5.1.1) CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS DAS AMOSTRAS-----	65
5.1.2) ANÁLISES DOS IMUNOFENÓTIPOS-----	67
5.1.3) FREQUÊNCIA DO REARRANJO <i>SIL-TALI</i> -----	68
5.1.4) PRESENÇA DO GENE <i>HOX11L2</i> -----	69
<b>5.2) MUTAÇÕES DO <i>NOTCH1</i>-----</b>	<b>69</b>
<b>5.3) DESCRIÇÃO DA FAMÍLIA-----</b>	<b>71</b>
<b>5.4) CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS-----</b>	<b>73</b>
5.4.1) CORRELAÇÃO DOS MARCADORES COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS-----	73
5.4.2) CORRELAÇÃO DOS IMUNOFENÓTIPOS COM AS ALTERAÇÕES GENÉTICAS-----	74
5.4.3) COEXISTÊNCIA DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS-----	76
5.4.4) ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS E GENÉTICAS DE ACORDO COM PROTOCOLO TERAPÊUTICO -----	78
<b>5.5) ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL-----</b>	<b>80</b>
<b>6. DISCUSSÃO-----</b>	<b>85</b>
<b>7. CONCLUSÕES-----</b>	<b>94</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----</b>	<b>95</b>
<b>9. ANEXOS-----</b>	<b>102</b>
9.1) FICHA DE ENCAMINHAMENTO	
9.2) CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP (INCA) E TCLE	
9.3) BANCO DE DADOS	
9.4) CURVAS DO DHPLC	
9.5) ELETROFEROGRAMAS	
9.6) ARTIGO SUBMETIDO	
9.7) APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS	

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Classificação imunológica da linhagem T em LLA de acordo com o proposto por EGIL-----	<b>35</b>
<b>Quadro 2:</b> Volumes dos reagentes utilizados na síntese se cDNA, de acordo com o volume final da reação-----	<b>53</b>
<b>Quadro 3:</b> Seqüência dos oligonucleotídeos usados nos RT-PCRs para a identificação do transcrito <i>SIL-TALI</i> -----	<b>55</b>
<b>Quadro 4:</b> Seqüência dos oligos usados nos RT-PCRs para a identificação da expressão do gene <i>HOX11L2</i> -----	<b>56</b>
<b>Quadro 5:</b> Seqüência dos oligos usados nos PCRs para a amplificação dos domínios do gene <i>NOTCH1</i> -----	<b>59</b>

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Características demográficas e clínico-laboratoriais da coorte analisada-----	<b>66</b>
<b>Tabela 2.</b> Resultados dos testes imunofenotípicos-----	<b>68</b>
<b>Tabela 3.</b> Descrição das mutações no domínio HD do <i>NOTCH1</i> nos casos familiares-----	<b>72</b>
<b>Tabela 4.</b> Caracterização dos casos em função do status do gene <i>NOTCH1</i> -----	<b>74</b>
<b>Tabela 5.</b> Características demográficas e clínico-laboratoriais dos casos de acordo com o <i>status</i> do <i>SIL-TALI</i> e <i>HOX11L2</i> -----	<b>75</b>
<b>Tabela 6.</b> Coexistência das alterações genéticas analisadas-----	<b>77</b>
<b>Tabela 7.</b> Análise das associações entre as alterações imuno-moleculares-----	<b>78</b>
<b>Tabela 8.</b> Caracterização genética e clínico-demográfica dos casos de acordo com o protocolo terapêutico usado-----	<b>79</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema hipotético figurativo da diferenciação das células hematopoiéticas normais-----	<b>20</b>
<b>Figura 2.</b> Maturação de linfócitos T-----	<b>22</b>
<b>Figura 3.</b> Estrutura molecular dos antígenos mais importantes na linhagem-T -----	<b>23</b>
<b>Figura 4.</b> Desenho esquemático da estrutura do receptor <i>NOTCH1</i> de acordo com as suas subunidades-----	<b>25</b>
<b>Figura 5.</b> Complexo Pentamérico regulador transcricional da hematopoiese precoce -----	<b>28</b>
<b>Figura 6.</b> Expansão clonal-----	<b>30</b>
<b>Figura 7.</b> Incidência em crianças e adultos dos subtipos de LLA de acordo com a classificação EGIL -----	<b>32</b>
<b>Figura 8.</b> Fotos ilustrativas das morfologias de uma LLA-T e de um caso de LLb-T leucemizado -----	<b>34</b>
<b>Figura 9.</b> Diagrama esquemático da região onde podem ocorrer os pontos de quebra dos genes <i>SIL</i> e <i>TAL1</i> -----	<b>37</b>
<b>Figura 10.</b> Região onde podem ocorrer as quebras dos genes <i>BCL11B</i> e <i>HOX11L2</i> -----	<b>39</b>
<b>Figura 11.</b> Ilustração da via hipotética e simplificada do <i>NOTCH1</i> na patogênese das neoplasias -----	<b>40</b>
<b>Figura 12.</b> Gel de agarose revelando o PCR do gene <i>GAPDH</i> -----	<b>54</b>
<b>Figura 13.</b> Splicings alternativos gerados pela combinação das regiões rearranjados dos genes <i>SIL</i> e <i>TAL1</i> -----	<b>55</b>
<b>Figura 14.</b> Ilustração com gel dos resultados dos PCRs do <i>NOTCH1</i> -----	<b>60</b>
<b>Figura 15.</b> Formação de homo e heteroduplex através da reação de <i>ramp</i> -----	<b>62</b>
<b>Figura 16.</b> Ilustração dos resultados do <i>SIL-TAL1</i> com gel de casos analisados e gráfico dos resultados percentuais---	<b>68</b>
<b>Figura 17.</b> Ilustração dos resultados do <i>HOX11L2</i> com gel de casos analisados e gráfico dos resultados percentuais ---	<b>69</b>
<b>Figura 18.</b> Curvas do DHPLC ilustrando mutações do <i>NOTCH1</i> nos domínios HD e PEST-----	<b>70</b>
<b>Figura 19.</b> Eletroferogramas demonstrando mutações no domínio HD do <i>NOTCH1</i> -----	<b>71</b>
<b>Figura 20.</b> Mutações do <i>NOTCH1</i> nos casos familiares-----	<b>72</b>
<b>Figura 21.</b> Caso <i>SIL-TAL1</i> , <i>HOX11L2</i> e CD10 positivos-----	<b>76</b>
<b>Figura 22.</b> Curvas da sobrevida global dos pacientes e da sobrevida em função do protocolo de tratamento utilizado---	<b>80</b>
<b>Figura 23.</b> Sobrevida em 36 meses de acordo com o <i>status</i> dos antígenos CD10 e CD1a-----	<b>81</b>
<b>Figura 24.</b> Curvas de sobrevida dos pacientes de acordo com o <i>status</i> do rearranjo <i>SIL-TAL1</i> e do <i>HOX11L2</i> -----	<b>82</b>
<b>Figura 25.</b> Curvas de sobrevida em função do <i>status</i> do gene <i>NOTCH1</i> e da idade-----	<b>83</b>
<b>Figura 26.</b> Sobrevida em 36 meses de acordo com as combinações entre CD10 e <i>SIL-TAL1</i> , e CD1a e <i>SIL-TAL1</i> -----	<b>84</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**AcMo** – anticorpo monoclonal

**BCL11B** – *B cell Lymphoma 11B* ou *CTIP2*

**cDNA** – ácido desoxirribonucléico complementar

**CD** – *cluster of differentiation* (grupamentos de diferenciação)

**CDK** – ciclina dependente de kinase

**cCD3** – CD3 intracitoplasmático

**CFU** – unidade formadora de colônia

**CSL** – CBF-1/RBP-J kappa, Suppressor of hairless, and Lag-1

**CSF** – fator estimulador de colônia

**DEPC** – dietilpirocarbonato

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**DNA** – ácido desoxirribonucléico

**dNTP** – desoxinucleotídeos

**DRM** – doença residual mínima

**DTT** – ditioneitol

**EC** – extracelular

**EDTA** – ácido etilenodiaminotetraacético

**EGIL** – *European Group for Immunophenotyping Leukaemia*

**FAB** – *French-American-British group*

**FISH** – *fluorescent in situ hybridization* (hibridização *in situ* por fluorescência)

**FITC** – isotiocianato de fluoresceína

**GAPDH** – gliceraldeído - 3 - fosfato desidrogenase

**G-CSF** – fator estimulador de colônia de granulócitos

**GM-CSF** – fator estimulador de colônia para granulócitos e monócitos

**HD** – Domínio de Heterodimerização

**HLA-DR** – *human leucocitary antigen-DR* (antígeno leucocitário humano-DR)

**HOX11L2** – *TLX3 (T cell leukemia homeobox 3)*

**ICN** – *intracellular domain of NOTCH1*

**ITAM** – *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (imunorreceptor com motivo baseado na ativação por tirosina)

**Kb** – quilo base

**LA** – leucemia aguda

**LLA** – leucemia linfoblástica aguda

**LLA-T** – leucemia linfoblástica aguda de linhagem T

**LLB-T** – linfoma linfoblástico T

**LMA** – leucemia mielóide aguda

**LMO2** – *LIM domain only 2*

**M-CSF** – fator estimulador de colônia para monócitos

**MHC** – *Major Histocompatibility Complex* (complexo de histocompatibilidade principal)

**min** – minuto

**μM** – micro molar

**μl** – micro litro

**ml** – mili litro

**MO** – medula óssea

**MPO** – mieloperoxidase

**NS** – estatisticamente não significativo

**PEST** – Domínio Polipeptídico Enriquecido em prolina, glutamina, Serina e Treonina

**pb** – pares de bases

**PBS** – *phosphate buffered saline* (solução salina tamponada com fosfato)

**PCR** – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

**PE** – ficoeritrina

**PerC5** – ficoeritrina – cianina 5.1

**RAGs** – *recombinase activating gene* (recombinase ativadora de genes)

**RNA** – ácido ribonucléico

**rpm** – rotações por minuto

**RT-PCR** – reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa

**RSS** – *recombination signal sequence* (sequência sinalizadora de recombinação)

**SC** – *stem cell*

**SCF** – *stem cell factor*

**SCL** – *stem cell leukemia*

**SIL** – *SCL interrupting locus*

**SNC** – sistema nervoso central

**SNP** – sistema nervoso periférico

**SP** – sangue periférico

**TAD** – Domínio de Transativação

**TAL1** – *T cell acute leukemia gene 1*

**Taq** – enzima *Thermus aquaticus*

**TCL5** – *T cell leukemia gene 5*

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

**TdT** – *terminal deoxynucleotidyl transferase*

**TM** – Transmembrana

**TCLE** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**WHO** – *World Health Organization*

## RESUMO

As leucemias linfoblásticas agudas de célula T (LLAs-T) apresentam alta prevalência em países em desenvolvimento, justificando a realização de estudos exploratórios na população brasileira. Análises das alterações genético-moleculares têm permitido a identificação de elementos envolvidos na leucemogênese. A fusão *SIL-TAL1*, a expressão do gene *HOX11L2*, e as mutações do *NOTCH1* são alterações genéticas comuns nas LLAs-T. Com o objetivo de testar a influência destas anormalidades no prognóstico das LLAs-T de pacientes brasileiros, nós analisamos uma série de 170 crianças e adultos jovens com LLA-T, com idades entre 1-21 anos, sendo 39 meninas e 131 meninos, diagnosticados entre 2001-2007. A metodologia incluiu imunofenotipagem para a definição do subtipo celular e para análise do *status* do CD10 e CD1a; RT-PCR para detecção do *SIL-TAL1* e do *HOX11L2*, PCR, DHPLC e seqüenciamento para a identificação de mutações no *NOTCH1*. O método de Kaplan-Meier foi usado para estimar a sobrevida dos casos em 36 meses de acordo com o perfil dos marcadores analisados. Nossos resultados mostraram 36,4 % das amostras com CD10<sup>+</sup> e 28,8 % com CD1a<sup>+</sup>. As frequências do *SIL-TAL1* e do *HOX11L2* foram 24,4 % e 11,5 % respectivamente. Sobre as mutações do *NOTCH1*, o domínio PEST estava mutado em 8,8 % dos casos; o HD representou 16,2 % das mutações, enquanto a análise de ambos os domínios juntos demonstrou 57,4 % das mutações. Interessantemente, duas irmãs com LLA-T (não-gemelares) foram analisadas para o *NOTCH1*, vimos que ambas apresentaram mutações nos domínios HD e PEST nas mesmas regiões. A análise das células do SP dos pais destas irmãs não demonstrou mutações no *NOTCH1*. Com estes resultados, nós podemos afirmar que estas mutações são somáticas. O impacto de cada marcador na sobrevida não foi estatisticamente significativo. Através destes resultados vê-se que é necessário continuar este estudo com um número maior de casos analisados para o *NOTCH1*, para que, assim, possamos avaliar melhor o impacto destes marcadores na patogênese das LLAs-T.

**ABSTRACT**

T acute lymphoblastic leukemias (T-ALL) subtype presents higher prevalence in developing countries, justifying exploring studies in a Brazilian population. The analyses of genetic-molecular alterations have allowed the identification of elements involved in leukemogenesis. The *SIL-TAL1* fusion gene, the expression of *HOX11L2* gene, and *NOTCH1* mutations are the common genetic alterations found in T-ALL. In order to test the influence of such abnormalities on outcome of T-ALL in Brazilian patients, we carried out an analysis of a series of 170 children and young adults with T-ALL, age range 1-21 years old, being 39 girls and 131 boys consecutively diagnosed between 2001-2007. Methodology included immunophenotyping for subtype definition and analyses of CD10 and CD1a *status*; RT-PCR for molecular analyses of *SIL-TAL1* and *HOX11L2*, PCR, DHPLC and sequencing for *NOTCH1* mutations detections. Kaplan-Meier survival methodology was used to estimate the 36-months survival rate of T-ALL cases according to the markers analyzed. Our results show that CD10 was positive in 36.4 % of the samples and CD1a in 28.8 %. The frequency of *SIL-TAL1* fusion gene and *HOX11L2* were 24.4 % and 11.5 % respectively. Regarding *NOTCH1* mutations, the domain PEST was mutated in 8.8 % of the cases; the HD domain demonstrated 16.2 % of mutations, whereas the analysis of both domains together presented 57.4 % of mutations. Interesting, T-ALL in two sisters (non-twins) included in these analyses, demonstrated that they both had mutation in HD and PEST domains in the same region. The analysis of PB cells of both parents demonstrated any mutation in *NOTCH1*. With these results, we can confirm that *NOTCH1* mutations are somatic. The impact of all markers in survival was not significant statistically. From these results it is necessary to continue the study with a larger number of cases analyzed to *NOTCH1*, so we can better evaluate the impact of each marker with the pathogenesis of T-ALLs.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1) HEMATOPOESE NORMAL

#### 1.1.1- Aspectos gerais

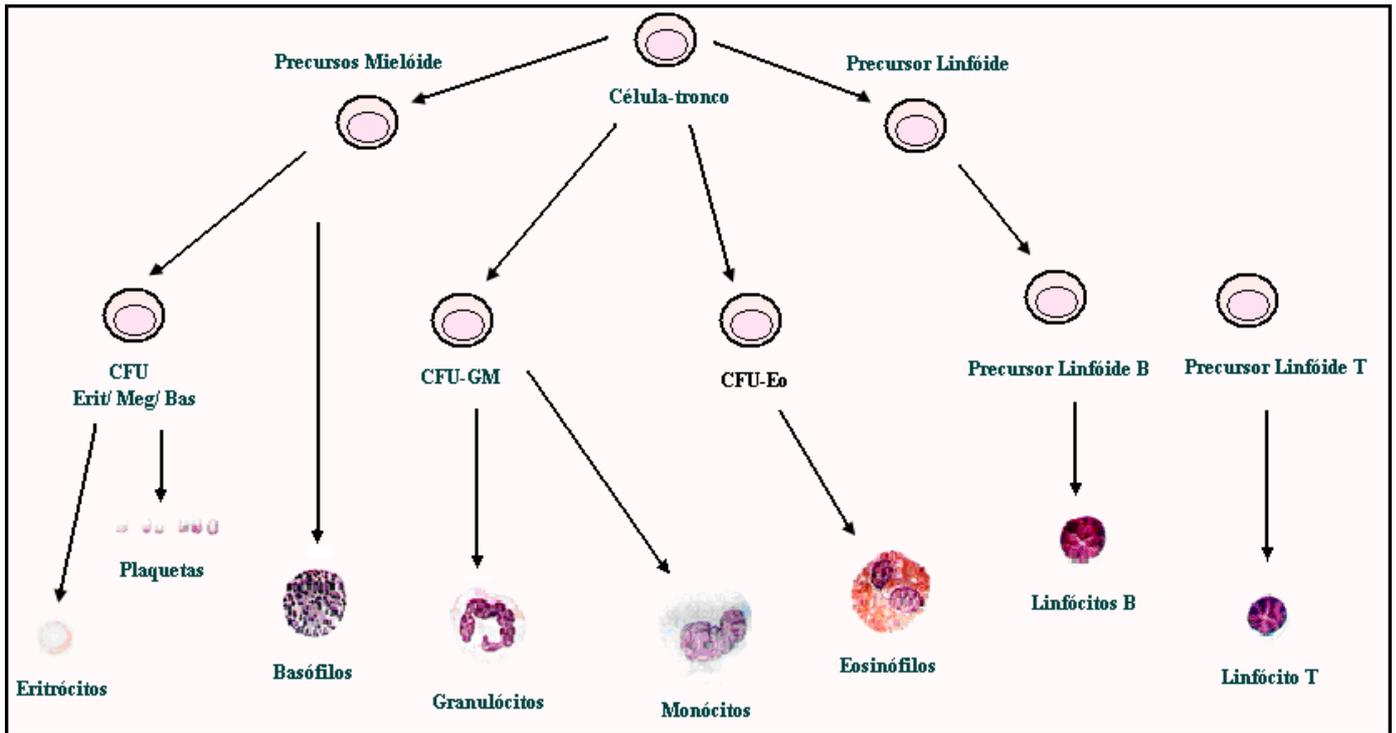
Os processos envolvidos na gênese dos diversos tipos de células do sangue a partir das células-tronco hematopoéticas são coletivamente chamados de hematopoese e incluem: a auto-regeneração das células-tronco; a programação com o comprometimento da progênie de células-tronco a uma única linhagem celular; a proliferação e diferenciação das células precursoras em células maduras e funcionais. A hematopoese tem como pré-requisito à existência de um microambiente normal, capaz de sintetizar fatores de crescimento necessários à sobrevivência das células progenitoras, acomodar as células em desenvolvimento e favorecer as interações entre células de diferentes tipos para finalmente desempenharem suas funções específicas [1, 2].

Didaticamente, as estruturas anatômicas hematopoéticas da medula óssea (MO) podem ser divididas em estroma e células hematopoéticas.

O estroma é constituído por um componente celular, representado por fibroblastos, adipócitos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais dos sinusóides medulares, e um componente acelular, representado pela matriz extracelular. O estroma constitui o microambiente que possibilita o crescimento e a diferenciação das células hematopoéticas. O estroma também regula a hematopoese por meio da secreção de fatores solúveis (G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Interleucinas, SCF, dentre outros) interações célula-célula (via moléculas de adesão específicas como integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 2$ , e selectinas) e célula-matriz extracelular e/ou citoesqueleto (compostos por proteínas, glicoproteínas e proteoglicanas) [1, 2].

O compartimento mais primitivo das células hematopoéticas é formado por células-tronco ou progenitores pluripotentes, células precursoras de linhagens e células diferenciadas. As células-tronco pluripotentes ou *stem cells* (SC) que são definidas pela capacidade de reconstituir a hematopoese em longo prazo e de modo completo conforme experimentos realizados em animais irradiados letalmente. Estas células são capazes de realizar divisão celular assimétrica, ou seja, ao se dividirem dão origem a uma nova célula-tronco (auto-regeneração) e a uma célula precursora comprometida (ou direcionada) com uma linhagem específica definida. As células precursoras são originadas a partir de divisões das células-tronco, sendo que, com isso, ocorre a perda do potencial de auto-regeneração por parte das células precursoras, devido ao comprometimento com uma dada via de diferenciação. À medida que se dividem e diferenciam, as células precursoras tornam-se mais restritas a uma única linhagem. As células precursoras são geralmente designadas como Unidades Formadoras de Colônia (CFUs). Durante o processo de diferenciação, primeiro ocorre à separação entre a linhagem linfóide e mielóide, a seguir a separação entre a linhagem granulocítica e monocítica, a eritróide-megacariocítica, e assim sucessivamente.

As células diferenciadas são identificadas facilmente através de seus aspectos morfológicos, estas constituem a maior parte dos elementos figurados da MO e são capazes de apenas algumas divisões celulares. São células especializadas que sofreram modificações irreversíveis no seu núcleo e organelas citoplasmáticas. Este esquema figurativo hipotético da diferenciação celular na MO está ilustrado na figura1 [1, 2].



**Figura 1:** Esquema hipotético figurativo da diferenciação das células hematopoiéticas normais. Nesta figura, observamos que uma célula-tronco inicial se diferencia dando origem a um precursor mielóide e a um precursor linfóide. Cada um destes precursores segue seu caminho comprometendo-se com diferentes linhagens, no caso do precursor linfóide, este originará mais tardiamente os linfócitos B e T, propriamente ditos.

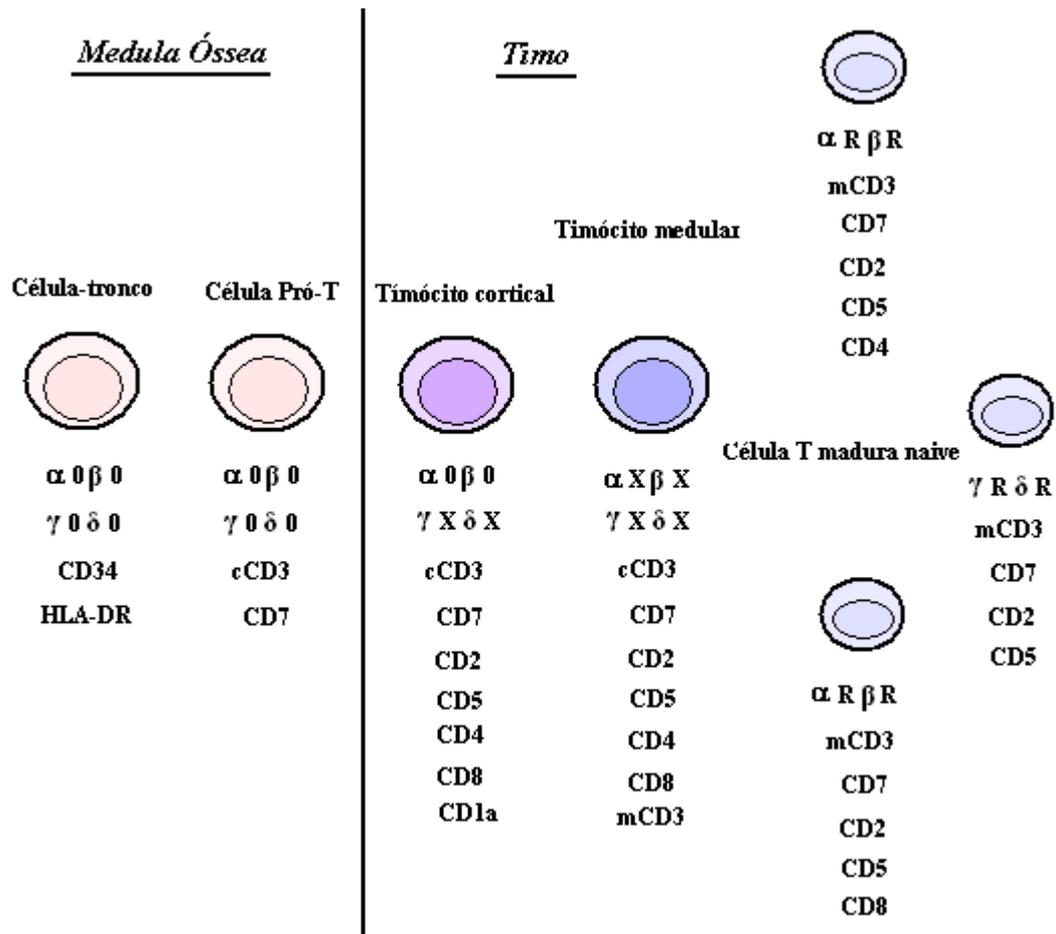
### 1.1.2- Ontogenia e maturação de linfócitos T

Os tecidos linfóides podem ser primários (generativos) ou secundários (periféricos). Os primários são os tecidos onde os linfócitos expressam, pela primeira vez, os receptores antigênicos e onde adquirem maturidade fenotípica e funcional, são eles a MO e o timo.

A MO, além de originar todos os linfócitos (B e T), é o local de maturação e depósito das células B imaturas. No caso dos linfócitos T a diferenciação se dá no timo, para em seguida estas células se direcionarem para os órgãos linfóides secundários que são: linfonodos, baço e tecido linfóide associado às mucosas e à pele, nesses órgãos ocorrem às respostas imunes aos antígenos [1, 2].

Os precursores linfóides de células T que expressam  $CD34^{+/-}$   $cCD3^{+}$   $CD7^{+}$  deixam a MO em direção ao timo, neste órgão estas células, ainda muito pouco diferenciadas,

continuam o seu programa de diferenciação. Este processo inclui o rearranjo dos genes responsáveis pelos receptores de células T (TCR) e a expressão das diversas moléculas de superfície na membrana celular. Esses rearranjos gênicos se processam, inicialmente, por ação de enzimas denominadas recombinases (RAGs) e, posteriormente, por ação da enzima *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) que insere um número variável de novas bases no DNA das regiões que sofrem rearranjo, para promover o aumento de repertórios de células T, necessários para um indivíduo. No timo, as células precursoras CD7<sup>+</sup> sofrem um processo de maturação que é extremamente complexo e resulta na formação de um repertório de células T funcionais. A maturação destes linfócitos ocorre no trajeto que percorrem do córtex até a medula tímica. Os timócitos adquirem, mantêm e/ou perdem marcadores como o cCD3, CD2, CD5, CD1a, CD4, CD8 e mCD3, permitindo a caracterização de diferentes estágios maturativos. O precursor CD34<sup>+</sup>/ CD7<sup>+</sup>, proveniente da MO, migra para a camada subcapsular do córtex tímico e rapidamente expressa os marcadores CD2 e CD5, este precursor é chamado pró-T. O precursor pró-T pode se diferenciar em duas linhagens de células T diferentes. A maioria (95%) se diferencia em células pré-T corticais que expressam CD1a, CD4, CD8, proteínas citoplasmáticas, TCR $\alpha\beta$  e mCD3. Na camada medular do timo, esses timócitos formam duas subpopulações: a maioria CD4<sup>+</sup>/ CD8<sup>-</sup> e a minoria CD4<sup>-</sup>/ CD8<sup>+</sup>, ambas já expressando mCD3/ TCR $\alpha\beta$ . Alternativamente, o precursor pró-T CD34<sup>+</sup>/ CD7<sup>+</sup>/ CD2<sup>+</sup>/ CD5<sup>+</sup> pode se diferenciar em células pré-T CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (5%) que expressam inicialmente TCR $\gamma\delta$  citoplasmático e, posteriormente, CD3 e TCR $\gamma\delta$  na membrana. A seguir, estes três tipos de timócitos maduros (TCR $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup>, TCR $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>, e TCR $\gamma\delta$ ) migram para a periferia. Dos linfócitos circulantes, 95% expressam TCR $\alpha\beta$  e, apenas 5% TCR $\gamma\delta$  (Figura 2) [3].



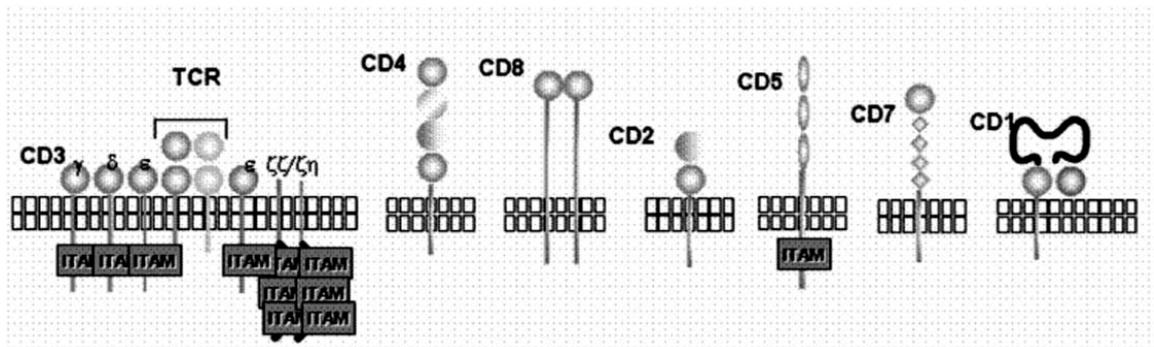
**Figura 2:** Desenho ilustrativo da hierarquia das moléculas celulares na maturação de linfócitos T (Modificada de *Immunology Letters* 2005) [4]. Neste esquema, ainda na medula óssea, uma célula-tronco inicial se diferencia comprometendo-se com a linhagem T, passando, assim, a expressar moléculas características deste subtipo celular como CD7 e cCD3, por exemplo. Estas células agora já comprometidas com a linhagem T migram da medula óssea para o timo e, então, neste órgão promovem sua maturação celular efetiva. A progressão do processo maturativo é caracterizada pela expressão de diversas moléculas como CD2, CD5, CD4, CD8, CD1a, mCD3e TCRs  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ .

A passagem dos precursores T pelo timo tem duas funções: a produção de células T maduras e a seleção de clones pouco auto-reativos. Ambas dependem da participação de células não-linfóides do timo, como por exemplo, células epiteliais, dendríticas e macrófagos, que constituem o microambiente necessário para a diferenciação do timócitos. Os linfócitos T que emigram do timo e colonizam os órgãos linfóides secundários são chamados de células

virgens (*naive*), pois ainda não foram ativadas por contato com antígenos. Após o contato com antígenos, os linfócitos T participam da resposta imunológica como linfócitos T-auxiliares ( $CD4^+$ ) ou T-citotóxicos ( $CD8^+$ ) e, terminada a resposta, a maioria morre, sendo que alguns sobrevivem e constituem os *linfócitos de memória*, que têm vida longa e são armazenados ao longo do tempo pelo sistema imunológico [1, 3].

### 1.1.3- Moléculas características dos linfócitos T

A seqüência de maturação das células T envolve a expressão progressiva de antígenos de diferenciação que estão representados esquematicamente na figura 3 abaixo.



**Figura 3:** Estrutura molecular das glicoproteínas mais importantes e características da linhagem-T (*Immunology Letters* 2005) [4].

A estrutura mais específica é o conjunto de moléculas formado pelo receptor de célula T ou TCR e o CD3. Este último é um complexo formado por quatro cadeias: um domínio extracelular, uma longa cauda citoplasmática com imunorreceptor com motivo baseado na ativação por tirosina (ITAM), e as outras duas cadeias podem ser um homodímero (zeta-zeta) ou um heterodímero (zeta-eta). As cadeias que formam o CD3 são responsáveis por realizar transdução de sinal na ativação do TCR.

O CD4 é uma molécula que interage com o MHC de classe II e que está presente na superfície de células T-auxiliares. O CD8 interage com MHC de classe I e está presente em células T-citotóxicas [4].

As glicoproteínas de diferenciação que são importantes na definição do estágio de maturação da célula T são o cCD3, o CD1a, o CD3 de membrana, e o TCR, enquanto as moléculas CD2, CD5 e CD7 são consideradas antígenos pan-T, pois se mantêm ao longo de toda a diferenciação das células T, tanto nas células auxiliares como nas citotóxicas. O CD1a é uma molécula expressa em células dendríticas, e que em linfócitos é restrita ao subgrupo de timócitos corticais. O CD1a é uma molécula peculiar com estrutura similar a do MHC de classe I, e sua função nas células apresentadoras de antígeno (APCs) está relacionada à apresentação de antígenos lipídicos. O CD2 pode ser caracterizado como uma molécula de adesão celular que tem como ligante o CD58 (expresso em APCs). O CD5, que não é exclusivo de células T, é um receptor de ação dupla, dando tanto sinais estimulatórios quanto inibitórios, dependendo do tipo de célula (T ou B) e do estágio de desenvolvimento (timócito ou T maduro) no qual ele é expresso. O CD7 permanece com sua função indeterminada, podendo estar envolvido na regulação da produção de citocinas por células T. [4].

#### **1.1.4- Genes associados ao desenvolvimento da célula T**

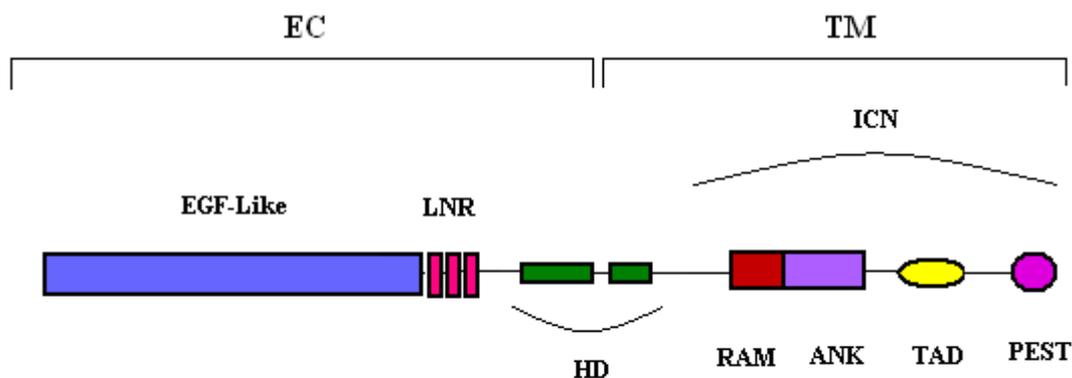
Em eucariotos, a geração dos diversos tipos de células depende de mecanismos que estabelecem e mantêm programas específicos de expressão gênica. Nesse processo é central a função desempenhada pelos fatores de transcrição, os quais agem de modo combinatório para ativar ou reprimir grupos específicos de genes-alvo em ambiente celular apropriado. Estes temas são particularmente relevantes no sistema hematopoético, onde a definição da linhagem, a diferenciação e a leucemogênese são controladas por interações combinadas de fatores de transcrição de diversas famílias gênicas [5].

**NOTCH1-** Dentro do contexto exposto acima, destaca-se o gene *NOTCH1*, descrito pela primeira vez em um estudo com drosófilas por Ellisen LW e cols em 1991, este estudo

além de identificar pela primeira vez o gene *NOTCH1* em humanos, também descreveu seu importante papel em neoplasias humanas [6].

Sabe-se que a família *NOTCH* é subdividida em: *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* e *NOTCH4*, todos eles desempenham função na embriogênese. Todos os representantes da família *NOTCH*, codificam 4 proteínas (NOTCH1-NOTCH4) que atuam como receptores transmembrana, mas há diferentes funções para cada um. Para estes receptores foram identificados 5 ligantes, Delta-like-1, Delta-like-3, Delta-like-4, Jagged-1 e Jagged-2 [7].

No caso do presente estudo, o gene destacado é o *NOTCH1*, que codifica um receptor transmembrana de mesmo nome. Este receptor é composto de duas subunidades: uma extracelular (EC) formada por porção *EGF-like*, 3 *Lin-repeats* (LNR), e domínio HD (heterodimerização); e uma subunidade transmembrana (TM) com uma porção transmembrana simples, e uma grande porção intracelular, onde se localizam a seqüência RAM, o domínio de *Ankirin-repeats* (ANK), o PEST (domínio polipeptídico enriquecido em prolina, glutamina, serina e treonina) e o TAD (domínio de transativação) (Figura 4) [8].



**Figura 4:** Desenho esquemático da estrutura do receptor *NOTCH1* de acordo com as suas subunidades extracelular (EC) e transmembrana (TM). Como descrito, a subunidade EC é composta pelas porções EGF-Like, *Lin-repeats* (LNR) e parte da HD. Quanto a subunidade TM, esta se caracteriza pela presença de parte da porção HD, e das porções RAM, ANK, TAD e PEST.

O *NOTCH1*, no desenvolvimento de células T, tem como funções: regulação da manutenção de células-tronco hematopoiéticas, diferenciação e auto-renovação celular, decisão celular quanto à linhagem (definindo se um linfócito será T ou B), comprometimento de células-tronco para o desenvolvimento de células T funcionais e, particularmente, para a montagem de receptores em timócitos imaturos [9, 10].

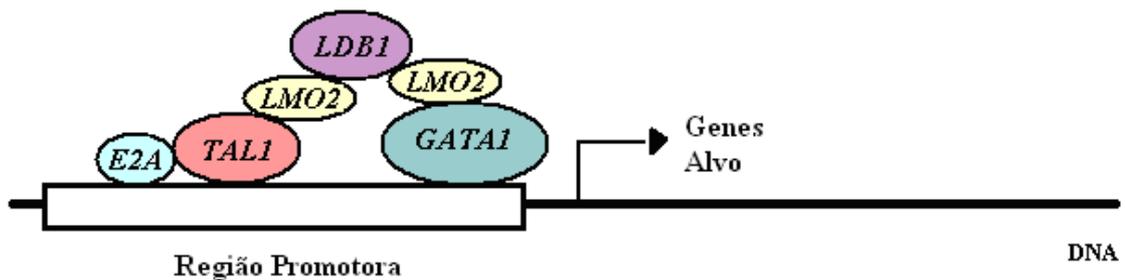
Em relação à via de sinalização do gene *NOTCH*, esta se relaciona à determinação do destino celular (*cell fate*), a proliferação e diferenciação de uma ampla variedade de células e tecidos. Além disso, o *NOTCH* também pode atuar no controle de processos apoptóticos. Com todas estas funções o *NOTCH* fornece ferramentas para o desenvolvimento de órgão e tecidos de um modo geral. A importância do *NOTCH1* para a definição do destino celular dos timócitos foi primeiro descrita em camundongos, nestes o *NOTCH1* foi condicionalmente deletado, resultando no bloqueio completo do desenvolvimento de células T e no surgimento ectópico de células B no timo. Ao contrário, a superexpressão do *NOTCH1* levava ao desenvolvimento de células T e a inibição da produção de células B. *In vitro*, esta situação pode ser reproduzida com progenitores hematopoiéticos humanos [11, 12].

Outra função do *NOTCH1* em células T é controlar a diferenciação destas células quanto ao tipo de receptor  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ , sendo que esta regulação é dependente do tipo de ligante. Sendo assim, pode-se inferir com segurança que a sinalização via *NOTCH1* é indispensável para o surgimento, desenvolvimento e diferenciação de linfócitos T, porém os mecanismos precisos pelos quais isto ocorre são ainda muito pouco conhecidos. Devido a esta grande diversidade de funções, o *NOTCH1*, pode atuar tanto como proto-oncogene, quanto como um supressor tumoral, dependendo do local onde esteja agindo e de como esteja sendo estimulado [13, 14].

*TALI*- Este gene está localizado no cromossomo 1 região 1p32, também conhecido como *stem cell leukemia (SCL)* ou *T cell leukemia gene 5 (TCL5)*, é um locus responsável por

codificar um fator transcricional de base hélice-loop-hélice. [15]. Durante a embriogênese, o *TALI* é especificamente expresso em sítios hematopoéticos, assim como em tecidos neurais e endoteliais. Uma função essencial do *TALI* no desenvolvimento hematopoético foi revelada após estudos com camundongos *TALI*<sup>-/-</sup>, ou seja, que não possuíam o gene. Nestes estudos o resultado foi a letalidade embriogênica devido a completa ausência de células sanguíneas primitivas. Sendo assim, estes estudos estabeleceram que *stem cells* embriogênicas *TALI*<sup>-/-</sup> são incapazes de contribuir para alguma linhagem hematopoética, demonstrando que o *TALI* é requerido para a geração de células hematopoéticas primitivas. Estudos recentes, baseados em diferenciação celular *in vitro*, demonstraram que a expressão do *TALI* também é requerida em precursores mesodérmicos para a especificação de células hematopoéticas definitivas. Juntos estes estudos identificam o gene em questão como um dos reguladores de ação precoce na especificação de *stem cells* hematopoéticas, sem nenhum papel específico dentro da linhagem T [16, 17]. O *TALI* também apresenta outras funções, como ativar ou reprimir a transcrição de genes relacionados à hematopoiese. Esta sua habilidade de regular a expressão gênica é dependente de uma integração multi-fatorial dentro de um complexo contendo outros quatro reguladores hematopoéticos essenciais. O complexo em questão é conhecido como complexo pentamérico ligador de DNA e também fazem parte deste os genes *E2A*, *LMO2*, *GATA1* e *LDB1* (Figura 5) [5].

O *TALI* possui função mais específica na hematopoiese como regulador positivo da diferenciação eritróide. E a expressão normal deste gene ocorre também nos tecidos endoteliais e cerebrais. Dentro do sistema hematopoético a expressão linhagem-restrita ocorre, além dos eritrócitos, em mastócitos, megacariócitos e células progenitoras, mas não em linfócitos T maduros [18].



**Figura 5:** Complexo Pentamérico regulador transcrricional da hematopoiese precoce. Como demonstrado na figura, fazem parte deste complexo os genes *E2A*, *TAL1*, *LMO2*, *LDB1* e *GATA1*, em conjunto estes genes promovem uma regulação transcrricional em níveis bastante iniciais do processo hematopoiético.

***HOX11L2***- Este é um membro da classe de genes homeobox, é chamado de gene órfão, pois se localiza fora dos 4 grupamentos HOX em mamíferos, podendo também ser chamado de *TLX3* [19]. Diferentemente dos genes da família homeobox, o *HOX11L2* não está relacionado ao processo hematopoiético.

O *HOX11L2* foi identificado pela primeira vez em 1999, como sendo expresso durante a formação do sistema nervoso (SN) de frangos [20]. Em humanos, está também envolvido na formação embriogênica do SN, tanto periférico (SNP) quanto central (SNC), atuando na diferenciação de células da crista neural. Em etapas mais tardias da embriogênese, o *HOX11L2* se relaciona à formação do sistema nervoso entérico (SNP) e participa da diferenciação de algumas células da medula espinhal (SNC). No SN já formado, o *HOX11L2* atua em diferentes porções do núcleo sensorial. Este núcleo é dividido em três partes: trigeminal, vestibular e coclear. Cada uma destas partes é composta de conjuntos de neurônios encarregados de transmitir informações sensoriais do ambiente externo e interno até o cérebro e medula espinhal. O papel exato do gene *HOX11L2* na formação e especialização de neurônios sensoriais não está ainda bem estabelecido, o que se sabe é que em camundongos

*HOX11L2*<sup>-/-</sup> há completa ausência de neurônios sensoriais viscerais no núcleo trigeminal, e perda parcial de neurônios sensoriais somáticos [21, 22].

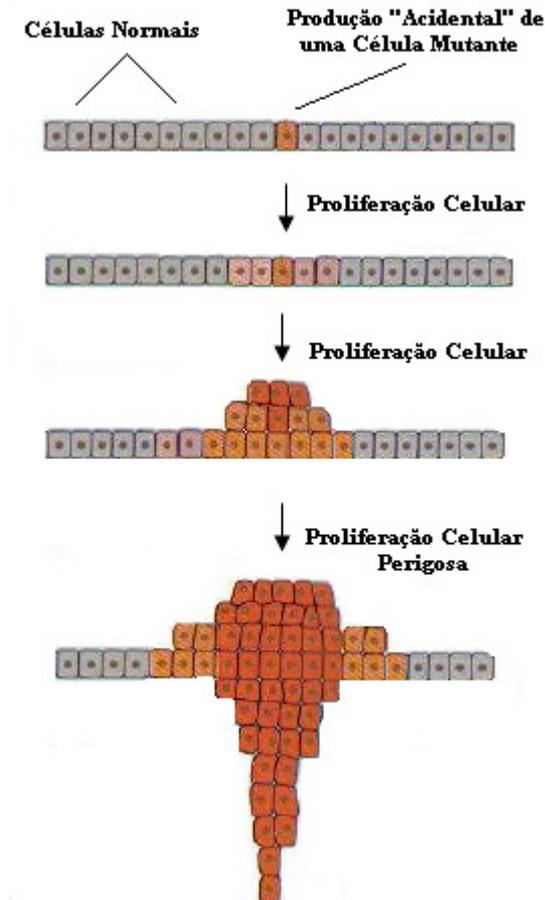
Por todo o exposto e de acordo com revisão da literatura pode-se concluir que o gene *HOX11L2* não atua em nenhuma etapa da formação ou diferenciação da célula T, sendo sua expressão restrita a condições anormais, como é o caso da leucemogênese.

## 1.2) LEUCEMIAS AGUDAS

### 1.2.1 - Aspectos gerais

A leucemia é um tipo de câncer que se origina em alguma célula da MO, sendo assim é uma doença caracterizada pelo acúmulo de precursores hematopoéticos ou de células hematopoiéticas mais diferenciadas. De acordo com o tipo celular envolvido, as leucemias podem ser linfóides ou mielóides. Alterações adquiridas em genes que regulam a hematopoese normal são freqüentemente detectadas em leucemia, porém a progressão da doença depende de mutações adicionais que promovam a sobrevivência e o desenvolvimento das células com mutações prévias [23].

Nas leucemias agudas ocorre um descontrole dos mecanismos fisiológicos de proliferação, maturação e liberação dos leucócitos. Na maioria das vezes, devido à intensa proliferação, há uma incapacidade do organismo de reparar uma mutação e a célula alterada passa então a se multiplicar descontroladamente [1] (Figura 6). Com isso, há a substituição progressiva dos leucócitos normais por células neoplásicas, gerando dentre outros sintomas; imunodepressão, anemia e sangramento excessivo [23]. Clinicamente os pacientes apresentam adenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia e/ou infiltrações tumorais em pele, testículos ou ovários e no sistema nervoso central.



**Figura 6:** Expansão clonal (Modificado de Alberts, *Molecular Biology of The Cell 2002*). Neste esquema observamos o surgimento de uma célula mutante, esta acumula uma série de alterações (mutações) que a conferem um grande potencial proliferativo. As características adquiridas pelo acúmulo destas alterações ao longo do tempo, fazem com que esta célula mutante predomine no ambiente, caracterizando o surgimento do tumoral.

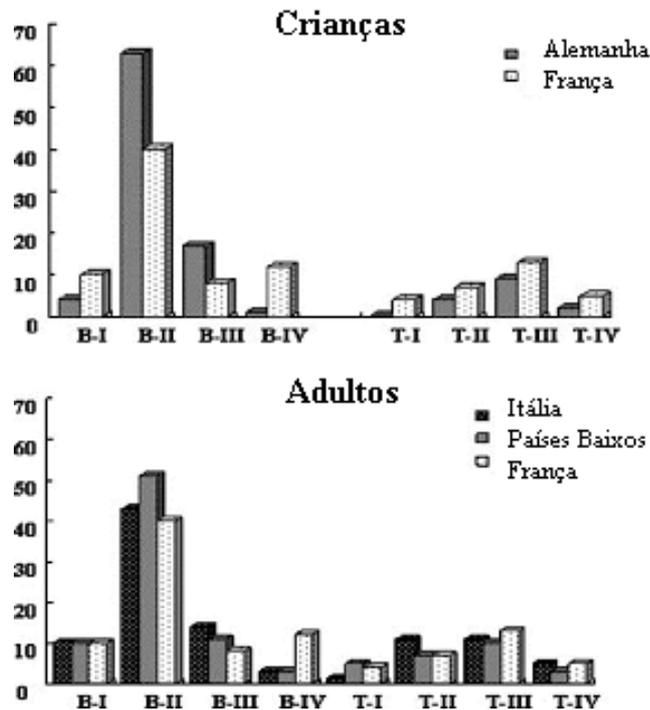
De um modo simplista, as leucemias agudas caracterizam-se por um grave defeito de maturação, induzindo a um acúmulo de células imaturas e a uma falha na produção de células hematopoéticas diferenciadas [1]. Estas células imaturas não são capazes de desempenhar suas funções normais. O padrão imuno-molecular sugere que as leucemias se originam através de mecanismos multi-fatoriais e que requerem certo tempo para a expansão do clone leucêmico.

As leucemias agudas podem ser classificadas, de acordo com a origem da linhagem celular, em leucemia linfoblástica aguda (LLA) originadas dos linfócitos e leucemia mielóide aguda (LMA) originadas das células mielóides. Esta classificação pode ser feita através de critérios morfológicos e de reações citoquímicas. Atualmente, esta classificação requer uma complementação com testes imunofenotípicos, citogenéticos e o reconhecimento de alterações genéticas através da biologia molecular [1].

### **1.2.2- Leucemia linfoblástica aguda (LLA)**

As LLAs são as neoplasias mais comuns da infância, apresentando um pico de incidência característico que ocorre entre 2-5 anos de idade, mas podem também ocorrer nas demais faixas etárias até 21 anos [24]. Os principais tipos das LLAs são definidos pela origem linfóide das células, B ou T, sendo subdivididos de acordo com a etapa maturativa. Para a uniformização de protocolo terapêutico o grupo *European Group for Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL) propôs em 1995 uma classificação para as LLAs de acordo com a expressão de antígenos celulares nas linhagens T e B [25].

A LLA de linhagem B corresponde a 85,0 % das LLAs, e é definida pela expressão de pelo menos dois dos seguintes marcadores intracitoplasmáticos e de membrana: CD79a, CD22 e CD19, podendo ser subdividida em quatro subtipos de B-I a B-IV de acordo com o grau de diferenciação das células blásticas [25]. Já a LLA de linhagem T corresponde à 15,0 % das LLAs na infância e adolescência, e é definida pela expressão citoplasmática ou de membrana do CD3 e CD7 conforme o grau de diferenciação tímica. Ela pode também ser classificada em quatro subtipos de T-I a T-IV, de acordo com o grau de maturação da célula [25]. Sabe-se que há prevalência de subtipos de LLA de acordo com a faixa etária, conforme ilustrado na figura 7.



**Figura 7:** Incidência (em porcentagem) em crianças e adultos dos subtipos de LLA de acordo com a classificação EGIL (Modificada de *Immunology Letters* 2005) [4]. O subtipo mais freqüente em ambos, crianças e adultos, é o B-II, também chamado de LLA-B comum e caracterizado pela proliferação de células B imaturas. Observa-se que as LLAs-T são muito menos freqüentes que as LLAs de linhagem B, tanto em adultos quanto em crianças. Dentro do subtipo T, as LLAs com células no estágio T-III são as mais freqüentes. As formas mais raras de ambas as LLAs, são as das extremidades maturativas, B-I e T-I, os imunofenótipos mais imaturos, e B-IV e T-IV, os mais maduros.

### 1.3) LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE LINHAGEM T

#### 1.3.1 - Aspectos gerais

Aproximadamente 15,0 % dos pacientes com LLA expressam antígenos relacionados à linhagem T (CD7, cCD3, CD2, CD5, CD1a, CD4, CD8 e mCD3). Este subtipo leucêmico é considerado uma neoplasia bastante agressiva e que se caracteriza por ter: contagem leucocitária elevada, quantidade considerável de células blásticas circulantes, possível comprometimento do SNC, e freqüente aumento da massa mediastínica (o que pode causar dificuldade respiratória, observada ao diagnóstico). Embora a LLA-T, freqüentemente, surja

no timo, ela se espalha por todo o corpo e, se não houver tratamento, é rapidamente fatal. Os tratamentos atuais têm melhorado as taxas de sobrevida por serem mais agressivos e consistirem, principalmente, da combinação de agentes quimioterápicos. Esta melhora é mais representativa em casos infantis, em adultos o que se observa são taxas menores de sobrevida.

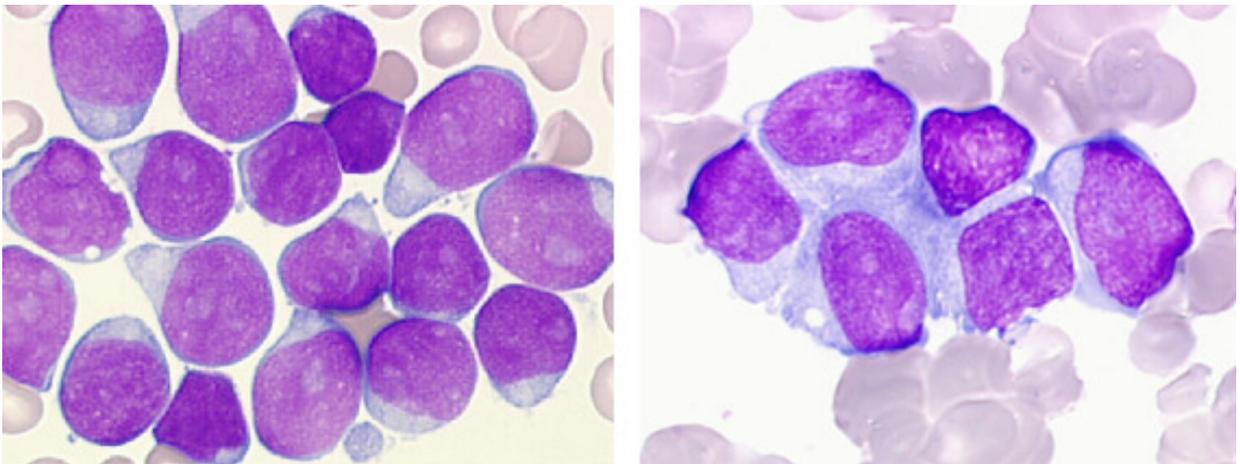
Este subtipo leucêmico manifesta-se pela proliferação de células blásticas linfopoéticas T, representando um grupo heterogêneo de doenças que variam com respeito aos aspectos morfológicos, citogenéticos e imunológicos das células transformadas. Os clones malignos, em pacientes com LLA-T, são originados de células progenitoras linfóides normais que ficam paradas, suspensas em estágios precoces da ontogenia de linfócitos T [26].

Dentre os aspectos biológicos das LLAs de linhagem T têm-se alterações genéticas específicas que levam à desregulação das vias celulares de transdução de sinais que culminam na regulação dos processos de transcrição gênica. Como exemplos dessas alterações têm-se as translocações cromossômicas e as mutações ou perdas de genes que controlam pontos do ciclo celular [27].

### **1.3.2- LLA-T versus LLb-T**

Dentre as neoplasias malignas de células T, além das LLAs-T, existe um outro fenótipo de doença denominado de linfoma linfoblástico T (LLb-T). Este corresponde a 40,0 % dos linfomas em idade pediátrica e possui algumas características em comum com a LLA-T. Estas duas entidades patológicas são semelhantes do ponto de vista biológico, tanto que são morfológicamente indistinguíveis. Além disso, estas neoplasias são consideradas como partes diferentes de uma mesma unidade biológica de acordo com as classificações *World Health Organization* (WHO) e Americana-Européia. Outra característica em comum, é que ambas as doenças acometem mais frequentemente adolescentes e adultos jovens, principalmente do sexo masculino. Basicamente, os critérios de distinção entre LLA-T e LLb-T se baseiam no

acometimento da MO e/ou SP por células blásticas. No caso dos LLbs-T, o limite de infiltração para MO é de menor que 15,0% de células T malignas. Do ponto de vista onco-terapêutico, ambas as formas são ainda consideradas como duas entidades de doença diferentes, com fenótipos clínicos distintos no que se refere ao tratamento e à sobrevida livre de doença. Estudos imunofenotípicos têm demonstrado que as células das LLAs-T exibem um fenótipo mais imaturo, respondendo por estágios mais precoces do desenvolvimento da célula T e ocorrendo principalmente na medula óssea. Já no caso dos LLbs- T, as células T exibem um fenótipo mais maduro e localizam-se em órgãos linfóides secundários. Em relação às alterações genéticas, muito pouco se sabe sobre os LLbs-T, esse pouco conhecimento se deve principalmente à dificuldade de se obter material deste tipo de tumor, geralmente localizado extra-medula óssea. A partir disto, surge a questão de uma possível similaridade entre LLAs-T e LLbs-T também no que diz respeito ao padrão de anormalidades genéticas [28].



**Figura 8:** Fotos ilustrativas das morfologias de uma LLA-T e de um caso de LLb-T leucemizado (*Daniel MT 2004*). Sob o ponto de vista morfológico, podemos observar a semelhança entre as duas entidades de doença, que só podem ser distinguidas com segurança com a utilização de outros critérios, como por exemplo quantidade de blastos malignos na medula.

As neoplasias de linhagem T podem ser classificadas de acordo com o padrão de expressão de determinadas moléculas em quatro subtipos de acordo com o estágio maturativo de T-I a T-IV, do mais imaturo para o mais maduro. Esta classificação foi proposta pelo grupo EGIL (Quadro 1) [4, 25].

**Quadro 1:** Forma sumarizada da classificação imunológica das LLAs-T de acordo com os critérios propostos pelo grupo EGIL (Modificado de *Immunology Letters* 2005) [4].

	<i>cCD3</i>	<i>CD7</i>	<i>CD2,CD5,CD8,CD4</i>	<i>CD1a</i>	<i>CD3<sup>+</sup>/CD1a<sup>-</sup></i>
<b><i>T-I</i></b>	+	+	-	-	-
<b><i>T-II</i></b>	+	+	+	-	-
<b><i>T-III</i></b>	+	+	+, CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>+</sup> ou CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>-</sup>	+	-
<b><i>T-IV</i></b>	+	+	+	-	+

#### 1.4) MARCADORES IMUNO-MOLECULARES IMPORTANTES NAS LLAs-T

##### 1.4.1- Marcadores e alterações genéticas relevantes na LLA-T

As análises imuno-moleculares dos marcadores fenotípicos e das alterações genéticas somáticas mais comuns em células leucêmicas tem contribuído grandemente para o entendimento da patogênese e do prognóstico das LLAs em geral. Em relação ao imunofenótipo, os marcadores que se destacam nas LLAs-T são aqueles usados para classificar as células T em estágios maturativos de acordo com os critérios EGIL [25], já citados acima, e CD1a e o CD10.

**CD1a-** O CD1a é uma proteína muito similar ao MHC de classe I, que tem como função a apresentação de antígenos lipídicos para os receptores de célula T. Esta molécula se expressa na membrana de células dendríticas, em timócitos normais, e em um subgrupo de

blastos de LLA-T [29]. É um marcador de importância nas LLAs-T, tanto por ser utilizado na classificação maturativa das células T de acordo com os critérios EGIL, como por estar associado a bons prognósticos em crianças com LLA-T [30].

**CD10-** O CD10 é um antígeno de superfície, originalmente conhecido como cALLA (common acute lymphoblastic leukemia antigen). Este foi um dos primeiros marcadores avaliados para a identificação de células leucêmicas em crianças com LLA [31]. O CD10 é uma molécula transmembrana com função enzimática, atuando como uma metalo-peptidase. Esta molécula é especializada em clivagens de aminoácidos formadores de peptídeos, clivando preferencialmente aminoácidos neutros [32]. O CD10 é fisiologicamente expresso em células B maduras e transitoriamente durante a diferenciação normal da linhagem B. Nas LLAs-B atua como marcador para caracterização das etapas maturativas de acordo com os critérios EGIL, estando presente em estágios bem imaturos dos blastos de célula B (B-II).

Nas LLAs-T, o CD10 está presente em aproximadamente 30,0 % dos casos, sendo considerado um marcador imunofenotípico aberrante [33].

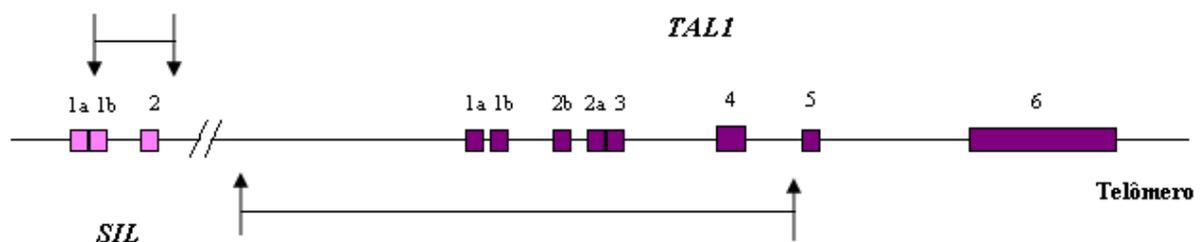
O papel do CD10 no prognóstico das LLAs-T é ainda um pouco controverso, há trabalhos que o associam a prognóstico favorável e outros que simplesmente não encontram esta associação. O que se tem como consenso é que o CD10 não tem significância como fator prognóstico independente, diferentemente de seu papel nas LLAs-B [34].

Dentre os tipos de anormalidades genéticas mais comuns nas LLAs-T têm-se: a expressão aberrante de proto-oncogenes, a ocorrência de translocações cromossômicas, e surgimento de hiperploídias envolvendo mais de 50 cromossomos. Estas alterações genéticas são capazes de alterar processos regulatórios-chave. O resultado da desregulação destes processos é a manutenção ou aumento da capacidade ilimitada de auto-renovação, subversão do controle da proliferação normal das células, bloqueio da diferenciação, e aumento da

resistência a apoptose. Algumas lesões genéticas afetam primariamente somente uma dessas vias, enquanto outras atingem mais que uma [35].

A identificação inicial de anormalidades genômicas nos casos de LLAs-T, demonstrou que a maioria, mas não todas, envolvem promotores e acentuadores de genes de TCR e um número relativamente menor envolve genes de fatores de transcrição, incluindo: *HOX11*, *LMO1*, *TAL1*, *HOX11L2*, *LMO2*, dentre outros. Em relação às translocações em LLAs-T, as principais acometem preferencialmente os *loci* 14q11 e 7q32-36 dos genes de TCR. A t(1;14)(p33;q11) ocorre em aproximadamente 3,0 % dos casos de LLA-T. Nesta translocação os genes envolvidos são *TAL1* e *TCR $\delta$* , e o resultado é uma expressão desregulada da proteína TAL1.

**SIL-TAL1-** A fusão *SIL-TAL1* ocorre com uma freqüência de 16,0-26,0% nas LLAs-T. Este rearranjo gênico se processa no cromossomo 1 na região 1p32 e é considerado críptico, pois não é visível pela citogenética convencional. O *SIL-TAL1* é exclusivamente encontrado em LLAs-T, justificando sua utilização como marcador de doença. Este rearranjo faz com que o gene *TAL1* passe a ser transcrito segundo o promotor do gene *SIL*, e como consequência tem-se a superexpressão da proteína TAL1 (Figura 9). A fusão *SIL-TAL1* pode ser considerada como um rearranjo V(D)J ilegítimo, possivelmente, realizado por um sistema de enzimas imaturas com atividade de recombinases (RAGs 1 e 2) [36].

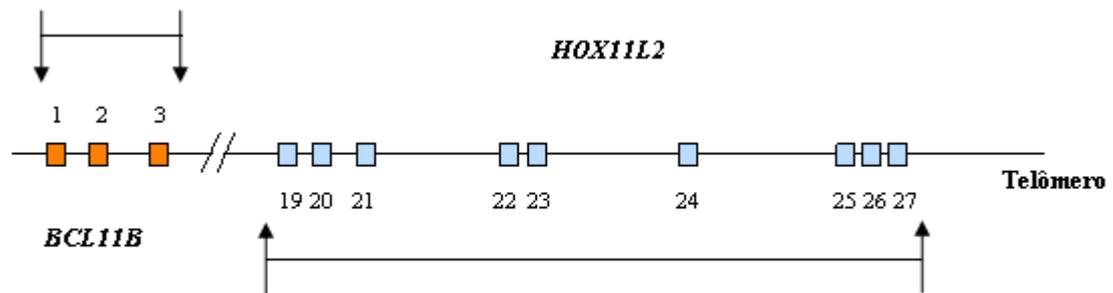


**Figura 9:** Diagrama esquemático da região (delimitadas pelas setas) onde podem ocorrer os pontos de quebra dos genes *SIL* e *TAL1*. Observamos que no caso do gene *SIL*, as quebras podem ocorrer entre os éxons 1a e 2, já para o *TAL1*, os pontos de quebra se localizam entre os éxons 1 e 5.

O efeito leucemogênico do rearranjo *SIL-TAL1* está na superexpressão da proteína TAL1. Sua expressão ectópica em células T pode ativar grupos específicos de genes-alvo que são normalmente quiescentes nestas células em condições normais. Alternativamente, a proteína TAL1 pode, também, ser leucemogênica via efeito negativo dentro do complexo pentamérico do qual participa, já que a sua superexpressão pode levar a uma inativação funcional do *E2A* [37]. Os produtos do *E2A* afetados são as proteínas E47 e E12. Estas, em condições normais, formam homodímeros (E47/E47; E12/E12) que se ligam a acentuadores do DNA, estimulando a transcrição. Quando a proteína TAL1 se liga aos produtos do *E2A* formam-se heterodímeros (E47/TAL1; E12/TAL1) e a função de ligadores de DNA da E47 e da E12 fica comprometida, havendo desregulação transcricional via complexo pentamérico, já que este deixa de se ligar ao DNA [38]. O gene *E2A* possui duas funções importantes que ficam comprometidas pela ação da TAL1 superexpressa, e que podem estar relacionadas à leucemogênese. As funções em questão são: a regulação da diferenciação e do comprometimento das células linfóides (de ambas as linhagens T e B), e suas características de supressor tumoral em células T [5].

***HOX11L2***- A  $t(5;14)(q35;q32)$  que está presente em 15,0-20,0% das LLAs-T, acomete o *locus* 5q35 onde se localiza o gene *HOX11L2* e o *locus* 14q32 onde se encontra o gene *BCL11B*. Como resultado desta translocação ocorre à superexpressão do gene *HOX11L2* na linhagem T (Figura 10). O *BCL11B* é normal e altamente expresso durante a diferenciação de células T, ele codifica um fator transcricional essencial para o processo de diferenciação destas células [39]. Já o gene *HOX11L2* pertence à família dos genes “*homeobox*” e atua como fator transcricional nos mecanismos de desenvolvimento celular no sistema nervoso, não sendo expresso em condições normais nas células T. Logo, é a sua expressão ectópica que pode ser relacionada ao processo leucemogênico. Trabalhos prévios da literatura indicam que

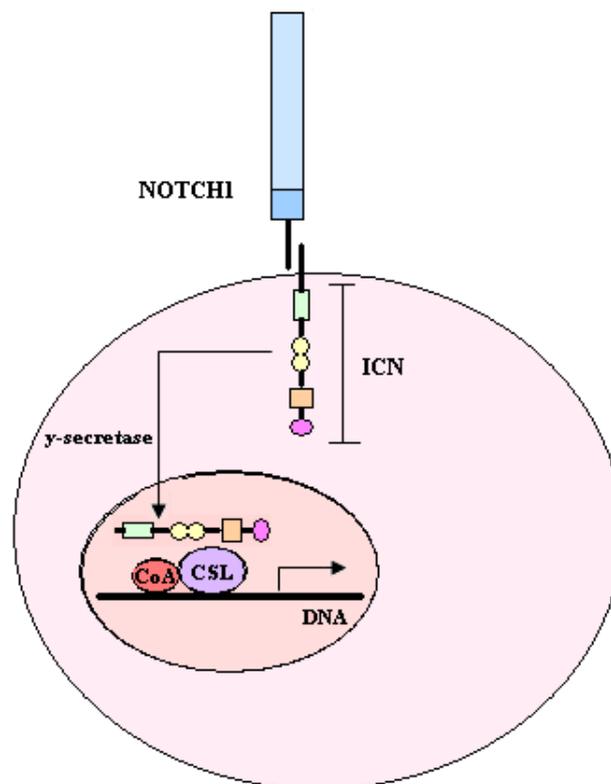
esta translocação é restrita a LLA-T, sendo mais freqüente em crianças do em adultos. Estudos preliminares analisaram seu valor prognóstico na doença, de acordo com seus níveis de expressão na célula. Observou-se que o seu impacto no prognóstico está diretamente relacionado ao tipo de tratamento quimioterápico utilizado [40].



**Figura 10:** Região (delimitada pelas setas) onde podem ocorrer as quebras dos genes *BCL11B* e *HOX11L2*. Vemos que para o gene *BCL11B* os pontos de quebra se localizam entre os éxons 1 e 3, já para o *HOX11L2* as quebras ocorrem entre os éxons 19 e 27.

**NOTCH1-** A via de sinalização do *NOTCH1* é bastante complexa e envolve a atividade coordenada de muitas moléculas. Esta via se encontra desregulada no câncer, devido à ativação constitutiva do receptor *NOTCH1*. Este é sintetizado no retículo endoplasmático como uma proteína simples, sendo, subsequentemente, direcionado ao complexo de Golgi, no qual ocorrem muitas modificações pós-translacionais. A primeira modificação consiste de três clivagens proteolíticas, que separam as porções extra e intracelular do *NOTCH1*. Posteriormente, este receptor heterodimérico se coloca na membrana, e ao ser ativado, libera seu domínio intracelular (ICN). Este é, então, translocado para o núcleo, se associa ao fator transcricional CSL e a co-ativadores (CoA), desencadeando a ativação transcricional de genes-alvo (Figura 11) [41]. A translocação do ICN para o núcleo é estimulada via  $\gamma$ -secretase, e, por isso, esta molécula tem sido estudada como possível alvo-terapêutico em doenças que envolvem o *NOTCH1*. No câncer alterações no *NOTCH1* (translocações ou

mutações), ativam sua via, independente de interação com ligante, e, com isso, o ICN é constantemente liberado e translocado para o núcleo, o que ativa desordenadamente a transcrição gênica [42]. O envolvimento do gene *NOTCH1* na patogênese das LLAs-T, foi primeiro discutido após a descoberta da sua participação na translocação t(7;9)(q34;q34.3), já que esta ativa de modo constitutivo o *NOTCH1*. Porém esta anomalia genética só é encontrada em uma pequena parcela de indivíduos com LLA-T [43]. A ativação do *NOTCH1* via mutações foi descrita recentemente (ver detalhes no tópico abaixo), e se mostrou bastante expressiva, já que, 50,0% dos pacientes exibiam este tipo de alteração. Estas mutações foram relacionadas a um aumento descontrolado da atividade transcricional. E é este descontrole transcricional que pode desempenhar um papel importante na leucemogênese [41, 44].



**Figura 11:** Ilustração da via hipotética e simplificada do *NOTCH1* na patogênese das neoplasias. No contexto neoplásico, a via do *NOTCH1* se apresenta constitutivamente ativada, independente da interação com o ligante. Sendo assim, a porção ICN é liberada e transloca constantemente para o núcleo ativando de maneira desregulada a transcrição de uma série de genes-alvo desta via de sinalização.

Algumas mutações ou perdas de genes que controlam o ciclo celular estão associadas à patogênese das LLAs-T. Dentre estes genes se destaca o *Rb* (gene do retinoblastoma), os genes que codificam os inibidores de ciclinas dependentes de quinase (CDKs)(*p21*, *p27*, *p57*), os que codificam inibidores de CDK4 (*p15*, *p16*, *p18* e *p19*), o gene *Ets-1*, e o *IKAROS* [26].

#### 1.4.2- Mutações do gene *NOTCH1*

Recentemente, um estudo desenvolvido por Weng AP e cols [44] em 2004 demonstrou uma expressiva participação do *NOTCH1* nas LLAs-T. Foram descritas mutações somáticas que ativavam constitutivamente o *NOTCH1*, estas mutações ocorrem em dois domínios: o HD e o domínio PEST. Neste estudo foram analisadas amostras de 96 pacientes pediátricos com LLA-T, e em 56,0 % dos casos pelo menos uma mutação foi encontrada, ou no domínio HD, ou no PEST, sendo que em alguns casos (16,0 %) as mutações ocorreram em ambos os domínios. Para provar que estas mutações exerciam efeitos nas funções do *NOTCH1*, foram feitos, neste mesmo estudo, ensaios em linhagens celulares humanas (U2OS) transfectadas com um plasmídeo contendo um gene para luciferase, responsivo ao *NOTCH1*. Como consequência, observou-se que quando havia mutações somente no domínio HD, ocorria um aumento de 9 vezes na atividade luciferásica, mutações só no domínio PEST causavam um aumento de 2 vezes, e que no caso de mutações em ambos os domínios o aumento era bastante expressivo, de 40 vezes [44].

Sobre como as mutações em HD e PEST ativam o *NOTCH1* sabe-se que o domínio HD é essencial para a associação estável entre as porções intra e extracelular do receptor *NOTCH1*, e, além disso, previne a ativação do *NOTCH1* independente de interação com ligante [45]. As mutações no HD promovem instabilidade no receptor *NOTCH1*, aumentando a liberação do ICN e sua consequente translocação para o núcleo. No caso do PEST, este tem como função, controlar a meia-vida do ICN no núcleo, promovendo a sua degradação ou

manutenção em função dos estímulos recebidos pela célula [46]. Quando o PEST está mutado, há um aumento considerável da meia-vida nuclear do ICN, representando, assim, uma acentuação da atividade do *NOTCH1*. Apesar de todo esse conhecimento, o mecanismo preciso pelo qual o *NOTCH1* promove a leucemogênese, não está completamente elucidado [41].

## 2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Conforme descrito anteriormente, a leucemia aguda é uma doença consideravelmente heterogênea, possuindo vários subtipos. Para seu melhor entendimento etiológico e clínico são necessárias diferentes abordagens analíticas e multidisciplinares.

As características genóticas, juntamente, com o imunofenótipo são instrumentos de grande importância na identificação e classificação dos diferentes tipos e subtipos de leucemias, e podem ser diretamente associados aos fatores envolvidos na etiopatogênese das mesmas. Em vários subtipos de leucemias agudas já está bem estabelecida uma forte correlação entre imunofenótipo, citogenética-molecular e aspectos clínicos. Logo, estudos que co-relacionem marcadores celulares e características moleculares são essenciais no entendimento e na elucidação da leucemogênese da doença. Embora seja óbvio que o genótipo esteja refletido no imunofenótipo de blastos leucêmicos, ainda não é absoluta esta concordância em alguns casos de LLA-T [47].

Os projetos de pesquisa que exploram marcadores biológicos em doenças, de maneira geral, resultam de processos dinâmicos. É neste contexto que se justifica as pesquisas do papel de determinados marcadores nas vias de patogênese e suas interações com respostas terapêuticas. Recentemente, nós realizamos um estudo em uma série de casos de LLA-T, com o objetivo principal de determinar a frequência da fusão *SIL-TALI* e de tentar correlacionar sua expressão com possíveis perfis imunofenotípicos. Nesta coorte de 137 casos de LLA-T, com pacientes entre 1-21 anos ao diagnóstico, encontramos uma frequência de 26,0 % para o rearranjo *SIL-TALI*. Estas amostras analisadas eram provenientes de diversas regiões brasileiras e representaram 16,0 % de todos os casos de LLAs recebidos em nosso laboratório entre os anos de 2001 e 2006 para diagnóstico. Análises preliminares deste estudo demonstraram também a expressão de CD10 em blastos representou 30,3 % do total de casos

analisados; havendo predomínio dos estágios mais maduros da célula T (T-III e T-IV). Quanto à sobrevida global observou-se que nos casos com  $CD10^+$  e  $SIL-TALI^-$  o prognóstico se mostrou com uma tendência mais favorável, sugerindo uma melhor sobrevida ( $p= 0,275$ ). A partir destes resultados preliminares, que não foram suficientes para uma conclusão estatisticamente significativa, nos propomos a aumentar nossa coorte de estudo, continuando com as análises imunofenóticas e moleculares, acrescida das análises dos genes *HOX11L2* e *NOTCH1*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1) OBJETIVOS PRINCIPAIS**

- Identificar mutações no gene *NOTCH1*, e avaliar a frequência do rearranjo *SIL-TAL1* e da expressão do *HOX11L2* nas LLAs-T em crianças e adultos jovens no Brasil;
- Analisar a existência de uma possível relação entre a presença de mutações no *NOTCH1* e o perfil imunofenotípico das células leucêmicas;
- Verificar a possibilidade de ocorrência simultânea de múltiplas alterações moleculares nas LLAs-T.

#### **3.2) OBJETIVO SECUNDÁRIO**

- Padronizar as técnicas de rastreamento de mutações nos diferentes domínios do gene *NOTCH1*;
- Avaliar um possível papel dos marcadores imunofenotípicos CD10 e CD1a no prognóstico das LLAs-T;
- Verificar a possível existência de correlação entre as alterações moleculares analisadas e seu valor prognóstico nas LLAs-T.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1) AMOSTRAS**

#### **4.1.1- Descrição das amostras e critérios de inclusão**

As amostras incluídas no estudo foram provenientes de 170 crianças e adultos jovens com idade entre 1-21 anos, procedentes de sete estados brasileiros (RJ, SP, BA, GO, MS, PB, PE), e isentos, ao diagnóstico, de tratamento prévio para leucemias. As amostras de aspirados de MO e/ou sangue periférico (SP) foram encaminhadas ao nosso laboratório no Centro de Pesquisas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, para testes diagnósticos e para pesquisas de novos marcadores imuno-moleculares no período de 2001 a 2007. Estas amostras nos foram enviadas juntamente com dados pessoais de identificação, demográficos e clínicos de cada paciente. Todas as informações pessoais foram mantidas em sigilo e utilizadas apenas pelos investigadores envolvidos no estudo.

Por todo exposto acima, utilizamos como critérios de inclusão: leucemia linfoblástica aguda de linhagem T; idade (1-21 anos); ausência de tratamento quimioterápico antes do diagnóstico; período de recebimento das amostras de 2001-2007. Foram incluídas 4 amostras que representam exceções destes critérios de inclusão. Estas amostras pertencem a uma família com 2 irmãs acometidas por LLA-T e seus pais antes do período eletivo deste estudo. Todas as informações clínico-demográficas avaliadas no estudo foram enviadas ao nosso laboratório através do preenchimento de uma ficha de encaminhamento, que se encontra nos Anexos.

A autorização para utilização destas amostras em pesquisas foi solicitada ao responsável legal da criança/ adolescente, através da assinatura de um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE). O projeto foi devidamente aprovado em 14 de

maio de 2007 pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do INCA sob o número de protocolo 107/06. A cópia da carta de aprovação do CEP e o TCLE se encontram nos Anexos.

#### **4.1.2- Procedimentos iniciais**

Foram analisadas amostras de SP e/ou aspirados de MO dos pacientes descritos. Estas amostras foram coletadas em tubo *vacutainer* esterilizado (5,0 -10,0 ml) com anticoagulante EDTA, e 4 lâminas com esfregaços de MO e/ou SP foram enviadas para a realização da análise morfológica. As amostras de MO e/ou SP, tiveram seu imunofenótipo caracterizado pela citometria de fluxo multiparamétrica. Parte das amostras estava congelada a -195°C em tanque de N<sub>2</sub> líquido, o que possibilitou as análises moleculares nos casos mais antigos.

Ao chegar ao laboratório, às amostras de MO e SP são analisadas através de morfologia para avaliação de infiltração de blastos na MO e avaliação dos critérios de diagnóstico de LLAs descritos na literatura [48]. A análise morfológica inicial foi feita pela coloração convencional por May-Grünwald-Giemsa.

Todas as amostras de MO e SP foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min (centrífuga *Jouan C422*, rotor fixo), para retirada e congelamento de 1,0 a 2,0 ml de plasma. Após a retirada do plasma, a amostra restante foi, então, submetida à separação celular.

**Técnica de separação por Ficoll-Hypaque-Hystopaque®-** Após a retirada do plasma, a amostra restante foi diluída com meio RPMI e homogeneizada, a etapa inicial consistia na separação celular para obtenção das células mononucleares, baseada em gradiente de centrifugação através de Ficoll-Hypaque-Hystopaque® (densidade 1077). Todo o conteúdo da amostra diluída foi cuidadosamente depositado em tubos *falcon* de 15,0 ml, contendo *Ficoll-Hystopaque®*, na proporção de 1,0: 3,0 ml de amostra diluída e centrifugados a 1500 rpm por 25 min. Após a centrifugação forma-se um anel na interfase do tubo, contendo as células mononucleares. Este anel foi recolhido com pipeta *Pasteur* e transferido para um novo

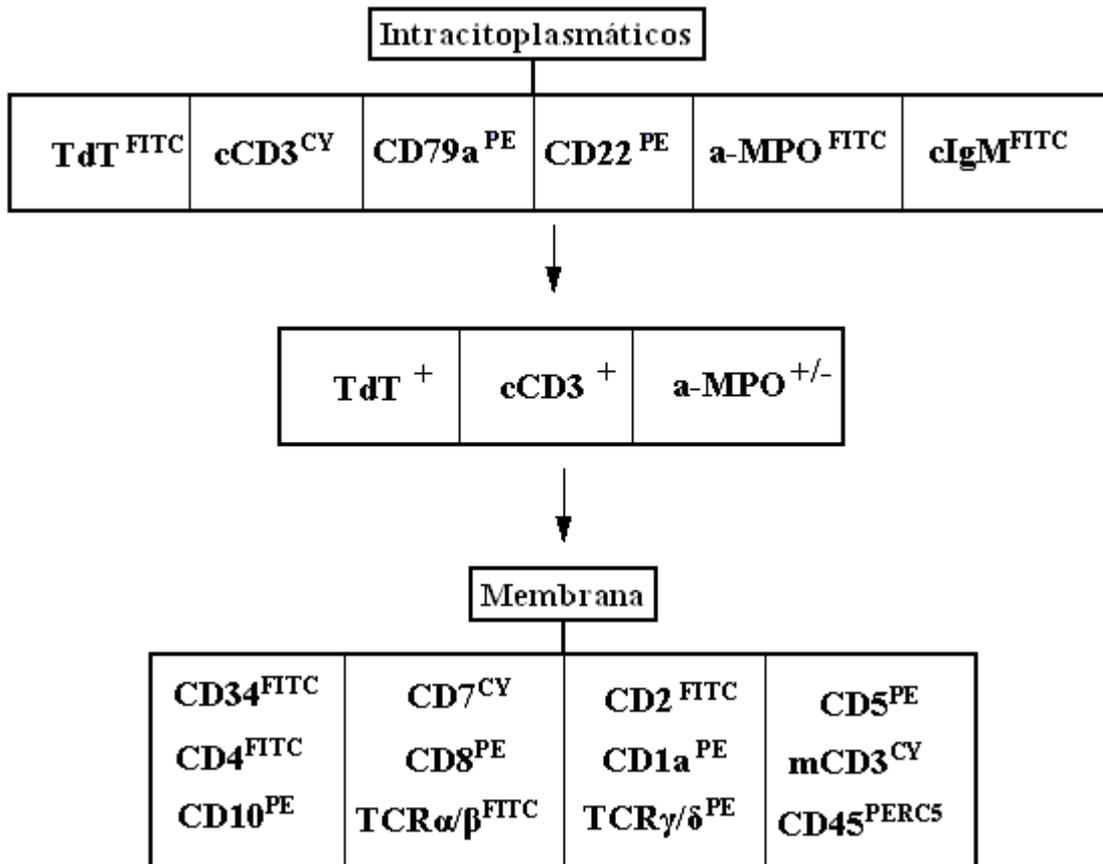
tubo; o volume foi novamente completado com RPMI para 10,0 ml, o tubo foi homogeneizado e centrifugado por 5 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2,0 ml de RPMI. A viabilidade celular foi avaliada através da coloração pelo azul de tripano e as células foram observadas e contadas em câmara de *Newbauer*. As células mononucleadas foram então distribuídas na concentração de  $1,0-1,6 \times 10^6$ / ml para realização da imunofenotipagem.

#### **4.1.3- Imunofenotipagem**

As células foram colocadas em tubos *Facs* apropriados, para leitura no citômetro de fluxo, em concentração de  $10^6$  células e incubadas durante 30 min com 10,0  $\mu$ l do anticorpo primário. As incubações foram feitas com duplas ou triplas associações de anticorpos monoclonais (AcMo) específicos marcados com diferentes fluorocromos (fluoresceína ou ficoeritrina) e que estão sumarizados no fluxograma abaixo. A aquisição e análise dos casos se processaram no citômetro de fluxo, seja no Epics-Coulter® ou no FacScan®, Becton Dickinson, existentes no setor, onde foram contadas  $10^4$  células por cada tubo. Para as análises citofluorimétricas foi utilizado um painel com os AcMos listados no fluxograma abaixo. Estes AcMos foram adquiridos com diversos fabricantes como Coulter, Immunotech, Becton-Dickson, Pharmigen e Dako. A metodologia de marcação está descrita abaixo.

No estabelecimento dos critérios de positividade para cada AcMo, adotamos o valor mínimo de 20,0 % das células analisadas. Os marcadores de células precursoras como aMPO, CD34 e TdT, por serem muito específicos e sensíveis, foram considerados positivos quando os valores excederam 10,0 % das células analisadas.

**Fluxograma esquemático dos AcMos utilizados na caracterização das neoplasias de célula T:**



**Técnica para marcação intracitoplasmática-** Ao tubo contendo as células separadas foram acrescentados 500,0  $\mu$ L de solução de lise *FACS Lysing Solution*<sup>®</sup> (Becton Dickinson). O tubo foi agitado repetitiva e vigorosamente e incubado por 15 min, à temperatura ambiente e protegido da luz. O tubo foi centrifugado por 5 min a 1500 rpm e o sobrenadante foi desprezado. Foram adicionados 500,0  $\mu$ l de solução detergente (*TWEEN 20*), para permeabilizar a membrana celular, e esta solução foi homogeneizada. Procedeu-se nova centrifugação por 5 min a 1500 rpm, o sobrenadante foi desprezado e então os AcMos intracitoplasmáticos foram acrescentados em combinações de acordo com fluorocromo conjugado (PE, FITC ou PerC5). A partir dos resultados desta marcação intracitoplasmática, as amostras categorizadas como de célula T foram submetidas a um segundo painel, desta vez

de membrana, que também está descrito no fluxograma acima. Esta segunda marcação foi usada para definição da maturação celular e dos subtipos das LLAs-T de acordo com os critérios EGIL [25].

**Técnica para marcação de membrana celular-** Adicionou-se ao tubo contendo as células separadas (5,0-15,0 µl) de cada AcMo, em simples, duplas ou triplas associações, conjugados com FITC, PE e PerC5. O tubo foi homogeneizado e incubado por 20 min, a temperatura ambiente e protegido da luz. Foram acrescentados 500,0 µl de PBS em cada tubo, o tubo foi centrifugado por 5 min a 1500 rpm e o sobrenadante foi descartado. Nos casos onde o AcMo não era conjugado a nenhum fluorocromo, foram adicionados 2,5 µl de um segundo anticorpo conjugado a FITC ou PE, constituindo a segunda camada e incubou-se por 20 min. As células foram ressuspensas em 500,0 µl de PBS para serem analisadas no citômetro de fluxo.

Além disso, 1,0 ml das amostras foi retirado para a realização das extrações de RNA e DNA. Em seguida, alíquotas de 500,0-1500,0µl (estes volumes podem variar de acordo com a quantidade de amostra que foi recebida) foram criopreservadas com soro fetal bovino e 10,0 % de DMSO, proporcionando o estoque adequado (mantendo a viabilidade celular) e seguro a -195°C em tanques contendo N<sub>2</sub> líquido.

## **4.2) TESTES MOLECULARES**

### **4.2.1- Extração de RNA total**

Anteriormente à extração do RNA, propriamente dita, fez-se à lise das células nas amostras de SP e/ou MO. Procedimento para lise das hemácias: Acrescentou-se 500,0 µl de solução de lise e homogeneizou-se invertendo; incubou-se por 10 min a temperatura ambiente (25°C); depois se centrifugou a 12500 rpm (usa-se centrífuga não-refrigerada, centrífuga

*ependorf 5415D*, rotor fixo) por 10 min; após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e iniciou-se a extração a partir do *pellet* de células que permaneceu no tubo. Foi, então, extraído RNA total destas amostras através do protocolo descrito pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen). Para a extração, acrescentou-se 1000,0 µl de Trizol ao *pellet* de células, homogeneizou-se com a pipeta e incubou-se por 5 min à temperatura ambiente. Adicionaram-se, então, 200,0 µl de clorofórmio, pipetou-se vigorosamente por alguns segundos e incubou-se por 3 min à temperatura ambiente. Depois as amostras foram centrifugadas à 12500 rpm por 15 min à 4°C (centrífuga *ependorf 5402*, rotor fixo). Após a centrifugação, retirou-se a fase de cima (transparente) que é onde está o RNA e transferiu-se para um tubo novo. A retirada da fase de cima foi feita com o máximo de cuidado para que não houvesse contaminação com as fases de baixo compostas por proteína e DNA respectivamente. A esse tubo novo com a solução contendo RNA adicionaram-se 500,0 µl de álcool isopropílico e pipetou-se repetidamente. Incubou-se por 10 min à temperatura ambiente. Depois se centrifugou a 12500 rpm por 10 min à 4°C (centrífuga *ependorf 5402*, rotor fixo). Descartou-se, então, o sobrenadante e lavou-se o precipitado (RNA) com 1000,0 µl de etanol 75,0 %. Centrifugou-se a 12500 rpm por 10 min à 4°C (centrífuga *ependorf 5402*, rotor fixo). Retirou-se o máximo possível de sobrenadante para secagem do precipitado, e acrescentaram-se 20,0 µl de água DEPC. Pipetou-se para homogeneizar e incubou-se por 10 min a 60°C. Após a extração o RNA foi conservado à -80°C até o seu uso nas reações de síntese de cDNA.

#### **4.2.2- Quantificação do RNA**

O RNA extraído foi então quantificado. Para tanto se utilizou um espectrofotômetro (*NanoDrop1000*), que possuía um programa específico para quantificação de RNA, neste programa o fator de diluição foi ajustável, a unidade de concentração foi ng/µl, as

absorbâncias utilizadas foram de 260 nm e 280 nm. Para a realização da quantificação utilizou-se 1,0 µl de RNA. A concentração do RNA já é dada de modo automático pela máquina, de acordo com o programa pré-existente.

#### 4.2.3- Tratamento do RNA com DNase

O tratamento do RNA foi feito com o kit *DNA-I Amplification Grade* (Invitrogen) a partir de 3,0-5,0 µg de RNA total. Acrescentou-se 1,0 µl de tampão (*10X DNase-I reaction buffer*) e 0,8 µl de DNase (*DNase-I reaction grade*), sendo que o volume final desta solução tem que ser 9,0 µl, assim, quando foi necessário, acrescentou-se água DEPC. Deixou-se na bancada à temperatura ambiente por 15 min. Subseqüentemente, adicionou-se 1,0 µl EDTA 25,0 mM e incubou-se à 65°C por 15 min. Após esse procedimento pode ser iniciada a síntese de cDNA.

#### 4.2.4- Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita a partir de 3,0-5,0 µg de RNA total seguindo o protocolo do kit "*First- Strand cDNA Synthesis Kit*" (Amersham). Protocolo utilizado: Transcreveu-se de 3,0-5,0 µg de RNA total; colocou-se a amostra de RNA em um *eppendorf RNase free* e adicionou-se água *RNase free* (DEPC), realizou-se esse procedimento quando fez-se necessário completar a solução até o volume adequado (Quadro 2). Aqueceu-se a solução de RNA a 65°C por 10 min e depois se refrigerou no gelo. Acrescentaram-se 1,0 µl da solução de DTT e 1,0 µl do oligonucleotídeo apropriado, nesse caso pd(N)<sub>6</sub> (oligo randômico). Homogeneizou-se bem a enzima *Bulk first-strand reaction mix*, depois ela foi adicionada à solução de RNA com DTT e oligonucleotídeo. O volume de enzima usado está na Quadro 2. Pipetou-se bastante o mix que está no *eppendorf* e depois se incubou à 37°C por 1 h. Neste

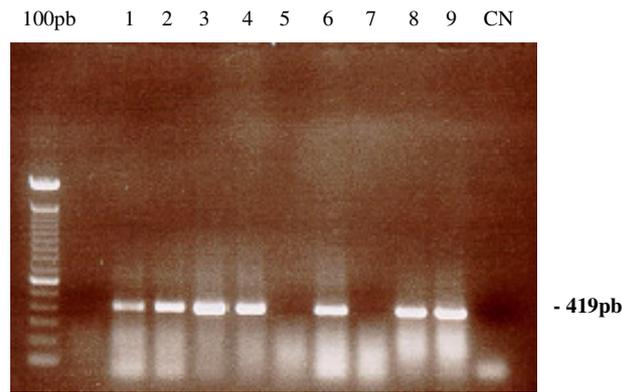
ponto o cDNA já estava pronto, e foi mantido refrigerado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após a síntese, os cDNAs foram testados através de PCR para verificar a expressão do gene constitutivo *GAPDH*.

**Quadro 2:** Volumes dos reagentes utilizados na síntese de cDNA, de acordo com o volume final da reação.

Bulk first-strand reaction mix	Oligo	Solução de DTT	RNA	Volume final da reação
11,0 $\mu\text{l}$	1,0 $\mu\text{l}$	1,0 $\mu\text{l}$	20,0 $\mu\text{l}$	33,0 $\mu\text{l}$
5,0 $\mu\text{l}$	1,0 $\mu\text{l}$	1,0 $\mu\text{l}$	8,0 $\mu\text{l}$	15,0 $\mu\text{l}$

#### 4.2.5- PCR do gene *GAPDH*

Para testar a funcionabilidade dos cDNAs realizou-se uma reação de RT-PCR para verificar a expressão do gene constitutivo *GAPDH*. As condições da reação foram: para 20,0  $\mu\text{l}$  de volume final; 3,0  $\mu\text{l}$  de cDNA; 200,0  $\mu\text{M}$  de concentração final de dNTP; 0,5  $\mu\text{M}$  de concentração final dos oligonucleotídeos; tampão para PCR 10X; concentração de 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 1,0 unidade da enzima Taq polimerase. Os ciclos e as temperaturas da reação foram: desnaturação inicial à  $94^{\circ}\text{C}$  por 3 min; temperatura de desnaturação  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 s; temperatura de anelamento  $60^{\circ}\text{C}$  por 60 s; temperatura de extensão  $72^{\circ}\text{C}$  por 45 s; e depois de 35 ciclos uma extensão final à  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 min. A sequência dos oligonucleotídeos do *GAPDH* é a seguinte: *Senso*- 5' TGACCCCTTCATTGACCTCA 3' e *Anti-senso*- 5' AGTCCTTCCACGATACCAA 3'. A reação de PCR foi revelada através de gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio. Na Figura 12 somente os casos 5 e 7 foram negativos para o gene *GAPDH*, ou seja, os seus cDNAs não foram considerados funcionais.



**Figura 12:** Gel de agarose revelando PCR do gene *GAPDH*. Os números de 1 a 9 são produtos de PCR para identificação do gene *GAPDH*, esses produtos se originaram a partir de amostras de pacientes com LLA-T. O controle negativo (CN) é simplesmente uma alíquota de água.

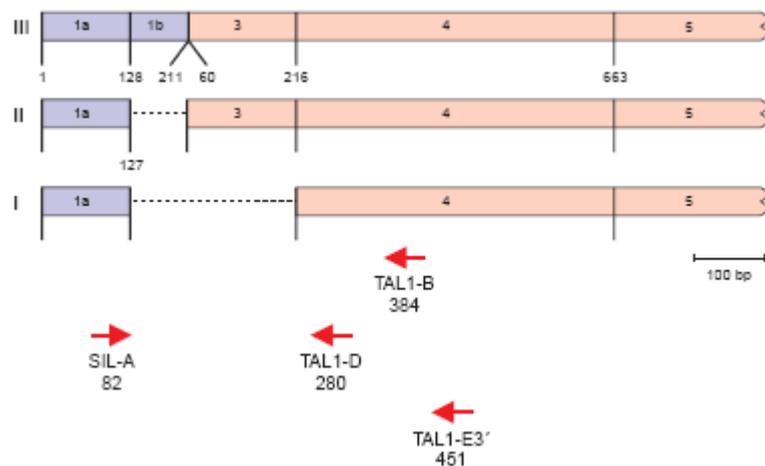
#### 4.2.6- Reações de RT-PCR

**Para o rearranjo *SIL-TALI*:** Foi realizada padronização das condições ideais para a realização da técnica de RT-PCR, como concentração de  $MgCl_2$ , temperatura de anelamento e ciclagem de acordo com os critérios do protocolo *BIOMED-1 Concerted Action* [49]. Foram feitas algumas adequações e a padronização final foi a seguinte: para um volume final de 20,0  $\mu$ l; 3,0  $\mu$ l de cDNA; 200,0  $\mu$ M de concentração final de dNTP; 0,5  $\mu$ M de concentração final dos oligonucleotídeos; tampão para PCR 10X; concentração de 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; 1,0 unidade da enzima Taq polimerase. Os ciclos e as temperaturas da reação foram: desnaturação inicial à 95°C por 3 min; temperatura de desnaturação 94°C por 30 s; temperatura de anelamento 68°C por 60 s; temperatura de extensão 72°C por 60 s; e depois de 35 ciclos uma extensão final à 72°C por 5 min. Realizou-se uma primeira reação com os oligonucleotídeos *SIL-A* e *TALI-B*, e, posteriormente, realizou-se um *Nested*, a partir do produto da primeira reação, com os oligonucleotídeos *SIL-A* com *TALI-D* (a seqüência dos oligos se encontra na Quadro 3). Após a adequação da técnica essas reações foram utilizadas para identificação do rearranjo *SIL-TALI* nas amostras de LLA-T recebidas pelo laboratório. A revelação da reação de PCR foi feita através de gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio.

**Quadro 3:** Seqüência dos oligonucleotídeos usados nos RT-PCRs para a identificação do transcrito *SIL-TALI* (Modificada de *Leukemia 1999*) [49].

Oligos	Posição 5' (tamanho pb)	Seqüência 5'-3'
<i>SIL-A</i>	82 (19)	TCCCGCTCCTACCCTGCAA
<i>TALI-B</i>	384 (18)	CGCGCCAGTTCGATGAC
<i>TALI-D</i>	280 (18)	CCGCGTCCCGTCCCTCTA

Os casos positivos podem exibir três tipos de transcritos diferentes devido à ocorrência de *splicings* alternativos (tipo I= 111 pb, o do tipo II= 267 pb, e o do tipo III= 351 pb). A positividade foi considerada quando pelo menos um dos três *splicings* alternativos estava presente, sendo que todas as diferentes combinações entre os *splicings* são possíveis. Na figura 13 pode-se verificar como ocorrem os três *splicings* alternativos para este rearranjo.



**Figura 13:** Splicings alternativos gerados pela combinação das regiões rearranjados dos genes *SIL* e *TALI*. (*Leukemia 1999*) [49]. Nesta figura identificamos os três tipos principais de transcritos *SIL-TALI* originados pela ocorrência de splicings alternativos entre os éxons destes dois genes. A presença de qualquer um destes transcritos é considerada como positividade para a fusão.

**Para detectar a expressão do gene *HOX11L2*:** Esta reação se processou de acordo com os critérios descritos por Mauvieux L e cols [50]. A padronização final foi a seguinte:

para um volume final de 50,0 µl; 3,0 µl de cDNA; 200,0 µM de concentração final de dNTP; 1,0 µM de concentração final dos oligonucleotídeos; tampão para PCR 10X; concentração de 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1,0 unidade da enzima Taq polimerase. Os ciclos e as temperaturas da reação foram: desnaturação inicial à 95°C por 5 min; temperatura de desnaturação 95°C por 30 s; temperatura de anelamento 61°C por 60 s; temperatura de extensão 72°C por 60 s; e depois de 35 ciclos uma extensão final à 72°C por 5 min. Realizou-se a reação com os oligonucleotídeos *HOX11L2-F* e *HOX11L2-R*, sendo que as seqüências destes oligos se encontram descritas na Quadro 4. Estas reações foram utilizadas para identificação da expressão do gene *HOX11L2* também nas amostras de LLA-T recebidas pelo laboratório. A revelação da reação deste RT-PCR foi feita através de gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio.

**Quadro 4:** Seqüência dos oligos usados nos RT-PCRs para a identificação da expressão do gene *HOX11L2*.

Oligos	Tamanho em pb	Seqüência 5'-3'
<i>HOX11L2-R</i>	20	GCCCAAGCGTAAGAAGCCGC
<i>HOX11L2-F</i>	20	AGCGCTTTTCCAGCTCGCAG

#### 4.2.7- Extração de DNA para realização dos PCRs do *NOTCH1*

O método de sal não utiliza fenol-clorofórmio e é ideal para sangue fresco ou congelado, bem como material obtido dos esfregaços de SP e/ou MO.

No início do procedimento adicionou-se TLH (tampão de lise de hemácias) previamente gelado em um volume 3,5 vezes o volume total de sangue homogeneizou-se bem e se refrigerou em um recipiente com gelo por pelo menos 30 min. Posteriormente, centrifugou-se por 20 min a 6000 rpm numa temperatura de 4°C (se possível), a seguir, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 300,0 µl de TLH, a fim de retirar o

excesso de hemácias junto aos leucócitos. Homogeneizou-se até que o *pellet* estivesse solto e limpo, subseqüentemente, centrifugou-se por 10 min a 6000 rpm.

O procedimento seguiu com a ressuspensão do *pellet* em 300,0 µl de TLN (tampão de lise de núcleo), dissolveu-se completamente o *pellet* e em seguida adicionaram-se 1,5 µl de SDS 10,0 % e 1,0 µl de proteinase K, homogeneizou-se para posterior incubação durante a noite a temperatura de 56°C. Após a incubação adicionou-se 60,0 µl de NaCl 5,0 M e centrifugou-se por 30 min numa rotação de 6000 rpm a 4°C. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi retirado e passado para um novo tubo onde se adicionou em torno de 900,0 µl de etanol absoluto que tornou o DNA insolúvel provocando sua precipitação. Houve homogeneização vertendo o tudo e se incubou por 30 min a -80°C.

Em seguida foi centrifugado por 30 min numa rotação de 1000 rpm a uma temperatura de 4°C e então o etanol absoluto foi dispensado e se acrescentou 100,0 0µl de etanol 70,0 % (que teve a função de retirar o excesso do sal), foi centrifugado novamente por 5 min com uma rotação de 10000 rpm (4°C).

O procedimento foi encerrado com o descarte do etanol 70% e a adição de 30,0-50,0 µl de TE (10mM Tris pH 8,0; 1,0 mM EDTA Na<sub>2</sub>) ou água mili-Q autoclavada para posterior incubação por 30 min a 68°C, O armazenamento da solução resultante foi feito a 4°C (em geladeira).

#### **4.2.8- Quantificação do DNA**

Após a extração do DNA, realizou-se a quantificação deste. Para tanto se utilizou um espectrofotômetro (*NanoDrop1000*), que possuía um programa específico para quantificação de DNA, neste programa o fator de diluição foi ajustável, a unidade de concentração foi ng/µl, as absorbâncias utilizadas foram de 260 nm e 280 nm. Para a realização da

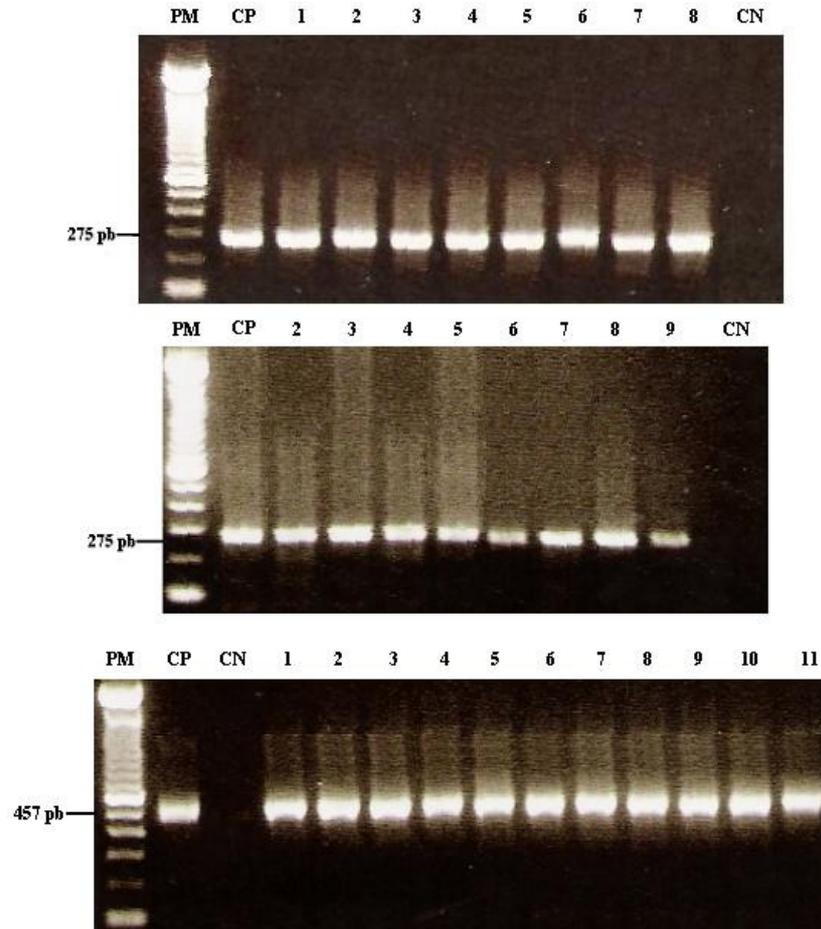
quantificação utilizou-se 1,0 µl de DNA. A concentração do DNA foi dada de modo automático pela máquina, de acordo com o programa pré-existente nesta.

#### **4.2.9- PCRs para a amplificação do *NOTCH1***

Os éxons amplificados foram o 26, 27 e 34, de acordo com critérios do protocolo utilizado por Weng AP e cols [44]. Sendo que estes éxons continham 3 domínios: HD (heterodimerização), PEST (domínio polipeptídico rico em prolina, glutamina, serina e treonina) e TAD (domínio de transativação), onde se localizavam as possíveis mutações do gene em estudo. Para o domínio HD foram necessários 3 PCRs, sendo que todos eles exigiam *Nested*, sendo assim houve um total de 6 PCRs para amplificação completa deste domínio. No caso do domínio PEST realizaram-se um total de 3 PCRs (um com *Nested* e um simples). E para o TAD foram 2 PCRs, sendo que o segundo foi *Nested* do primeiro. Deve-se considerar que na literatura, os domínios PEST e TAD são ditos como sendo único por se localizarem ambos no éxon 34 e chamados em conjunto simplesmente de PEST. A Figura 14 ilustra através de um gel os resultados dos PCRs para o *NOTCH1*, domínios HD e PEST (PEST e TAD). Todas as seqüências dos oligonucleotídeos específicos para cada domínio foram listadas na Quadro 5.

**Quadro 5:** Seqüência dos oligos usados nos PCRs para a amplificação dos domínios do gene *NOTCH1* (*Science 2004*) [45].

<b>Oligos</b>	<b>Seqüência 5'-3'</b>
<b>Domínio HD</b>	
<i>HD-A</i>	AGCCCCCTGTACGACCAGTA
<i>HD-B</i>	CTTGCGCAGCTCCTCCTC
<i>HD-C</i>	GACCAGTACTGCAAGGACCA
<i>HD-D</i>	TCCTCGCGGCCGTAGTAG
<i>HD-E</i>	GTGCTGCACACCAACGTG
<i>HD-F</i>	GAGGGCCCAGGAGAGTTG
<i>HD-G</i>	GCACACGGCCAGCAGATGAT
<i>HD-H</i>	CGCCGGGTCTCACTCAC
<i>HD-I</i>	GTGGCGTCATGGGCCTCA
<i>HD-J</i>	TAGCAACTGGCACAAACAGC
<i>HD-L</i>	CATGGGCCTCAGTGCCT
<i>HD-M</i>	GCACAAACAGCCAGCGTGTC
<b>Domínio PEST</b>	
<i>PEST-A</i>	GCAGCATGGCATGGTAGG
<i>PEST-B</i>	AACATGTGTTTTAAAAAGGCTCCTC
<i>PEST-C</i>	AAACATCCAGCAGCAGCAAA
<i>PEST-D</i>	CACAGGCGAGGAGTAGCTGTG
<i>PEST-E</i>	GTGACCGCAGCCCAGTTC
<i>PEST-F</i>	AAAGGAAGCCGGGGTCTC
<b>Domínio TAD</b>	
<i>TAD-A</i>	AGACTGGCCCACCTCGTCTCT
<i>TAD-B</i>	GCTCTCCACTCAGGAAGCTC
<i>TAD-C</i>	CGTCTCTCCCACCTGCCTGT
<i>TAD-D</i>	CTGAGCTCACGCCAAGGT



**Figura 14:** Géis de agarose 1,5% ilustrando alguns dos resultados dos PCRs do *NOTCH1*. O primeiro gel é correspondente ao domínio HD, o segundo ao PEST e o terceiro ao TAD. PM= peso molecular; CP= controle positivo; CN= controle negativo, e os números de 1 a 11 representam os casos.

#### 4.2.10- DHPLC na detecção inicial das mutações do *NOTCH1*

A detecção de mutações nos éxons 26, 27, e 34 do *NOTCH1* foi executada através de PCRs submetidos à desnaturação por *denaturing high pressure liquid chromatography* (DHPLC) que usou um sistema de análise de fragmentos por ondas de DNA, sendo o aparelho equipado com um cartucho de DNASep HT.

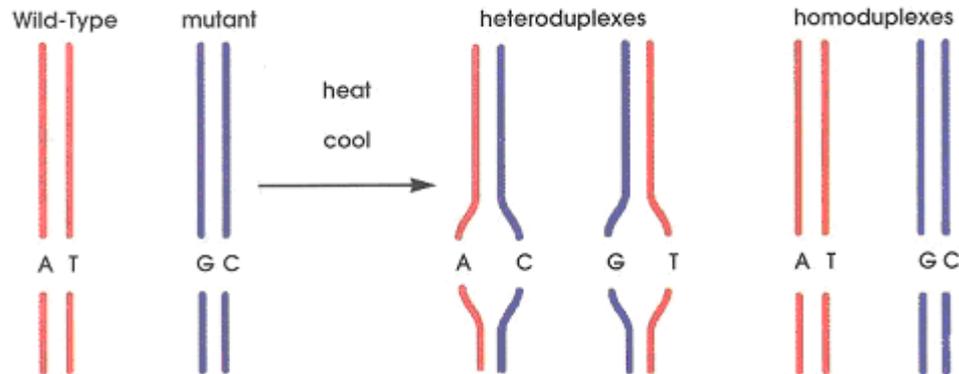
Os Amplicons para a análise de mutações foram gerados através de combinações dos oligonucleotídeos citados acima. Antes da análise por DHPLC, os produtos gerados pelos *Nesteds* dos PCRs foram desnaturados à 95°C por 5 minutos e passaram por um *ramp*

gradativo que reduziu a temperatura até 40°C usando, para tanto, um termociclador. O objetivo foi permitir a formação de homo e heteroduplexes nas amostras em heterozigose para um alelo mutante (Figura 15).

Os fragmentos gerados pelos PCRs (15,0-30,0 µl por a amostra) foram injetados no cartucho de DNASep HT para a análise. Os produtos foram eluídos em uma taxa de fluxo constante de 1,5 ml/min com um gradiente linear de acetonitrila determinado pelo software de *Navigator (Transgenomic)* baseado no tamanho e no conteúdo GC dos amplicons. O gradiente foi produzido combinando o tampão acetato de 0,10 M (TEAA) (pH7) (*Transgenomic*) e o tampão B (0,10 M TEAA com 25,0 % acetonitrila) (*Transgenomic*).

Os perfis de eluição dos fragmentos de DNA, monitorados pelo sistema UV de detecção, foram usados para produzir cromatogramas. Os picos de homo e heteroduplexes foram detectados entre o pico de injeção inicial, produzido por nucleotídeos residuais e por oligonucleotídeos em reação, e pelo de estágio de lavagem (pico de saída).

Os perfis de anelamento para os produtos dos *Nesteds*, variando de 276 a 452 pares de base, foram construídos usando o *Navigator Software*. Conseqüentemente, o seqüenciamento direto foi executado em algumas das amostras com os cromatogramas que indicam as espécies que eluíram antes do homoduplex normal.



**Figura 15:** Formação de homo e heteroduplex através da reação de *ramp*. Quando o produto da PCR pertence a uma amostra que não apresenta mutação, as fitas senso e anti-senso do *amplicon* são totalmente complementares e, neste caso, esta fita é chamada de homoduplex. Quando o paciente é heterozigoto para a mutação a fita mutante senso e anti-senso não formam apenas o homoduplex, mas também o heteroduplex através do reanelamento da desnaturação da fita selvagem e da fita mutada como é mostrado na figura.

#### 4.2.11- Seqüenciamento direto para detecção apurada de mutações do *NOTCH1*

Quando a análise por DHPLC sugeriu a ocorrência de mutações, o passo subsequente foi analisar estas amostras por seqüenciamento direto. Para tanto os amplicons gerados pelos PCRs do gene *NOTCH1* foram purificados, sendo que esta etapa se realizou utilizando-se o kit *GFX DNA and GEL Band Purification (GE Healthcare)*. O resultado desta purificação foi corrido o em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo para, assim, assegurar a presença de DNA íntegro e efetivamente purificado. Subseqüentemente submeteram-se essas soluções de DNA purificado a uma reação específica no termociclador com o seguinte programa: 95°C por 20 s, 50°C por 15 s, e 60°C por 1 min sendo repetido em 25 ciclos. Nesta reação utilizaram-se 5,0 µl do purificado, adicionando-se a este 4,0 µl de solução para seqüenciamento (*DYEnamyc<sup>TM</sup> ET Dye Terminator Cycle Sequency Kit for MegaBace DNA*

*Analysis Systems, Amersham Biosciences*) e 1,0 µl de oligonucleotídeo com concentração de 5,0 mM.

O produto gerado pela reação acima foi, então, precipitado utilizando-se 1,0 µl de acetato de amônia, acrescido de 27,5 µl de etanol absoluto. Esta solução foi centrifugada por 30 min a 13200 rpm. Descartou-se o sobrenadante, acrescentando-se, posteriormente, 150,0 µl de etanol 70,0 %. Procedeu-se nova centrifugação por 15 min a 13200 rpm. O sobrenadante resultante foi descartado e realizou-se completa secagem do *pellet* a 95°C por 3 min em banho seco. Na última etapa ressuspendeu-se o *pellet* em 10 µl de tampão de corrida próprio do *Kit MegaBace (Formamide Loading Buffer)*.

Os reagentes usados nas reações de PCR e de precipitação estavam de acordo com o tipo de seqüenciador utilizado para análise, sendo no nosso caso, pertencentes ao kit *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Premix For MegaBACE DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences)*. Os eletroferogramas gerados pelo seqüenciador foram analisados através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, a fim de se identificar ou não a ocorrência de mutações na seqüência do DNA.

### 4.3) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para descrição dos dados foi efetuada análise descritiva da distribuição das variáveis do estudo, através da determinação de medidas de tendência central e de dispersão para as variáveis contínuas, e de distribuições de freqüência para as variáveis categóricas.

Na análise bivariada, foram exploradas as relações entre diagnóstico e *status* do CD10, *status* do *SIL-TAL1*, expressão do *HOX11L2*, e *status* do *NOTCH1*. A significância estatística entre os diferentes grupos estudados foi calculada utilizando o teste do Qui-quadrado com os intervalos de confiança de 95,0 %. A magnitude de associação entre as diferentes alterações

moleculares estudadas foi determinada usando *odds ratios* (OR). O *p* valor  $\leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Foi efetuada análise através do método de Kaplan Meyer usado para estimar a sobrevida em 36 meses nos casos de LLA-T de acordo com cada alteração (CD10, *SIL-TAL1*, *HOX11L2* e *NOTCH1*). Considerou-se como desfecho (falha) todos os casos de óbito ocorridos durante o período de seguimento. Os indivíduos que permanecerem vivos ao final do período de seguimento foram considerados como censura. Todas as análises foram feitas utilizando o pacote estatístico SPSS (*SPSS version 13.0 Inc, Chicago, IL, USA 2004*).

## 5. RESULTADOS

### 5.1) ANÁLISES DE FREQUÊNCIAS

#### 5.1.1- Características Clínico-demográficas das Amostras

No presente estudo, foram analisados 170 casos de LLA-T, provenientes de pacientes com idade entre 1 e 21 anos, e dois indivíduos sadios (pai e mãe pertencentes à família). As principais características clínico-demográficas destas amostras estão descritas na Tabela 1. Observamos que para os pacientes do estudo houve uma média de idade de 9,14 anos; predominância do sexo masculino (77,1 %) com uma proporção de homens em relação a mulheres de 3,4: 1; 63,5 % com a cor da pele definida como não-branca (Tabela 1). A respeito da contagem leucocitária (leucometria) verificamos que em 45,9 % das amostras ela foi inferior ou igual a  $50 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ; o alargamento de mediastino ocorreu em 35,3 % dos casos, e o aumento dos linfonodos em 30,0 % deles (Tabela 1). Quanto à origem regional, 42 pacientes eram procedentes da região sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo), 22 da região centro-oeste (Goiás e Mato Grosso do Sul) e, a grande maioria, 106 eram do nordeste do país (Bahia, Pernambuco e Paraíba).

**Tabela 1:** Características demográficas e clínico-laboratoriais da coorte analisada.

<i>Características das LLAs-T</i>	<i>Grupo Total n (%)</i>
<b>Idade (anos)</b>	
0-9	90 (52,9)
10-21	80 (47,1)
<b>Sexo</b>	
Masculino	131 (77,1)
Feminino	39 (22,9)
<b>Cor da Pele</b>	
Branca	62 (36,5)
Não-branca	108 (63,5)
<b>Aumento de Linfonodos</b>	
Sim	51 (30,0)
Não	83 (48,8)
Na	36 (21,2)
<b>Alargamento de Mediastino</b>	
Sim	60 (35,3)
Não	72 (42,4)
Na	38 (22,3)
<b>Leucometria (<math>\times 10^3/\text{mm}</math>)</b>	
$\leq 50$	78 (45,9)
51-100	26 (15,3)
$>100$	66 (38,8)
<b>Imunofenótipo*</b>	
CD1a <sup>+</sup>	49 (28,8)
CD1a <sup>-</sup>	113 (66,5)
Na	8 (4,7)
<b>Status do CD10</b>	
CD10 <sup>+</sup>	56 (32,9)
CD10 <sup>-</sup>	98 (57,6)
Na	16 (9,4)
<b>EGIL**</b>	
T-I	12 (7,1)
T-II	34 (20,0)
T-III	49 (28,8)
T-IV	67 (39,4)
Na	8 (4,7)
<b>Total</b>	<b>170 (100)</b>

**Observações:** \* Dos 170 casos, 16 não tiveram análise do *status* do CD10. \*\* Em toda a coorte, 8 dos 170 casos não foram classificados de acordo com os critérios EGIL; Na= corresponde aos casos não avaliados.

### 5.1.2- Análises dos Imunofenótipos

As análises de imunofenótipo foram realizadas em todos os 170 casos, os resultados deste método foram usados não só para a definição da linhagem envolvida na doença, como também para a avaliação do *status* de dois antígenos destacados neste trabalho, CD1a e CD10. Além disso, a partir do padrão de expressão dos antígenos cCD3, CD7, CD5, CD2, CD4, CD8, CD1a e mCD3 procedemos à classificação das células T em estágios maturativos de acordo com os critérios EGIL.

A avaliação dos marcadores imunofenotípicos demonstrou que o antígeno CD10 foi positivo em 36,4 % dos 154 casos analisados; enquanto o CD1a<sup>+</sup> respondeu por 28,8 % das 162 amostras analisadas (Tabela 2). A respeito da maturidade celular houve uma predominância (39,4 %) de células que exibiam o subtipo T-IV, caracterizado pela combinação CD1a<sup>-</sup>/mCD3<sup>+</sup>.

É importante ressaltar que a classificação das LLAs-T, em níveis maturativos, deve ser feita através da combinação de positividade e negatividade entre determinados antígenos. Este comentário se faz pertinente ao compararmos os resultados do subtipo T-IV da classificação EGIL descrito na Tabela 1 com os dados de mCD3<sup>+</sup> da Tabela 2. A diferença encontrada será devidamente discutida no momento oportuno.

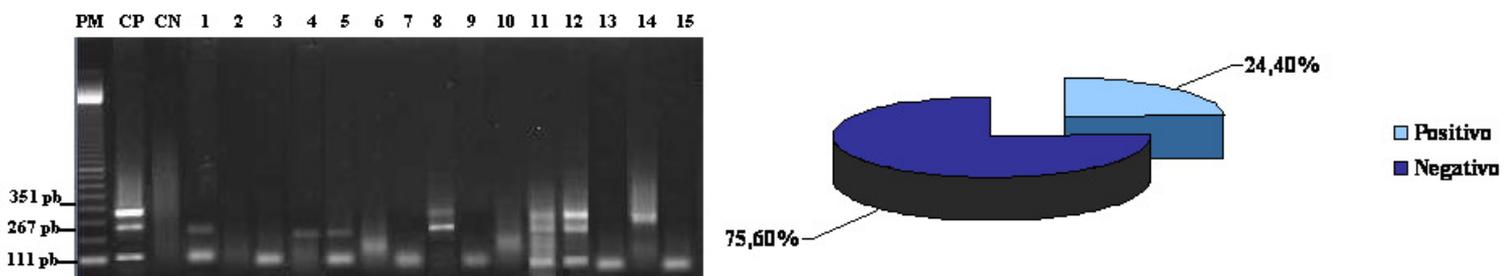
**Tabela 2:** Resultados dos testes imunofenotípicos.

<i>Marcadores</i>	<i>n +</i>	<i>n Total</i>	<i>%</i>
<i>TdT<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup></i>	81	123	65,9
<i>CD7<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup></i>	18	128	14,1
<i>CD1a<sup>+</sup></i>	49	162	28,8
<i>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></i>	74	139	53,2
<i>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup></i>	12	139	8,6
<i>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></i>	26	139	18,7
<i>mCD3<sup>+</sup></i>	69	162	42,6
<i>CD10<sup>+</sup></i>	56	154	36,4

Abreviações: CD= *cluster differentiation*; n = número de amostras; n+= número de amostras positivas.

### 5.1.3- Frequência do Rearranjo *SIL-TALI*

Neste estudo, 168 casos foram analisados por RT-PCR quanto à presença do rearranjo *SIL-TALI*, destes 41 foram positivos (24,4%) conforme distribuição na figura 16.



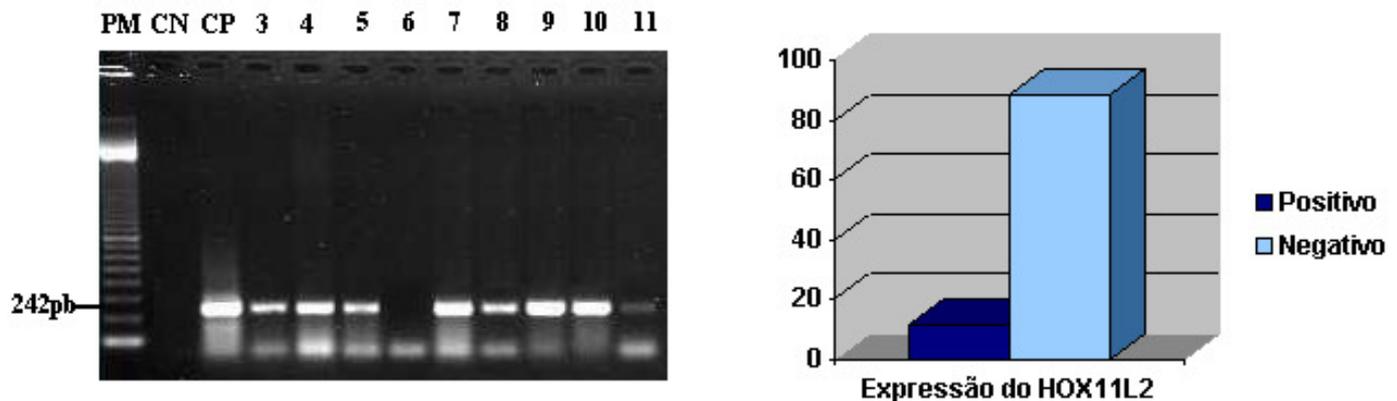
**Figura 16:** Ilustração dos resultados do *SIL-TALI* com gel de alguns dos 41 casos analisados e gráfico dos resultados percentuais. PM= peso molecular; CP= controle positivo; CN= controle negativo e os números representam alguns dos casos. No controle positivo podemos identificar três bandas de tamanho distinto, elas representam os *splicings* alternativos possíveis entre os éxons dos genes *SIL* e *TALI*. É importante ressaltar que a presença de uma única banda é suficiente para que o caso seja considerado *SIL-TALI*+.

Como dito anteriormente, a positividade para o *SIL-TALI* foi considerada quando ocorria pelo menos um dos três tipos de *splicing* possíveis. Nesta coorte encontramos amostras onde coexistiam os três tipos de *splicings* (n= 7); em 8 delas haviam dois tipos de

transcritos (4 casos exibindo os tipos I e II, 1 com os transcritos I e III, e 3 com os tipos II e III); e em 26 amostras observamos a ocorrência de somente um tipo (15 casos com o tipo I, 9 com o do tipo II, e 2 casos com o transcrito III).

#### 5.1.4- Presença do Gene *HOX11L2*

Para a análise qualitativa da presença do *HOX11L2*, foram testadas 148 amostras devido à disponibilidade de cDNA da coorte. A expressão gênica anômala foi detectada em 17 casos (11,5 %), alguns dos casos *HOX11L2*<sup>+</sup> estão representados na Figura 17.

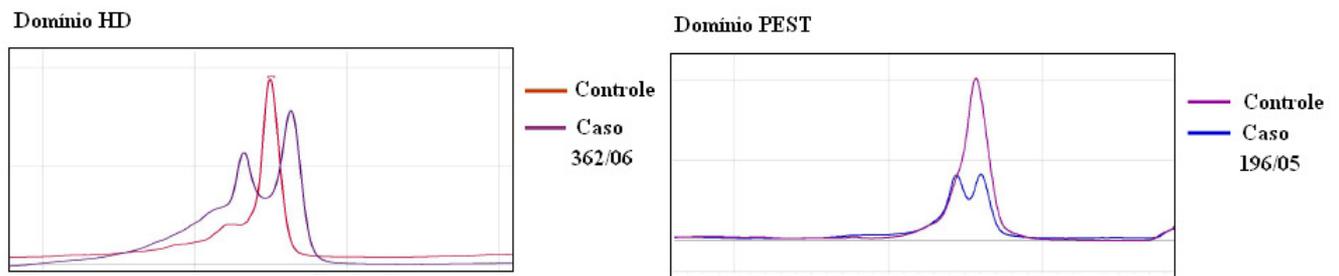


**Figura 17:** Ilustração dos resultados do *HOX11L2* com gel de agarose 1,5% com alguns dos 148 casos analisados e gráfico dos resultados percentuais. PM= peso molecular; CP= controle positivo; CN= controle negativo e os números representam casos.

#### 5.2) MUTAÇÕES DO *NOTCH1*

O rastreamento em busca de mutações no gene *NOTCH1* foi realizado em 68 amostras desta coorte, e se mostrou uma análise consideravelmente laboriosa. Primeiramente, foram realizadas amplificações dos DNAs para os domínios HD e PEST, representando 11 reações para cada caso, necessárias para o completo rastreamento dos éxons 26, 27 e 34. A partir dos

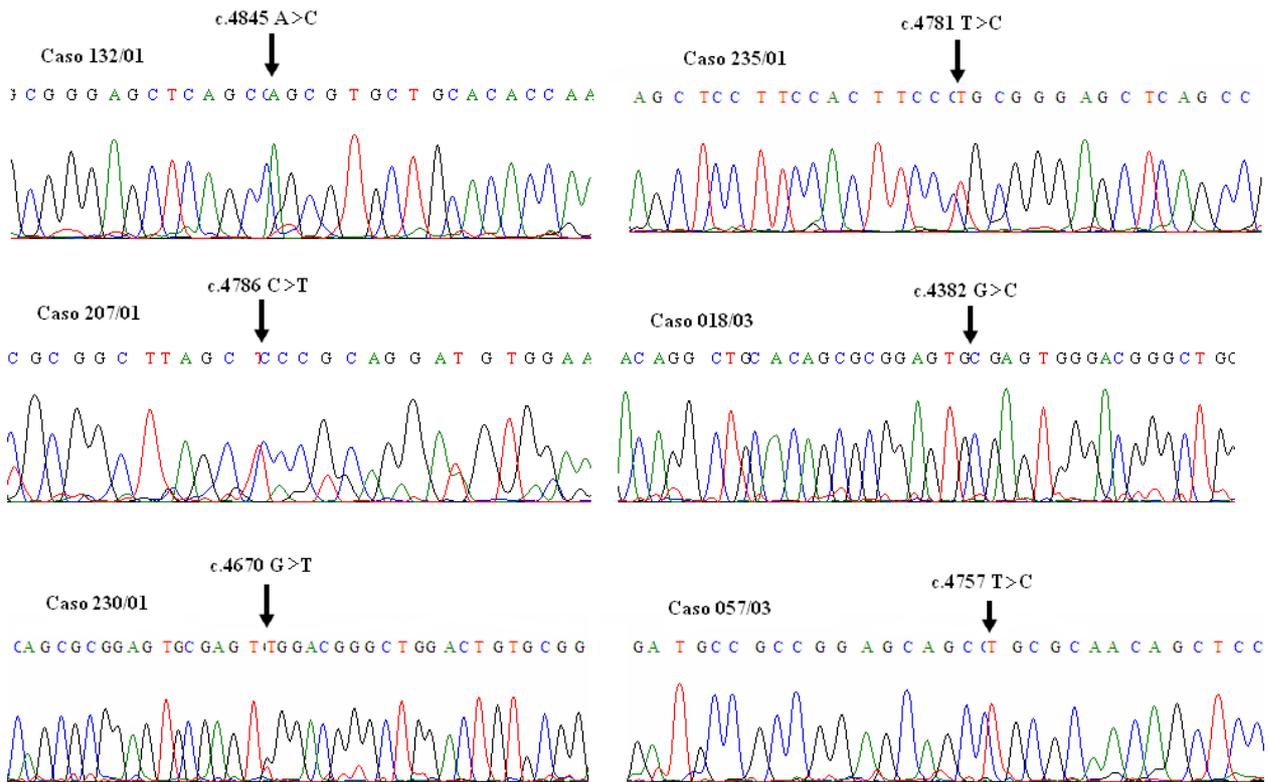
produtos amplificados a análise passou, então, a ser feita através de corrida no DHPLC, exemplos do perfil das curvas geradas por este método estão demonstrados na Figura 18.



**Figura 18:** Curvas do DHPLC ilustrando mutações do *NOTCH1* nos domínios HD e PEST. No primeiro quadro em vermelho está o controle sem alteração e em roxo o caso com o domínio HD mutado, no segundo quadro em roxo está o controle sem mutação e em azul o caso com mutação no PEST. As diferenças entre o perfil das curvas dos controles para a dos casos é que sugere a presença de alteração.

Com a conclusão dos processos descritos acima, identificamos mutações no *NOTCH1* em 56 (82,4 %) dos 68 casos. Analisando separadamente cada domínio, observamos que mutações exclusivas do domínio HD corresponderam a 16,2 % (n= 11), 8,8 % (n= 6) ocorreram somente no PEST, e 57,4 % (n= 39) acometeram ambos os domínios.

A técnica de seqüenciamento direto foi realizada apenas para o domínio HD, pois por problemas técnicos, os outros domínios (PEST e TAD) não puderam ser seqüenciados. As mutações identificadas por esta técnica estão ilustradas na figura 19.



**Figura 19:** Eletroferogramas ilustrando algumas mutações no domínio HD do *NOTCH1*. Nesta figura todos os eletroferogramas indicam mutações pontuais identificadas no domínio HD, onde ocorreram trocas simples de bases nitrogenadas (apontadas pelas setas).

### 5.3) DESCRIÇÃO DA FAMÍLIA

Dentro desta análise de mutações do *NOTCH1*, destacamos e descreveremos com especial atenção, 4 amostras pertencentes a uma família, na qual havia duas irmãs com LLA-T e seus pais. Estas pacientes provenientes do Rio de Janeiro foram hospitalizadas, em momentos distintos, no Hospital do Câncer-I (INCA), entre os anos de 1988 e 1989, com quadro clínico de leucemia aguda. As irmãs não eram gêmeas e tinham 18 e 15 anos de idade ao diagnóstico. As amostras do SP e MO da irmã de 18 anos deram entrada em nosso laboratório no início de 1988 e da de 15 anos em meados de 1989, e diagnosticou-se LLA-T em ambas. No processo do tratamento destas pacientes, foram solicitadas amostras da família

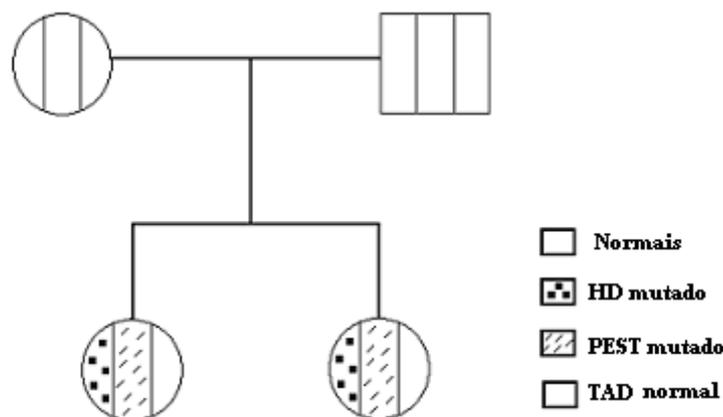
(pai e mãe) para estudos, com o objetivo de avaliar possíveis alterações genéticas familiares que explicassem a ocorrência da mesma leucemia em irmãs não-gemelares.

Todo material biológico deste período foi adequadamente congelado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Não conseguimos obter RNA das amostras congeladas para realização dos RT-PCRs do *SIL-TAL1* e *HOX11L2*, mas o DNA de todos os integrantes da família foi extraído com sucesso e analisado para mutações no *NOTCH1*.

Através da análise por DHPLC, vimos que para o domínio HD, ambas as irmãs apresentaram mutação, e os pais foram normais. No caso do domínio PEST, o mesmo foi observado, as irmãs com mutação, enquanto os pais foram normais (Figura 20). Por seqüenciamento, confirmaram-se as mutações do domínio HD detectadas inicialmente pelo DHPLC (Tabela 3).

**Tabela 3:** Descrição das mutações no domínio HD do *NOTCH1* nos casos familiares.

Amostras	Domínio	cDNA	Proteína
Irmã 1	HD	c.4735_4737delGTG	p.Val1578del
Irmã 2	HD	c.4735_4737delGTG	p.Val1578del
Pai	HD	normal	normal
Mãe	HD	normal	normal



**Figura 20:** Mutações do *NOTCH1* nos casos familiares. As divisões do heredograma representam os três diferentes domínios do *NOTCH1*: HD, PEST e TAD, respectivamente. Pelo heredograma vimos que ambas as irmãs não-gemelares possuem mutação nos domínios HD e PEST, mas não no domínio TAD. Para o domínio HD a mutação detectada por DHPLC foi confirmada por seqüenciamento como sendo a mesma para ambas as irmãs. Os pais são normais para todos os três domínios.

## 5.4) CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS

### 5.4.1- Correlação dos Marcadores com as Características Clínico-Demográficas

Fazendo uma análise dos parâmetros clínico-demográficos dos pacientes cujas amostras exibiram *SIL-TALI*<sup>+</sup>, observamos que o sexo masculino foi predominante (82,9 %), nas mesmas proporções observadas na coorte total; os indivíduos não-brancos representaram 63,4 % dos casos; a média de idade foi de 9,9 anos; e que 56,1 % das amostras exibiram contagem leucocitária superior a  $100 \times 10^3 / \text{mm}$  (Tabela 5).

Em relação às amostras com expressão positiva para o *HOX11L2*, encontramos uma média de idade de 8,9; predominância do sexo masculino que representou 94,1 % das amostras; os pacientes com a cor da pele não-branca corresponderam a 70,6 %; e a maioria dos casos apresentou uma leucometria inferior ou igual a  $50 \times 10^3 / \text{mm}$  (Tabela 5).

Nos casos com o *NOTCH1* mutado, observamos as seguintes características: uma média de idade de 9,7 anos; a maioria dos pacientes do sexo masculino 78,6 %; os pacientes com a cor da pele não-branca corresponderam a 57,4 %; e 25 casos apresentaram leucometria inferior ou igual a  $50 \times 10^3 / \text{mm}$  (Tabela 4).

A respeito dos casos *CD10*<sup>+</sup>, verificamos 7,8 anos como média de idade; sexo masculino predominante correspondendo a 83,9 % dos casos; cor da pele não-branca em 33 pacientes e leucometria inferior ou igual a  $50 \times 10^3 / \text{mm}$  em 51,8 % das amostras.

Para as amostras que expressaram *CD1a*, obtivemos como características: média de idade de 8,9 anos; predominância de indivíduos do sexo masculino (77,6 %); cor da pele não-branca em 63,3 % dos pacientes; e contagem leucocitária superior a  $100 \times 10^3 / \text{mm}$  em 24 amostras.

Quando comparadas às distribuições dos tipos de alterações genéticas com as variáveis clínico-demográficas, por meio do teste qui-quadrado, observou-se diferenças estatisticamente

significantes apenas para a correlação *NOTCH1* com idade, na qual vimos que o *NOTCH1* mutado foi prevalente acima dos 9 anos de idade ( $p= 0,015$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Caracterização dos casos em função do status do gene *NOTCH1*.

	<i>NOTCH1 normal</i> n (%)	<i>NOTCH1 mutado</i> n (%)	<i>p-valor</i> <sup>♦</sup>
<b>Idade</b>			
1-9	9 (75,0)	27 (48,2)	<b>0,015</b>
10-21	3 (25,0)	29 (51,8)	
<b>Sexo</b>			
Masculino	7 (58,3)	<b>44 (78,6)</b>	0,136
Feminino	5 (41,7)	12 (21,4)	
<b>Leucometria(x10<sup>3</sup>/mm)</b>			
≤ 50	6 (50,0)	<b>26 (46,4)</b>	0,510
50-100	1 (8,3)	9 (16,1)	
> 100	5 (41,7)	21 (37,5)	
<b>Imunofenótipo</b>			
CD1a <sup>+</sup>	1 (8,3)	22 (39,3)	0,147
CD1a <sup>-</sup>	9 (75,0)	<b>33 (58,9)</b>	
Na	2 (16,7)	1 (1,8)	
CD10 <sup>+</sup>	3 (25,0)	18 (32,1)	0,510
CD10 <sup>-</sup>	7 (58,3)	<b>32 (57,2)</b>	
Na	2 (16,7)	6 (10,7)	
<b>Total</b>	<b>12 (100)</b>	<b>56 (100)</b>	

**Observação:** Na= corresponde aos casos não avaliados; <sup>♦</sup> Análise estatística efetuada através do teste do qui-quadrado.

#### 5.4.2- Correlação dos Imunofenótipos com as Alterações Genéticas

Analizamos a correlação entre imunofenótipo e ocorrência do *SIL-TALI*, verificamos que nos casos positivos para o rearranjo houve 10 casos com CD10<sup>+</sup> e 27 com CD10<sup>-</sup> (Tabela 5). Em relação ao antígeno CD1a, este esteve presente em 15 casos com *SIL-TALI*<sup>+</sup>. Ao correlacionar o *SIL-TALI* com etapa maturativa das células T, vimos uma predominância dos dois estágios mais maduros T-III (36,6 %) e T-IV (41,5 %) (Tabela 5).

Avaliando o padrão imunofenotípico das amostras com expressão do *HOX11L2*, observamos que 52,9 % (n= 9) dos pacientes apresentaram CD10<sup>+</sup> e *HOX11L2*<sup>+</sup>, concomitantemente, e que em relação ao grau de maturação das células o estágio T-IV foi o

mais freqüente, correspondendo a 41,2 % das amostras (Tabela 5). O marcador CD1a se expressou em 29,4 % (n= 5) pacientes com *HOX11L2*<sup>+</sup>.

Sobre as amostras com o *NOTCH1* mutado, observamos que o estágio maturativo com CD1a<sup>+</sup> (T-III) prevaleceu, representando 33,9 % dos casos, e que em 18 pacientes o CD10 também foi positivo (Tabela 4).

Nas análises que correlacionam imunofenótipo com as alterações genéticas, foi encontrada diferença significativa estatisticamente somente entre o imunofenótipo CD10<sup>+</sup> e *HOX11L2*<sup>+</sup> (p= 0,057) (Tabela 5).

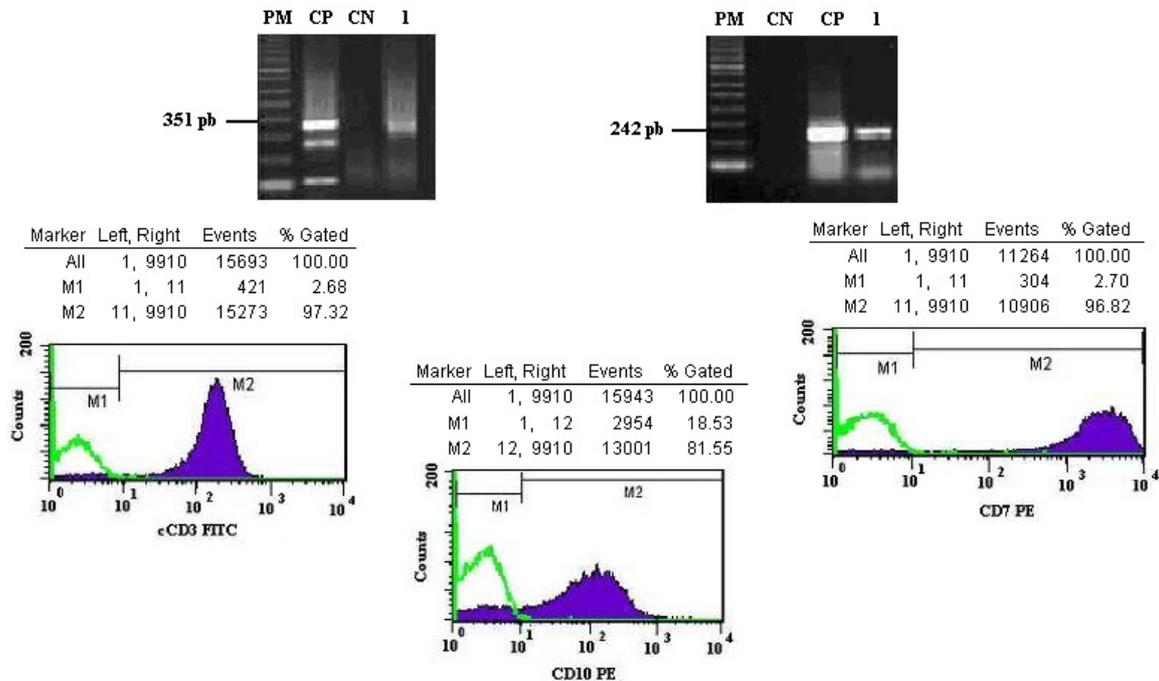
**Tabela 5:** Características demográficas e clínico-laboratoriais dos casos de acordo com o status do *SIL-TAL1* e *HOX11L2*.

	<i>SIL-TAL1</i> <sup>+</sup> n (%)	<i>SIL-TAL1</i> <sup>-</sup> n (%)	p-valor <sup>♦</sup>	<i>HOX11L2</i> <sup>+</sup> n (%)	<i>HOX11L2</i> <sup>-</sup> n (%)	p-valor <sup>♦</sup>
<b>Idade</b>						
1-9	18 (43,9)	72 (56,7)	0,106	9 (52,9)	69 (52,7)	0,595
10-21	23 (56,1)	55 (43,3)		8 (47,1)	62 (47,3)	
<b>Sexo</b>						
Masculino	<b>34 (82,9)</b>	97 (76,4)	0,258	<b>16 (94,1)</b>	104 (79,4)	0,125
Feminino	7 (17,1)	30 (23,6)		1 (5,9)	27 (20,6)	
<b>Leucometria(x10<sup>3</sup>/mm)</b>						
≤ 50	14 (34,2)	64 (50,4)	0,377	<b>8 (47,1)</b>	60 (45,8)	0,563
50-100	6 (14,6)	20 (15,7)		3 (17,6)	20 (15,3)	
> 100	<b>21 (51,2)</b>	43 (33,9)		6 (35,3)	51 (38,9)	
<b>Cor da Pele</b>						
Branca	15 (36,6)	45 (35,4)	0,518	5 (29,4)	47 (35,9)	0,407
Não-branca	<b>26 (63,4)</b>	82 (64,6)		<b>12 (70,6)</b>	84 (64,1)	
<b>EGIL</b>						
T-I	4 (9,7)	8 (6,3)	0,323	3 (17,6)	8 (6,1)	0,380
T-II	5 (12,2)	29 (22,8)		2 (11,8)	26 (19,8)	
T-III	<b>15 (36,6)</b>	32 (25,2)		5 (29,4)	37 (28,3)	
T-IV	<b>17 (41,5)</b>	50 (39,4)		<b>7 (41,2)</b>	54 (41,2)	
Na	0 (0,0)	8 (6,3)		0 (0,0)	6 (4,6)	
<b>Imunofenótipo</b>						
CD10 <sup>+</sup>	10 (24,4)	46 (36,2)	0,123	<b>9 (52,9)</b>	42 (32,1)	<b>0,057</b>
CD10 <sup>-</sup>	<b>27 (65,9)</b>	71 (55,9)		6 (35,3)	78 (59,5)	
Na	4 (9,7)	10 (7,9)		2 (11,8)	11 (8,4)	
<b>Total</b>	<b>41 (100)</b>	<b>127 (100)</b>		<b>17 (100)</b>	<b>131 (100)</b>	

**Observação:** Na= corresponde aos casos não avaliados; <sup>♦</sup> Análise estatística efetuada através do teste do qui-quadrado.

### 5.4.3- Coexistência das Alterações Genéticas

Dos 170 pacientes, apenas em um caso coexistiram *SIL-TALI*<sup>+</sup> e *HOX11L2*<sup>+</sup>, e além desta dupla positividade, este caso também apresentou CD10<sup>+</sup> (Figura 21).



**Figura 21:** Caso *SIL-TALI*, *HOX11L2* e CD10 positivos. Esta figura representa um caso bastante interessante onde encontramos a coexistência da fusão *SIL-TALI* e da expressão do *HOX11L2* (representadas nas fotos dos géis), além da expressão positiva do CD10 (demonstrada no gráfico de citometria). A ocorrência concomitante destas duas alterações em um mesmo blasto leucêmico é um evento bastante raro e não há descrição deste achado na literatura.

Conforme mostrado na Tabela 6, encontramos a maior frequência de coexistência positiva de alterações na combinação *SIL-TALI*<sup>+</sup>, *HOX11L2*<sup>-</sup> e *NOTCH1* mutado (n= 18). Em relação ao padrão imunofenotípico destes, apenas 3 tiveram CD10<sup>+</sup>, e prevaleceram T-III e T-IV (6 e 7 casos, respectivamente). A média de idade foi de 8,4 anos, 16 eram do sexo masculino e 2 feminino, com predomínio de leucometria superior a 100x10<sup>3</sup>/ mm. A cor da pele de 10 deles era não-branca.

Uma outra combinação que demonstrou um número expressivo de casos, mas sem coexistências positivas, foi *SIL-TALI*<sup>-</sup>, *HOX11L2*<sup>-</sup> e *NOTCH1* mutado (n= 26) (Tabela 6). A

imunofenotipagem dos casos com este perfil revelou 12 amostras com CD10<sup>+</sup>, e 11 apresentando o estágio maturativo caracterizado pelo CD1a<sup>+</sup> (T-III). Clínicodemograficamente, a média de idade foi de 10,3 anos, o sexo masculino representou 80,8 % dos casos (n= 21), a leucometria predominante foi inferior ou igual a 50x10<sup>3</sup>/ mm, e em relação à cor da pele, 6 indivíduos eram brancos e 20 não-brancos.

A respeito da concomitância de *HOX11L2* e *NOTCH1* mutado, constatamos que 5 casos foram *HOX11L2*<sup>+</sup> e *NOTCH1* mutado, sendo que 3 deles exibiram CD10<sup>+</sup> (Tabela 6). A média de idade foi de 6,4 anos, o estágio maturativo mais frequentes foi T-IV (2 pacientes), todos eram do sexo masculino, três pacientes eram não-brancos e a leucometria foi variada.

Foram calculadas as *odds ratios* das associações entre os tipos de alterações imunomoleculares analisadas neste estudo, não tendo sido observada nenhuma associação estatisticamente significativa (Tabela 7).

**Tabela 6:** Coexistência das alterações genéticas analisadas.

<i>Combinações das Alterações</i>	<i>n +</i>	<i>n Testado</i>	<i>%</i>
<i>SIL-TAL1+/ HOX11L2+/ NOTCH1 mut</i>	0	64	0,0 %
<i>SIL-TAL1+/ HOX11L2+/ NOTCH1 nor</i>	0	64	0,0 %
<i>SIL-TAL1+/ HOX11L2-/ NOTCH1 mut</i>	<b>18</b>	64	<b>28,1 %</b>
<i>SIL-TAL1-/ HOX11L2+/ NOTCH1 mut</i>	5	64	7,8 %
<i>SIL-TAL1-/ HOX11L2+/ NOTCH1 nor</i>	2	64	3,1 %
<i>SIL-TAL1-/ HOX11L2-/ NOTCH1 mut</i>	<b>26</b>	64	<b>40,6 %</b>
<i>SIL-TAL1-/ HOX11L2-/ NOTCH1 nor</i>	4	64	6,3 %
<i>SIL-TAL1-/ HOX11L2 na/ NOTCH1 mut</i>	4	64	6,3 %
<i>SIL-TAL1-/ HOX11L2 na/ NOTCH1 nor</i>	3	64	4,7 %
<i>SIL-TAL1+/ HOX11L2+/ NOTCH1 na</i>	1	148	0,7 %
<i>SIL-TAL1+/ HOX11L2-/ NOTCH1 na</i>	19	148	12,8 %
<i>SIL-TAL1-/ HOX11L2+/ NOTCH1 na</i>	10	148	6,8 %
<i>SIL-TAL1-/ HOX11L2-/ NOTCH1 na</i>	<b>62</b>	148	<b>41,9 %</b>

**Observação:** na= não avaliado; mut= mutado; nor= normal. As 4 amostras pertencentes à família só foram avaliadas para o *NOTCH1*, por isso não foram acrescentadas nesta análise, logo o n= 64.

**Tabela 7:** Análise das associações entre as alterações imuno-moleculares.

	<b>CD10</b> <i>OR (IC 95,0 %)</i>	<b>CD1a</b> <i>OR (IC 95,0 %)</i>	<b>SIL-TAL1</b> <i>OR (IC 95,0 %)</i>	<b>HOX11L2</b> <i>OR (IC 95,0 %)</i>
<b>CD10</b>	-	-	-	-
<b>CD1a</b>	1,96 (0,97-3,99)	-	-	-
<b>SIL-TAL1</b>	0,57 (0,25-1,29)	1,71 (0,81-3,63)	-	-
<b>HOX11L2</b>	2,78 (0,93-8,36)	1,06 (0,35-3,21)	0,15 (0,02-1,15)	-
<b>NOTCH1</b>	1,31 (0,30-5,71)	3,00 (0,59-15,0)	2,06 (0,39-10,7)	0,68 (0,07-6,87)

#### 5.4.4- Análise das Características Clínico-demográficas e Genéticas de acordo com Protocolo Terapêutico

Analisando a distribuição dos tipos de protocolo terapêuticos utilizados em função das características clínico-demográficas e genéticas foram encontradas diferenças estatísticas significativas para a cor da pele ( $p= 0,004$ ), para o imunofenótipo CD1a ( $p= 0,006$ ) e para a classificação EGIL ( $p= 0,006$ ) (Tabela 8).

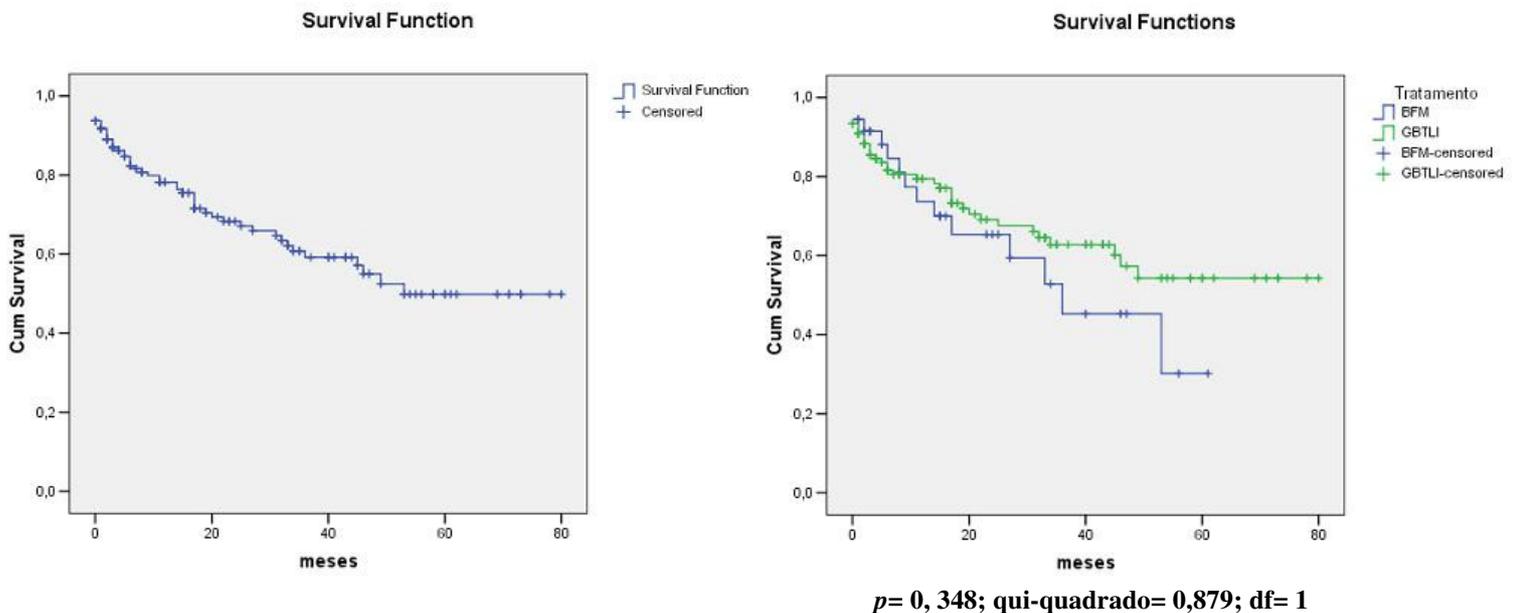
**Tabela 8:** Caracterização genética e clínico-demográfica dos casos de acordo com o protocolo terapêutico usado.

<i>Características das LLAs-T</i>	<i>Protocolo GBTLI n (%)</i>	<i>Protocolo BFM n (%)</i>	<i>Grupo Total n (%)</i>	<i>p-valor<sup>♦</sup></i>
<b>Idade (anos)</b>				
0-9	66 (50,0)	24 (63,2)	90 (52,9)	0,098
10-21	66 (50,0)	14 (36,8)	80 (47,1)	
<b>Sexo</b>				
Masculino	100 (75,8)	31 (81,6)	131 (77,1)	0,278
Feminino	32 (24,2)	7 (18,4)	39 (22,9)	
<b>Cor da Pele</b>				
Branca	41 (31,1)	21 (55,3)	62 (36,5)	<b>0,004</b>
Não-branca	91 (68,9)	17 (44,7)	108 (63,5)	
<b>Leucometria (x10<sup>3</sup>/mm)</b>				
≤ 50	61 (46,2)	17 (44,7)	63 (37,1)	0,148
51-100	17 (12,9)	9 (23,7)	30 (17,6)	
>100	54 (40,9)	12 (31,6)	77 (45,3)	
<b>Imunofenótipo*</b>				
CD1a <sup>+</sup>	31 (23,5)	18 (47,3)	49 (28,8)	<b>0,006</b>
CD1a <sup>-</sup>	95 (72,0)	18 (47,3)	113 (66,5)	
Na	6 (4,5)	2 (5,3)	8 (4,7)	
CD10 <sup>+</sup>	42 (31,8)	14 (36,8)	56 (32,9)	0,432
CD10 <sup>-</sup>	76 (57,6)	22 (57,9)	98 (57,6)	
Na	14 (10,6)	2 (5,3)	16 (9,4)	
<b>EGIL**</b>				
T-I	12 (9,1)	0 (0,0)	12 (7,1)	<b>0,006</b>
T-II	25 (18,9)	9 (23,7)	34 (20,0)	
T-III	31 (23,5)	18 (47,3)	49 (28,8)	
T-IV	58 (44,0)	9 (23,7)	67 (39,4)	
Na	6 (4,5)	2 (5,3)	8 (4,7)	
<b>Alterações Genéticas</b>				
<i>SIL-TALI</i> <sup>+</sup>	35 (26,5)	6 (15,8)	41 (24,1)	0,115
<i>HOX11L2</i> <sup>+</sup>	15 (11,4)	2 (5,3)	17 (10,0)	0,239
<i>NOTCH1 mut</i>	42 (31,8)	13 (34,2)	56 (32,9)	0,644
<b>Total</b>	<b>132 (100)</b>	<b>38 (100)</b>	<b>170 (100)</b>	

**Observações:** \* Dos 170 casos, 16 não tiveram análise do *status* do CD10. \*\* Em toda a coorte, 8 dos 170 casos não foram classificados de acordo com os critérios EGIL; Na= correspondem aos casos não avaliados. ♦ Análise estatística efetuada através do teste do qui-quadrado.

### 5.5) ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL

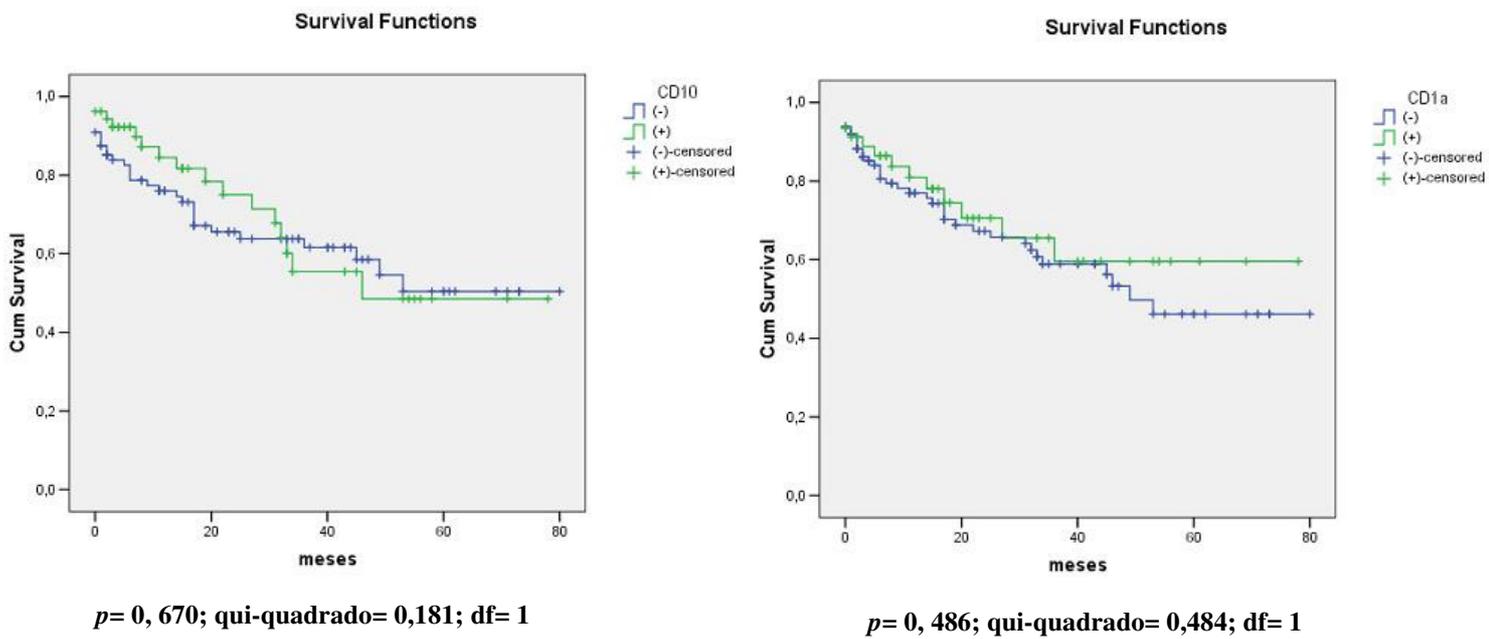
A sobrevida global em 36 meses foi de 60,8 %, no que se refere ao tipo de protocolo de tratamento utilizado, a sobrevida em 36 meses variou de 62,8 % para os pacientes tratados com o protocolo GBTLI para 45,3 % para aqueles tratados com o BFM (Figura 22).



**Figura 22:** Curvas da sobrevida global dos pacientes e da sobrevida em função do protocolo de tratamento utilizado. Pela curva em relação ao tratamento observamos que há uma melhor sobrevida para os pacientes tratados com o protocolo GBTLI (62,8 %) do que para os tratados com o BFM (45,3 %), porém sem significância estatística.

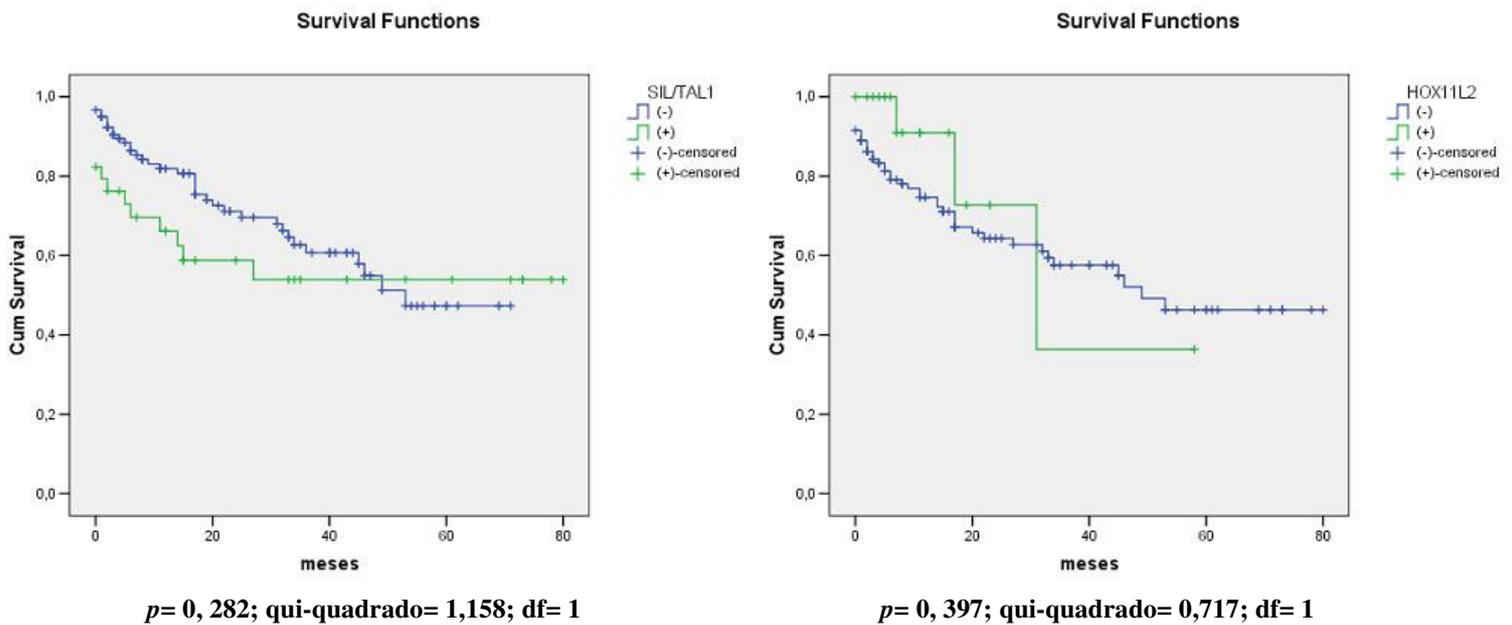
Os marcadores analisados de forma univariada para sobrevida aos 36 meses foram idade, sexo, cor da pele, leucometria, CD10, CD1a, classificação EGIL, *SIL-TAL1*, *HOX11L2*, *NOTCH1* e protocolo de tratamento (GBTLI ou BFM), não houve diferenças significativas em nenhuma das situações analisadas.

Quando se verificou a sobrevida aos 36 meses de acordo com *status* do antígeno CD10, observou-se um declínio da sobrevida de 61,6 % nos casos com CD10<sup>-</sup> para 55,4 % nos casos com CD10<sup>+</sup>, como observado na Figura 23. A respeito do *status* do CD1a, a sobrevida em 36 meses praticamente não apresentou diferença entre os pacientes com CD1a<sup>+</sup> e os com CD1a<sup>-</sup>, correspondendo a 59,6 % e 58,9 %, respectivamente (Figura 23).



**Figura 23:** Sobrevida em 36 meses de acordo com o *status* dos antígenos CD10 e CD1a. Considerando o *status* do CD10 a sobrevida foi menor para os pacientes que exibiam o CD10<sup>+</sup> (55,4 %), e em relação a *status* do CD1a, os pacientes CD1a<sup>-</sup> tiveram menor sobrevida. Em ambos as análises os resultados não foram significantes estatisticamente.

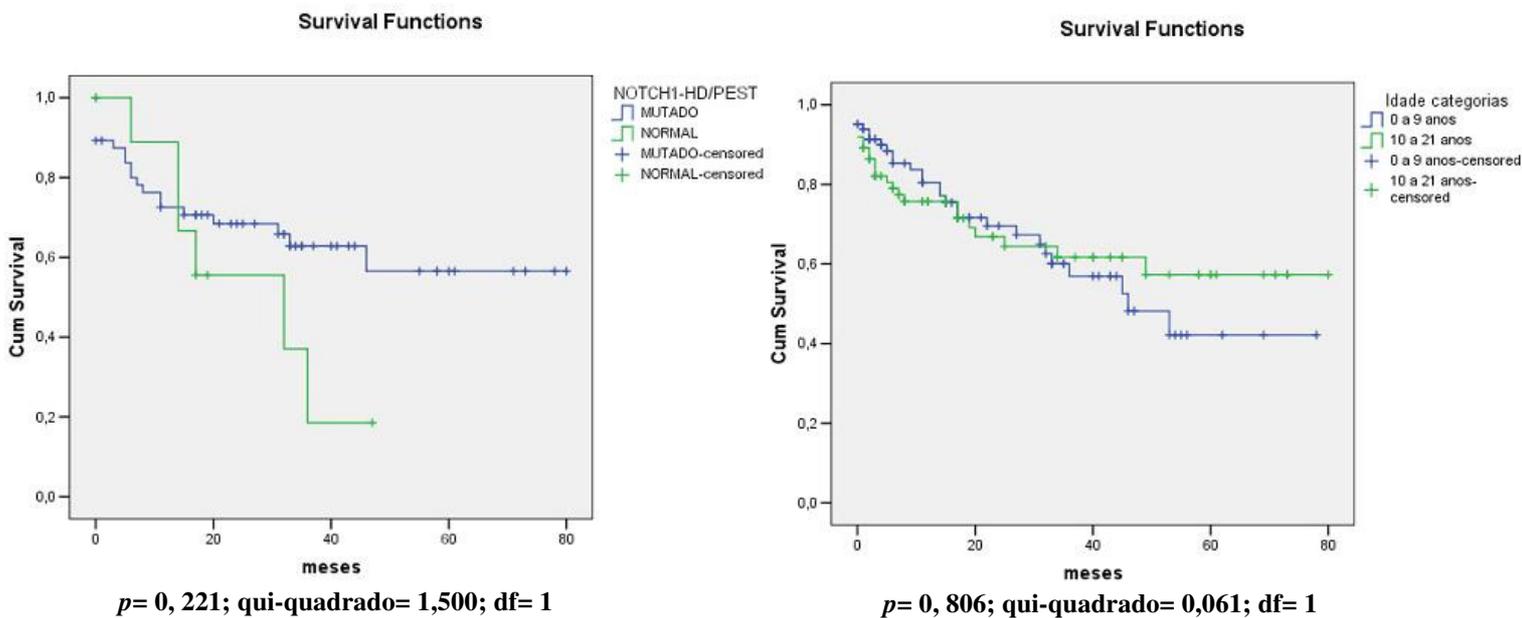
Em relação ao *status* do *SIL-TALI*, constatou-se que aos 36 meses houve uma redução da sobrevida de 60,7 % nos casos com *SIL-TALI*<sup>-</sup> para 53,9 % nos que apresentam *SIL-TALI*<sup>+</sup>. Para *status* do *HOX11L2*, a sobrevida em 36 meses se mostrou relativamente pior para os pacientes com *HOX11L2*<sup>+</sup> (36,4 %), quando comparados aos com *HOX11L2*<sup>-</sup> (57,6 %), ambas as curvas estão ilustradas na Figura 24.



**Figura 24:** Curvas de sobrevida dos pacientes de acordo com o *status* do rearranjo *SIL-TALI* e do *HOX11L2*. Analisando as curvas vemos que para em relação ao rearranjo *SIL-TALI*, os pacientes com *SIL-TALI*<sup>-</sup> (60,7 %) apresentaram melhor sobrevida do que os com *SIL-TALI*<sup>+</sup>, e no caso do *HOX11L2*, a sobrevida foi melhor para os pacientes *HOX11L2*<sup>-</sup> (57,6 %). Todos os resultados foram não significantes estatisticamente.

Sobre o perfil do *NOTCH1*, este por sua vez apresentou a maior diferença entre as sobrevidas em 36 meses, 18,5 % para os casos *NOTCH1* normais e 62,8 % para os *NOTCH1* mutados, porém como já dito, sem significância estatística (Figura 25).

Em relação à idade dos pacientes, observamos que a probabilidade de sobrevida do grupo com idade inferior ou igual a 9 anos foi de 56,9 %, enquanto para o grupo com mais de 9 anos foi de 61,7 % (Figura 25).

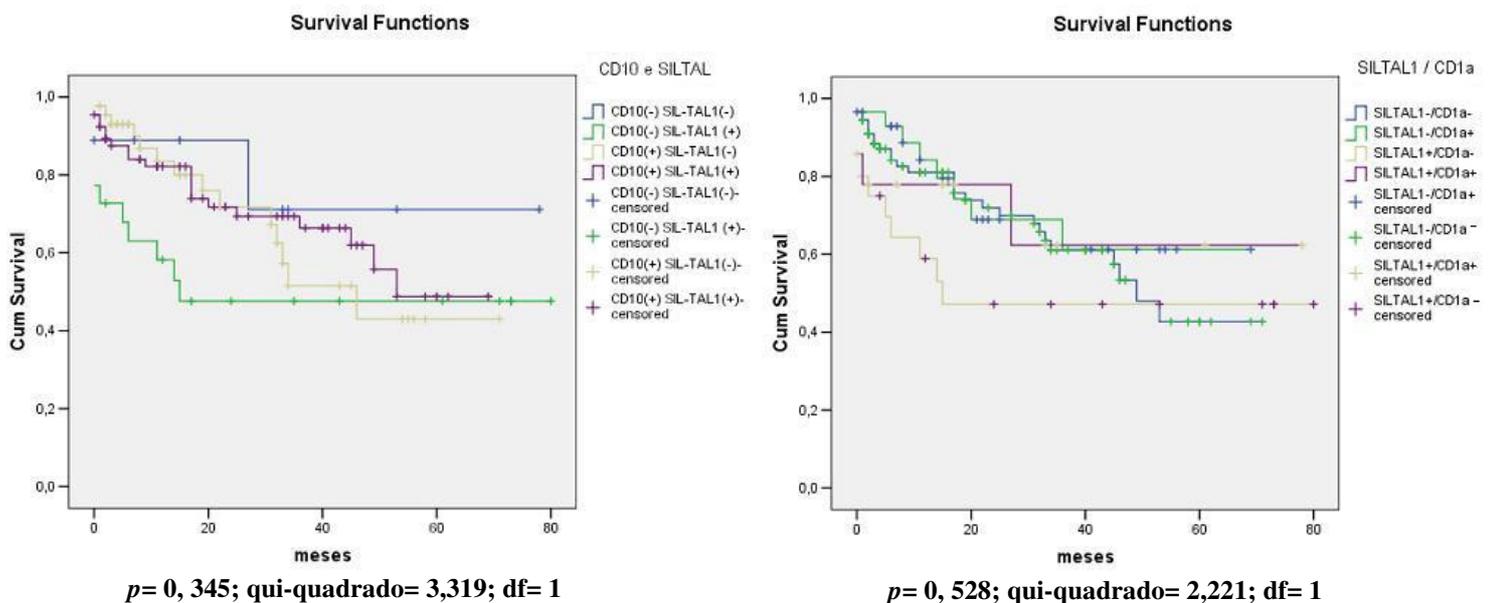


**Figura 25:** Curvas de sobrevida em função do *status* do gene *NOTCH1* e da idade. Um dos dados mais interessantes e representativos das análises de sobrevida (ainda que sem significância estatística) foi em relação ao *status* do gene *NOTCH1*. Observamos na primeira curva que os pacientes com *NOTCH1* mutado apresentaram uma sobrevida consideravelmente maior (62,8 %) do que os pacientes com *NOTCH1* normal (18,5 %). Na segunda curva observamos a sobrevida em função das duas faixas etárias do estudo, e temos que os pacientes com idade maior que 9 anos apresentaram melhor sobrevida (61,7 %) quando comparados com os pacientes com idade inferior ou igual a 9 anos (56,9 %), este resultado pode ser devido ao fato de que os pacientes com idade superior a 9 anos possuem mais freqüentemente o *NOTCH1* mutado.

Ao verificar as possíveis associações entre as diferentes alterações moleculares por meio do cálculo das *odds ratios* não foi observada significância estatística para nenhuma das associações. Entretanto a combinação entre *SIL-TALI* e CD10 sugeriu uma possível associação em nosso trabalho anterior, e ainda julgamos que seria interessante analisar a combinação entre *SIL-TALI* e CD1a. Sendo assim, avaliamos a sobrevida em 36 meses para os pacientes com as combinações descritas, ambas as curvas estão ilustradas abaixo na Figura 26.

Constatou-se que houve uma maior sobrevida para os casos CD10<sup>-</sup>/*SIL-TALI*<sup>-</sup> (71,1%), contudo, do mesmo modo que todas as outras análises, sem significância estatística. A curva desta análise está representada na Figura 26.

Sobre os pacientes que exibiram as combinações possíveis entre *SIL-TALI* e CD1a, vimos que a sobrevida para os casos com a combinação *SIL-TALI*<sup>-</sup>/CD1a<sup>-</sup> foi maior (82,6 %), porém sem valor estatisticamente significativo.



**Figura 26:** Sobrevida de acordo com as combinações entre CD10 e *SIL-TALI*, e CD1a e *SIL-TALI*. Para as combinações ilustradas nas curvas acima observamos maior sobrevida (71,1%) para os casos CD10<sup>-</sup>/*SIL-TALI*<sup>-</sup> (na primeira curva) e na segunda curva a sobrevida foi maior para os casos *SIL-TALI*<sup>-</sup>/CD1a<sup>-</sup> (82,6 %).

## 6. DISCUSSÃO

O risco de desenvolver leucemia reflete uma combinação de fatores que incluem a predisposição hereditária, as exposições exógenas a agentes com potencial leucemogênico e, eventos ao acaso. A ocorrência de alterações genéticas, que envolvam genes-chaves para o sistema hematopoiético, está diretamente associada a estes fatores [51]. Atualmente, estas alterações genéticas são identificadas como marcadores importantes no diagnóstico, para o conhecimento da etiopatogênese da leucemia, e para análises de sobrevida pós-tratamento. Dentro deste contexto, as LLAs-T se destacam por ser um subtipo leucêmico com carência de estudos consistentemente estabelecidos quando comparado às LLAs-B. Sendo assim, este estudo se mostra de grande importância ao analisar alterações genético-moleculares que podem atuar como marcadores de impacto diagnóstico e prognóstico das LLAs-T. Na caracterização completa da LLA-T, visando garantir o sucesso do tratamento, faz-se necessário um algoritmo de testes cujos resultados definam com especificidade e confiabilidade os perfis imunofenotípico e genético desta neoplasia.

Em relação aos testes possíveis para realização das análises imuno-moleculares, existe uma série de técnicas disponíveis para a detecção de anormalidades. Para a análise fenotípica, a abordagem mais indicada é uso da imunofenotipagem por citometria de fluxo. Esta técnica não só caracteriza o tipo molecular envolvido na doença, como também auxilia na determinação da etapa maturativa do processo. A imunofenotipagem também é uma ferramenta de destaque na estratificação e monitorização terapêutica. Além de identificar possíveis marcadores aberrantes de importância, como é o caso do CD10 nas LLAs-T. Pelos motivos expostos acima, esta foi uma das técnicas utilizadas em nosso estudo, já que em vários aspectos era capaz de auxiliar o cumprimento de alguns nossos objetivos.

Com o advento e a acessibilidade das técnicas genético-moleculares, houve, então, a possibilidade de se complementar a técnica imunofenotípica. A junção destes dois métodos tornou possível o estabelecimento de relações entre fenótipo e genótipo das doenças, como é o caso das leucemias. Com o objetivo de melhor caracterizar etiopatogenicamente as leucemias agudas de célula T, aliamos, no presente estudo, testes imunofenotípicos com técnicas de análises genéticas.

Entre as técnicas de rastreamento genético, destacam-se o RT-PCR, o PCR, o DHPLC e o seqüenciamento direto. Todas estas têm as suas vantagens e desvantagens, sendo, portanto, necessário o uso combinado dos diferentes métodos. O RT-PCR é bastante rápido e específico, porém, detecta somente uma alteração pontual por reação. O PCR também é rápido e simples, mas só é capaz de promover amplificação gênica, o que, em geral, não é um resultado isoladamente conclusivo, necessitando de complementação com outra técnica. O DHPLC é uma ferramenta bastante eficaz para o rastreamento de alterações em nível genômico. Contudo, é um método muito sensível, capaz de detectar pequenas “alterações” que podem não ser necessariamente uma anomalia do DNA, por este motivo é aconselhável complementar esta metodologia com o seqüenciamento. As pequenas “alterações” captadas pelo DHPLC são, na verdade, falso-positivos, que surgem devido a modificações de alguns fatores. Dentre estes fatores temos a acetagem do aparelho, a pureza dos oligonucleotídeos usados nos PCRs, e a qualidade da DNA polimerase [52]. O seqüenciamento direto é altamente específico, mas possui um custo bastante elevado e a análise dos eletroferogramas gerados é bastante trabalhosa e deve ser consideravelmente minuciosa, para que não se perca nenhum tipo de anomalia na seqüência.

A caracterização clínico-demográfica das LLAs-T, foi realizada recentemente por Paes AC e cols [53] com foco no *status* sócio-econômico da coorte analisada. Este estudo demonstrou uma média de idade de 7,4 anos; predominância de homens em relação a

mulheres de 2: 1; leucometria predominante nos casos  $>50 \times 10^3 / \text{mm}$  (26,7 %); e pacientes procedentes somente da região sudeste do país (São Paulo e Minas Gerais). E obteve como conclusões: uma maior ocorrência de LLA-T (18,0 %) na coorte brasileira estudada, quando comparado com populações européias descritas na literatura ( $<15,0$  %); e associação significativa entre ocorrência de LLA-T e baixo *status* sócio-econômico. Todas estas questões, com exceção da sócio-econômica, foram avaliadas em nosso estudo, com maior detalhamento e acrescentadas dos biomarcadores essenciais para o entendimento da performance terapêutica das LLAs-T no Brasil. Os resultados foram similares no que se refere ao perfil demográfico-clínico. Nossa coorte de estudo é mais abrangente no que diz respeito às regiões geográficas do Brasil incluindo casos das regiões sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo), centro-oeste (Goiás e Mato Grosso do Sul) e nordeste (Bahia, Pernambuco e Paraíba). Em relação ao aspecto biomarcadores, nosso estudo se difere do descrito por Paes AC e cols, por fazer uma abordagem imunofenotípica e molecular bem detalhada.

Através da imunofenotipagem, focando na questão maturativa, observamos em nosso trabalho um predomínio do estágio mais maduro da linhagem T (T-IV). Consideramos que nossas análises podem, de fato, retratar o perfil das LLAs-T no Brasil. Pois este achado sobre maturidade celular nos faz questionar se esta etapa maturativa mais avançada pode refletir a extensão da evolução clínica da doença. A tendência natural de um LLb-T é leucemizar com o passar do tempo, e sob a óptica da expressão fenotípica existe uma superposição entre LLA-T e LLb-T. Os critérios para distinção entre estas duas entidades é arbitrado em relação a quantidade de células T que infiltram a MO. Talvez com as inúmeras dificuldades de acesso ao sistema de saúde, grande parte dos nossos casos representem um estágio leucemizado dos LLbs-T. Ao comparar criticamente nossos resultados ao descrito na literatura, vimos que estes são bastante consistentes e bem representativos.

Um exemplo desta representatividade, está na nossa análise do antígeno CD10 em LLAs-T. Em artigo publicado por Béne MC e cols [33], identificou-se a presença do CD10 em em casos de LLA-T. De um modo geral, o antígeno CD10 é preferencialmente expresso em células pré-B. Nas LLAs-B é um marcador independente de bom prognóstico. Já nas LLAs-T, ele possui um papel ainda controverso, é considerado um marcador aberrante, podendo estar expresso em 30,0% dos casos. Em nossa coorte de LLAs-T encontramos resultados similares para CD10<sup>+</sup> (36,4 %).

O rearranjo *SIL-TALI* esteve presente em 24,4 % dos casos analisados neste estudo, de acordo com as estimativas esperadas entre 16,0- 26,0 % [56]. Embora não haja um consenso sobre o valor deste marcador para decisão terapêutica, o conhecimento do seu *status* é importante, para a identificação de doença residual mínima (DRM), visto que é exclusivo das LLAs de célula T. Os diferentes tipos de transcritos encontrados nos casos *SIL-TALI*<sup>+</sup>, não refletem o fenótipo da LLA-T, nem são importantes para avaliação de prognóstico. O único trabalho existente na literatura que faz uma análise destes transcritos demonstrou que dentro dos 16,0 % dos casos *SIL-TALI*<sup>+</sup>, a maioria apresentou o tipo I [57], semelhante aos nossos resultados. Contudo neste estudo não houve citação de quais eram as possíveis combinações entre os transcritos. Apesar de ser uma análise meramente descritiva, sem pretensões prognósticas, julgamos interessante fazê-la, já que estes diferentes transcritos podem ser resultantes da ação anômala das mesmas enzimas RAGs 1 e 2 que processam os rearranjos de TCR [36].

Uma das discordâncias na frequência das alterações genéticas nas LLAs-T desta coorte se refere ao gene *HOX11L2*. Diferentemente do descrito em crianças européias, nossos resultados demonstraram uma frequência inferior (11,5 %) na mesma faixa etária avaliada. Não temos ainda uma explicação para esta diferença de frequência do *HOX11L2*<sup>+</sup>, mas deve-se considerar que esta é uma comparação feita entre duas populações (européia e brasileira)

étnica e sócio-economicamente distintas. O que podemos afirmar com segurança é que as técnicas para o rastreamento foram realizadas de modo bastante preciso, e que a nossa série de casos possui um tamanho amostral bem representativo e suficiente para uma análise comparativa confiável.

Sabe-se que a via de sinalização do *NOTCH1* é de grande importância para vários estágios do surgimento e desenvolvimento de células T normais, alterações que afetem este gene são fortes candidatas para elucidar sua participação na leucemogênese. Um exemplo representativo destas alterações são as mutações que acometem o *NOTCH1*, estas são anomalias especificamente encontradas em LLAs-T humanas, quando se avalia os cânceres em vertebrados [44].

As mutações nos diferentes domínios da sequência gênica do *NOTCH1* foram identificadas como importantes marcadores nas análises de sobrevida dos pacientes com LLA-T, bem como nos estudos de etiopatogênese. No nosso estudo estas mutações foram identificadas em 82,4 % dos casos, sendo encontradas nos domínios HD (16,2 %) e/ou PEST (8,8 %) individualmente ou presentes em ambos (57,4 %). Em 2006, o trabalho realizado por Breit S e cols [58] detectou 52,2 % de mutações no *NOTCH1*, sendo 35,0 % exclusivas do domínio HD, 8,3 % do PEST e 9,0 % envolvendo ambos os domínios. Ao comparar os nossos resultados com o trabalho em questão, vimos que os valores só foram concordantes em relação às mutações exclusivas do domínio PEST. As mutações que ocorriam somente no domínio HD foram mais raras no nosso estudo, em compensação as que afetarem ambos os domínios foram mais frequentes. Estas frequências podem ser explicadas pelo tamanho amostral da nossa coorte. Portanto para que se possa confirmar estas diferenças faz-se necessário a continuação do rastreamento de mutações do *NOTCH1* no total de casos do nosso trabalho.

Outro fator que poderia ser questionado na tentativa de explicar estas frequências divergentes nas mutações seria a metodologia empregada. Nosso trabalho consistiu de um rastreamento inicial através do DHPLC para, em etapa posterior, ser confirmado por seqüenciamento direto. No entanto, a técnica de seqüenciamento foi realizada somente no domínio HD das amostras. Como mencionado anteriormente, o DHPLC é um método muito sensível, existindo a possibilidade da ocorrência de falso-positivos, sendo assim a realização da etapa de seqüenciamento se faz muito importante.

Ainda sobre a frequência de mutações do *NOTCH1*, há uma outra possível explicação para as diferenças encontradas. Como os éxons acometidos pelas mutações (26, 27 e 34) são extensos, é possível que estejamos detectando novas mutações que ainda não foram descritas a exemplo dos dados publicados por Yong-Mei Zhu e cols [59]. Neste trabalho os autores encontraram frequências divergentes devido à identificação de novas mutações no domínio PEST que ainda não haviam sido descritas nos estudos anteriores [44]. Portanto, nossos resultados preliminares necessitam de complementação para confirmar as alterações encontradas e descrever suas características no domínio PEST.

Um outro ponto dentro desta questão de excesso de mutações encontradas pelo DHPLC, é a possibilidade da ocorrência de *single nucleotide polymorphism* (SNPs) ao longo da extensão do gene *NOTCH1*. Estes SNPs são algumas vezes considerados como não patogênicos, mas podem também atuar como alterações nocivas ao funcionamento normal do gene afetado.

Sobre os casos familiares analisados para o *NOTCH1*, após fazer uma revisão na literatura, constatamos que ainda não há descrição deste tipo de análise. Sendo assim, esta parte do nosso estudo se torna bastante interessante e por isso deve ser tratada com especial atenção. Ao verificar as amostras dos pais, não encontramos nenhum tipo de alteração no gene *NOTCH1*, mas vimos que ambas as irmãs, apesar de não-gemelares, exibiram a mesma

mutação nos domínios HD e PEST. Esta concordância de resultados nos leva a hipótese de que talvez uma anomalia com predisposição genética pudesse estar associada à leucemogênese destes casos. Daí fazermos este rastreamento familiar para verificar o padrão hereditário das mutações do *NOTCH1*. Como as mutações só foram identificadas nas irmãs, mas não em seus pais, pode-se afirmar que estas alterações são somáticas. Uma questão plausível de análise seria avaliar quais as interações genético-ambientais envolvidas nestes casos.

Nas nossas análises de correlação entre os resultados referentes aos marcadores genético-moleculares e os das características clínico-demográficas não houve discordância ao já descrito na literatura [40]. Os casos *SIL-TALI*<sup>+</sup> são mais freqüentes em crianças com idade inferior a 15 anos e leucometria  $\geq 100 \times 10^3 / \text{mm}^3$ . Enquanto nos casos *HOX11L2*<sup>+</sup> são predominantes em crianças com idade inferior a 10 anos e leucometria  $\leq 50 \times 10^3 / \text{mm}^3$  [40].

Nos casos de LLA-T com *NOTCH1* mutado Breit S e cols [58] observaram que há uma maior freqüência em crianças com idade <10 anos e leucometria inferior a  $50 \times 10^3 / \text{mm}^3$ . Os resultados encontrados em nosso estudo estavam todos de acordo com os descritos na literatura, como pode se observar na Tabela 4 dos resultados.

Em relação ao CD10, foi descrito por Bash RO e cols [54] em 1993, que nas LLAs-T, quando ocorrem rearranjos que envolvem o gene *TALI*, há uma queda expressiva da expressão do CD10. Eles demonstraram que em 87,5 % dos casos com o *TALI* rearranjado não houve expressão do CD10. Em concordância com os dados do estudo descrito, observamos que o CD10 foi negativo em 65,9 % dos nossos casos com o rearranjo *SIL-TALI*.

Em 2004 verificou-se a relação concordante entre *SIL-TALI*<sup>+</sup> e os estágios maturativo com CD1a<sup>+</sup> (T-III) em 41,7% dos casos, demonstrando o predomínio deste marcador (CD1a<sup>+</sup>) imuno-molecular nas LLAs-T com a presença do rearranjo [40]. Por outro lado, Asnafi V e cols observaram a coexistência entre a expressão do gene *HOX11L2* e a presença do antígeno

CD10 em 55,0 % dos seus pacientes com LLA-T [55]. Ambas as correlações foram confirmadas nas nossas análises.

Sobre a correlação *NOTCH1* mutado e imunofenótipo, no trabalho desenvolvido por Breit S e cols [58], demonstrou-se um predomínio (79,3 %) dos casos *NOTCH1* mutado, no estágio maturativo definido pela positividade do CD1a (T-III). Nós também observamos que as mutações do gene em questão foram mais frequentes no estágio T-III, representando 33,9 % dos casos. Além disso, analisamos também a coexistência das mutações com o CD10<sup>+</sup>, e vimos que em 32,1 % dos pacientes esta combinação esteve presente. Não há na literatura descrição do *NOTCH1* associado ao antígeno CD10.

Em 2006, Yong-Mei Zhu e cols [59] realizaram um estudo similar ao nosso por investigar a ocorrência de mutações do *NOTCH1* nas LLAs-T, e também por analisar a frequência das alterações *SIL-TALI* e expressão *HOX11L2* nesta mesma neoplasia, discutindo, ainda, sobre a coexistência destas alterações entre si. Como resultados deste trabalho, sobre a coexistência das alterações, apenas 3 casos apresentaram mutação no *NOTCH1* e *SIL-TALI*<sup>+</sup>, 6 casos foram *HOX11L2*<sup>+</sup> e exibiram mutação no *NOTCH1*. Porém não se observou associação estatisticamente significativa entre as alterações. Nós encontramos um número consideravelmente maior de casos onde coexistiam o rearranjo *SIL-TALI* e as mutações do gene *NOTCH1*, havia 18 casos com este perfil. Esta diferença pode ser parcialmente explicada pela maior frequência de casos *SIL-TALI*<sup>+</sup> (24,4 %) em nossa coorte quando comparadas com o estudo comentado (14,7 %). Na combinação *HOX11L2*<sup>+</sup> e *NOTCH1* mutado, o resultado que encontramos foi o mesmo, 5 casos.

Nosso estudo avaliou ainda a coexistência das alterações avaliadas com a expressão do antígeno CD10, como já descrito em tópicos anteriores. Através de revisão bibliográfica não encontramos trabalhos que relacionassem de modo consistente o CD10 com alterações genéticas em LLAs-T, portanto este é um outro ponto de destaque em nossa discussão. Ao

avaliar a coexistência do CD10 com duas alterações genéticas, vimos que em 3 casos *SIL-TALI*<sup>+</sup> e *NOTCH1* mutado o CD10 foi também positivo, e que este antígeno também foi expresso em outros 3 casos *HOX11L2*<sup>+</sup> e *NOTCH1* mutado. O significado destas correlações na prática clínica ainda é uma incógnita, devido às divergências quanto à significância estatística para as associações da maioria das variáveis avaliadas neste estudo (CD10, CD1a, *SIL-TALI*, *HOX11L2*, e *NOTCH1*).

O cálculo das *odds ratios* de quase todas as associações entre os marcadores do estudo, não apresentou resultados estatisticamente significante. No entanto, nos casos com *NOTCH1* mutado e idade superior a 10 anos ( $p= 0,015$ ), ou *HOX11L2*<sup>+</sup> e CD10<sup>+</sup> ( $p= 0,057$ ) foi observada associação com valor significante.

Correlação significativa entre o *status* do *NOTCH1* e idade dos pacientes foi encontrada por Yong-Mei Zhu e cols [59]. Eles observaram que para os pacientes com idade superior a 18 anos, há associação significativa com o *NOTCH1* mutado ( $p= 0,0015$ ). Como nossa coorte analisada para o gene em questão possui tamanho amostral ainda reduzido, faz-se necessário realizar análises mais completas para o *status* do *NOTCH1*.

Quanto à significância da associação *HOX11L2*<sup>+</sup> e CD10<sup>+</sup> encontrada em nossa análise, houve descrição prévia desta associação na literatura realizada por Ballerini e cols, eles observaram que em 66,6 % dos casos houve a dupla-positividade para os marcadores, porém não foi demonstrado valor significante estatisticamente ( $p= 0,264$ ) [61].

Em relação à sobrevida avaliada em nosso estudo, os resultados para as variáveis implicadas na história natural das LLAs-T não demonstraram valor estatístico significante. Finalmente, futuras análises se fazem necessárias para o melhor entendimento entre as associações dos marcadores analisados e seu impacto na evolução das LLAs-T.

## 7. CONCLUSÕES

- As análises imunofenotípicas demonstraram predomínios de LLAs-T com células em estágios mais maduros (T-III e T-IV), e CD1a<sup>+</sup> (28,8 %), sendo que este marcador não exibiu valor prognóstico significativo;
- A presença do CD10 foi detectada em 36,4 % dos casos de LLA-T da coorte, porém sem valor prognóstico;
- A frequência do rearranjo *SIL-TALI* na coorte estudada foi de 24,4 %, corroborando os achados da literatura;
- A presença do gene *HOX11L2* em LLAs-T (11,5 %) foi inferior ao estimado entre 18,0 e 22,0 %;
- Foi possível estabelecer a técnica de rastreamento de mutações do *NOTCH1* pelo método do DHPLC, que apesar de muito laborioso, é bastante sensível para a identificação de mutações; não houve discordância entre DHPLC e seqüenciamento, até o momento;
- Não foi encontrado um perfil imunofenotípico preditivo da existência de uma alteração molecular específica;
- Identificamos a ocorrência simultânea de mais de uma alteração molecular na mesma amostra de LLA-T. A combinação mais comum foi entre *SIL-TALI*<sup>+</sup> e *NOTCH1* mutado, porém ao se avaliar estatisticamente, apenas a combinação *HOX11L2*<sup>+</sup> e CD10<sup>+</sup> se mostrou significativa;
- As análises de sobrevida em 36 meses sugeriram algumas tendências, mas nenhum marcador apresentou valores de significância estatística para o prognóstico, por isso é necessário dar continuidade a este estudo ampliando ainda mais as análises.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia Fundamentos e Prática. São Paulo: Editora Atheneu 2001: 15-21; 51-57; 61-65; 433-435 pp.
- 2- Hoffbrand AV, Pettit JE. Hematologia Clínica Ilustrada-Manual e Atlas Colorido. São Paulo: Editora Manole 1988.
- 3- MacDonald HR, Rolink AG. Lymphocyte development. *Current Opinion in Immunology* 2005; 17, 97-99.
- 4- Béne MC. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunology Letters* 2005; 98, 9-21.
- 5- Lécuyer E, Hoang T. *SCL*: From the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Experimental Hematology* 2004; 32: 11-24.
- 6- Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. *TAN-1*, the human homolog of the *Drosophila notch* gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991; 66: 649-661.
- 7- Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. Notch Signaling in Cancer. *Cancer Biology and Therapy* 2002; 1: 466-476.
- 8- Del Bianco C, Aster JC, Blacklow SC. Mutational and Energetic Studies of Notch1 Transcription Complexes. *J Mol Biol* 2008; 376: 131-140.
- 9- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284: 770-776.
- 10- Sjölund J, Manetopoulos C, Stockhausen MT, Axelson H. The Notch pathway in cancer: Differentiation gone awry. *European Journal of Cancer* 2005; 41: 2620-2629.
- 11- Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein LM, Aster JC, Pear WS, Bhandoola A. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nature Immunology* 2005; 6: 663-670.

- 12- Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadash T, Hardy RR, Aster JC, Pear WS. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 1999; 11: 299-308.
- 13- Weerkamp F, Luis TC, Naber BAE, Koster EEL, Jeannotte L, van Dongen JJM, Staal FJT. Identification of Notch target genes in uncommitted T-cell progenitors: no direct induction of a T-cell specific gene program. *Leukemia* 2006; 20: 1967-1977.
- 14- De La Coste A, Freitas AA. Notch signaling: Distinct ligands induce specific signals during lymphocyte development and maturation. *Immunology Letters* 2006; 102: 1-9.
- 15- Aplan PD, Begley CG, Bertness V, Nussmeier M, Ezquerra A, Coligan J, Kirsch IR. The *SCL* gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Molecular Cell Biology* 1990; 10, 6426-6435.
- 16- Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. The T-cell leukemia oncoprotein *SCL/TAL1* is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 1996; 86: 47-57.
- 17- Robb L, Elwood NJ, Elefanty AG. The *SCL* gene product is required for the generation of all hematopoiesis lineages in the adult mouse. *EMBO J.* 1996; 15: 4123-4129.
- 18- Curry JD, Smith MT. Measurement of *SIL-TAL1* fusion gene transcripts associated with human T-cell lymphocytic leukemia by real-time reverse transcriptase-PCR. *Leukemia Research* 2003; 27: 575-582).
- 19- Dear TN, Sanchez-Garcia I, Rabbitts TH. The *HOX11* gene encodes a DNA-binding nuclear transcription factor belonging to a distinct family of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4431-4435.
- 20- Uchiyama K, Otsuka R, Hanaoka K. *cHox11L2*, a *Hox11* related gene, is expressed in the peripheral nervous system and subpopulation of the spinal cord during chick development. *Neuroscience Letters* 1999; 273: 97-100.

- 21- Logan C, Wingate RJT, McKay IJ, Lumsden A. *Tlx-1* and *Tlx-3* Homeobox Gene Expression in Cranial Sensory Ganglia and Hindbrain of the Chick Embryo: Markers of Patterned Connectivity. *The Journal of Neuroscience* 1998; 18: 5389-5402.
- 22- Hornbruch A, Ma G, Ballermann MA, Tumova K, Liu D, Logan CC. A BMP-mediated transcriptional cascade involving *Cash1* and *Tlx-3* specifies first-order relay sensory neurons in the developing hindbrain. *Mechanisms of development* 2005; 122: 900-913.
- 23- Izraeli S. Leukaemia- a developmental perspective. *British Journal of Haematology* 2004; 126: 3-10.
- 24- Sandler DP, Ross JÁ. Epidemiology of Acute Leukemia in Children and Adults. *Seminars in Oncology* 1997; 24(1): 3-16.
- 25- European Group for Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) Béne MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposal for Immunological Classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995; 9: 1783-1786.
- 26- Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J of Med* 2004; 350: 1535- 1548.
- 27- Unckun FM, Sensel MG, Sun L, Steinherz PG, Trigg ME, Heerema NA, Sather HN, Reaman GH, Gaynon PS. Biology and Treatment of Childhood T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 1998; 91: 735-746.
- 28- Uyttebroeck A, Vanhentenrijk, Hagemeijer A, Boeckx N, Renard M, Wlodarska I, Vandenberghe P, Depaepe P, De Wolf-Peeters C. Is there a difference in childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia and T-cell lymphoblastic lymphoma? *Leukemia & Lymphoma* 2007; 48 (9): 1745-1754.
- 29- Jones RA, Scott CS, Katz FE, Child JA. MHC Class I and Class I-like gene product expression by malignant T cells: relationships between CD1a, HLA-ABC and f2-microglobulin. *Clin. Exp. Immunol.* 1988; 74: 454-458.

- 30- Niehues T, Kapaun P, Harms DO, Burdach S, Kramm C, Körholz D, Janka-Schaub G, Göbel U. A classification based on T cell selection-related phenotypes identifies a subgroup of childhood T-ALL with favorable outcome in the COALL studies. *Leukemia* 1999; 13: 614-617.
- 31- Greaves MF, Brown G, Rapson NT, Lister TA. Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1975; 4: 67-84.
- 32- Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 1993; 82:1052-70.
- 33- Béne MC, Faure GC and The GEIL. CD10 in acute leukemias. *Haematologica* 1997; 82: 205-210.
- 34- Consolini R, Legitimo A, Rondelli R, Guglielmi C, Barisone E, Lippi A, Cantù-Rajnoldi A, Aricò M, Conte VR, Cocito MG, Putti MC, Pession A, Masera G, Biondi A, Basso G. Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL. *Haematologica* 1998; 83: 967- 973.
- 35- Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J of Med* 2004; 350: 1535- 1548.
- 36- Rambaldi A, Biondi A. Molecular characterization of a new recombination of the *SIL/TAL1* locus in a child with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 2002; 118: 1011-1018.
- 37- Armstrong AS, Look AT. Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23: 6306-6315.
- 38- Hsu HL, Cheng JT, Chen Q, Baer R. Enhancer-Binding Activity of the tal-1 Oncoprotein in Association with the E47/E12 Helix-Loop-Helix Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 1991; 11: 3037-3042.
- 39- Bernard O, Busson-Le CM, Ballerini P, Mauchauffe M, Della VV, Monni R, Nguyen KF, Mercher T, Penard-Lacronique V, Pasturaud P, Gressin L, Heilig R, Daniel MT, Lessard M,

Berger R. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the *Hox11L2* gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 1495-1504.

40- Cavé H, Suciú S, Preudhomme C, Poppe B, Robert A, Uyttebroeck A, Malet M, Boutard P, Benoit Y, Mauvieux L, Lutz P, Méchinaud F, Grardel N, Mazingue F, Dupont M, Margueritte G, Pages MP, Bertrand Y, Plouvier E, Brunie G, Bastard C, Plantaz D, Velde IV, Hagemijer A, Speleman F, Lessard M, Otten J, Vilmer E, Dastugue N. Clinical significance of *HOX11L2* expression linked to t(5;14)(q35;q32), of *HOX11* expression, and of *SIL-TAL* fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood* 2004; 103: 442-450.

41- Grabher C, von Boehmer H, Look AT. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6: 347-359.

42- Holowiecki J. *NOTCH1* pathway: a molecular target in T cells cancer? *The Lancet* 2005; 365: 197-199.

43- Allenspach EJ, Maillard I, Áster JC, Pear WS. Notch signaling in cancer. *Cancer Biology & Therapy* 2002; 1 (5): 466-476.

44- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4<sup>th</sup>, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activation mutations of *NOTCH1* in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004; 306: 269-271.

45- Sanchez-Irizarry C, Carpenter AC, Weng AP, Pear WS, Aster JC, Blacklow SC. Notch subunit heterodimerization and prevention of ligandindependent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9265-9273.

- 46- Gupta-Rossi N, LeBail O, Gonen H, Brou C, Logeat F, Six E, Ciechanover A, Israël A. Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 34371-34378.
- 47- Hrusak O, MacDonald AP. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002; 16: 1233-1258.
- 48- Catovsky D, Matutes E, Buccheri V, Shetty V, Hanslip J, Yoshida N, Morilla R. A classification of acute leukaemia for the 1990s. *Ann Hematol* 1991, 62: 16-21.
- 49- van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 1901-1928.
- 50- Mauvieux L, Leymarie V, Helias C, Perrusson N, Falkenrodt A, Lioure B, Lutz P, Lessard M. High incidence of *Hox11L2* expression in children with T-ALL. *Leukemia* 2002; 16: 2417-2422.
- 51- Greaves M. Childhood Leukaemia. *BJM* 2002; 324: 283-287.
- 52- Kosaki K, Udaka T, Okuyama T. DHPLC in clinical molecular diagnostic services. *Molecular Genetics and Metabolism* 2005; 86: 117-123.
- 53- Paes AC, Viana MB, Freire RV, Martins-Filho AO, Taboada DC, Rocha VG. Direct association of sócio-economic status with T-cell acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia Research* 2003; 27: 789-794.
- 54- Bash RO, Crist WM, Shuster JJ, Link MP, Amylon M, Pullen J, Carroll AJ, Buchanan GR, Smith RG, Baer R. Clinical Features and Outcome of T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood With Respect to Alterations at the *TAL1* Locus: A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1993; 81: 2110-2117.

- 55- Asnafi V, Beldjord K, Libura M, Villarese P, Millien C, Ballerini P, Kuhlein E, Lafage-Pochitaloff M, Delabesse E, Bernard O, Macintyre E. Age-related phenotypic and oncogenic differences in T-cell acute lymphoblastic leukemias may reflect thymic atrophy. *Blood* 2004; 104: 4173-4180.
- 56- Delabesse E, Bernard M, Landman-Parker J, Davi F, Leboeuf D, Varet B, Valensi F, Mancintyre E. Simultaneous *SIL-TALI* RT-PCR detection on all *tald* deletions and identification of novel *tald* variants. *British Journal of Haematology* 1997; 99: 901-907.
- 57- Aplan PD, Lombardi DP, Reaman GH, Sather HN, Hammond GD, Kirsch IR. Involvement of the Putative Hematopoietic Transcription Factor *SCL* in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 1992; 79: 1327-1333.
- 58- Breit S, Stanulla M, Flohr T, Schrappe M, Ludwig WD, Tolle G, Happich M, Muckenthaler MU, Kulozik AE. Activating *NOTCH1* mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 108: 1151-1157.
- 59- Zhu YM, Zhao WL, Fu JF, Shi JY, Pan Q, Hu J, Gao XD, Chen B, Li JM, Xiong SM, Gu LJ, Tang JY, Liang H, Jiang H, Xue YQ, Shen ZX, Chen Z, Chen SJ. *NOTCH1* Mutations in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Prognostic Significance and Implication in Multifactorial Leukemogenesis. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3043-3049.
- 60- Berger R, Dastugue N, Busson M, van den Akker J, Pérot C, Ballerini P, Hagemeyer A, Michaux L, Charrin C, Pages MP, Mugneret F, Andrieux J, Talmant P, Hélias C, Mauvieux L, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Cornillet-Lefebvre P, Radford I, Asnafi V, Bilhou-Nabera C, Nguyen Khac F, Léonard C, Speleman F, Poppe B, Bastard C, Taviaux S, Quilichini B, Herens C, Grégoire MJ, Cavé H, Bernard OA. t(5;14)/*HOX11L2*-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia. A collaborative study of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). *Leukemia* 2003; 17: 1851-1857.

61- Ballerini P, Blaise A, Coniat MBL, Su XY, Zucman-Rossi J, Adam M, van den Akker J, Perot C, Pellegrino B, Landman-Parker J, Douay L, Berger R, Bernard OA. *HOX11L2* expression defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. *Blood* 2002; 100: 991-997.

## **9. ANEXOS**

### **9.1) FICHA DE ENCAMINHAMENTO**

### **9.2) CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP (INCA) E TCLE**

### **9.3) BANCO DE DADOS**

### **9.4) CURVAS DO DHPLC**

### **9.5) ELETROFEROGRAMAS**

### **9.6) APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)