**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA E PUERICULTURA**

Larissa Bueno Polis Moreira

Aumento da expressão das isoformas Ik6 e Ik10 do gene *IKZF1* ao diagnóstico e seu impacto no prognóstico da leucemia linfóide aguda da infância

**Ribeirão Preto-SP
2018**

Larissa Bueno Polis Moreira

Aumento da expressão das isoformas Ik6 e Ik10 do gene *IKZF1* ao diagnóstico e seu impacto no prognóstico da leucemia linfóide aguda da infância

Dissertação apresentada ao departamento de pediatria e puericultura da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Moreira, Larissa Bueno Polis

Aumento da expressão das isoformas Ik6 e Ik10 do gene *IKZF1* ao diagnóstico e seu impacto no prognóstico da leucemia linfóide aguda da infância. Ribeirão Preto, 2018.

95 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Scrideli, Carlos Alberto.

1. Leucemia linfóide aguda, 2. Infância, 3. *IKZF1*,
4. Isoforma 6, 5. Isoforma 10

FOLHA DE APROVAÇÃO

Larissa Bueno Polis Moreira

Aumento da expressão das isoformas Ik6 e Ik10 do gene *IKZF1* ao diagnóstico e seu impacto no prognóstico da leucemia linfóide aguda da infância

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Saúde da Criança e do Adolescente

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no laboratório de biologia molecular, localizado no Departamento de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) e com o apoio financeiro:

- verba PROEX do programa de Saúde da Criança e do Adolescente da FMRP-USP

Dedico esse trabalho a toda minha família pelo apoio incondicional, amor, união e confiança em todos os momentos. Em especial ao Lucas, nossa maior benção.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli, pelo exemplo profissional, por todo apoio, incentivo e dedicação. Obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência e pela oportunidade desse aprendizado.

A equipe do laboratório de Biologia Molecular, em especial a Rosane, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela amizade. Meu agradecimento em especial também para a Beth e para a Veridiana por todo apoio, cumplicidade e ensinamentos.

Aos meus pais pelo exemplo, dedicação, carinho e incentivo sempre.

Ao meu marido Sandro pela compreensão e apoio.

Ao meu irmão Thales por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

As minhas tias por me apoiarem e torcerem por mim incondicionalmente.

Ao Departamento de pediatria por todo apoio e auxílio.

Ao Centro Infantil Boldrini pela colaboração nesse estudo.

Ao Dr Vergílio Colturato e a Dra Maura Ikoma por serem exemplos de competência e amor pela profissão e por todos os ensinamentos.

Ao Hospital Amaral Carvalho pela oportunidade de exercer minha profissão com todo carinho, amor e dedicação.

A Uniara pela oportunidade de exercer a arte de ensinar.

A todos que contribuíram para minha formação profissional, desde a Faculdade de Medicina de Catanduva, a toda equipe de pediatria, oncologia pediátrica e hemocentro do HC-FMRP, as equipe da hematologia e TMO do Hospital Amaral Carvalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para meu crescimento profissional .

RESUMO

MOREIRA, L.B.P. **Aumento da expressão das isoformas Ik6 e Ik10 do gene *IKZF1* ao diagnóstico e seu impacto no prognóstico da leucemia linfóide aguda da infância.** . 95f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

Introdução: A leucemia linfóide aguda (LLA) "*BCR-ABL1-like*" exibe um perfil de expressão gênica semelhante ao observado em pacientes com LLA *BCR-ABL1+*. Este subtipo representa até 15% de todos os casos de LLA de linhagem B na população pediátrica e é frequentemente associado à presença de deleção total ou parcial do gene *IKZF1*. As isoformas de domínio negativo têm sido associadas a um aumento na chance de falha de resposta ao tratamento e tem sido associada com pior prognóstico. **Objetivos:** Analisar a presença de deleções do gene *IKZF1* e a expressão de suas isoformas em amostras de medula óssea ao diagnóstico de crianças com LLA por técnica simplificada e de baixo custo de RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) e avaliar a associação desta alteração com fatores clínicos, biológicos e sobrevida. **Metodologia:** Foram analisadas 137 amostras de medula óssea colhidas ao diagnóstico de crianças com LLA, sendo 100 amostras de LLA de linhagem B, 35 de linhagem T e 2 na qual não foi possível a definição do imunofenótipo, todas classificadas e tratadas segundo o protocolo GBTLI-99. A presença de deleções das isoformas do gene *IKZF1* foi analisada por técnica de RT-PCR e confirmadas por sequenciamento automático. Associação entre deleção do *IKZF1* e as variáveis idade, número de glóbulos brancos, grupo de risco, subgrupo molecular, presença de doença residual mínima e evento (recidiva ou óbito) foi analisada pelo teste exato de Fisher. Sobrevida livre de eventos, sobrevida livre de doença e sobrevida global foram avaliadas por curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank. Análise multivariada por modelo de regressão de Cox foi utilizada para testar a independência dos fatores prognósticos. **Resultados:** Deleção total ou parcial no gene *IKZF1* foi observada em 27/100 amostras de LLA B-derivada, sendo 15 evidenciando hiperexpressão das isoformas 6 ou 10, em 9 a expressão das isoformas foi de fraca intensidade e em 3 houve deleção total do gene. Nas amostras de LLA T-derivada foram observadas 3 alterações sendo 2 hiperexpressões da isoforma Ik6 e uma deleção total do gene. Presença de expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 de *IKZF1* foi associada na LLA B-derivada com pior sobrevida livre de eventos (SG), sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG)($P<0,001$). A presença de qualquer deleção do gene teve impacto apenas na SG ($P=0,003$). A sobrevida livre de eventos em 5 anos foi de $78,1 \pm 4,6\%$ versus $32 \pm 12,4\%$ ($P<0,001$), para os grupos sem e com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 forte de *IKZF1* respectivamente, com risco relativo de evento desfavorável de 6.034 (95% IC: 2,105 – 17,295) para a presença da deleção. Análise multivariada por modelo de regressão de Cox nas LLA de linhagem B mostrou que expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 foi o principal fator prognóstico independente ($P<0.001$) quando analisada em associação com idade, imunofenótipo (ausência de CD10), status da medula óssea no D28 da terapia de indução (M2/M3) e presença de DRM no D28 da indução tanto para SLE, quanto para SLD e SG. Nossos dados sugerem que o uso de técnica simplificada e de baixo custo para análise de deleções do gene *IKZF1* é capaz de detectar pacientes com maior risco de recidiva, podendo ser útil na estratificação de pacientes com LLA de linhagem B em futuros protocolos de tratamento. Estudos multicêntricos com maior número de casos são necessários para confirmação destes resultados.

Palavras-chave: leucemia linfóide aguda, infância, *IKZF1*, isoforma 6, isoforma 10.

ABSTRACT

MOREIRA, L.B.P. **Increase of the expression of the Ik6 and Ik10 isoforms of the *IKZF1* gene at diagnosis and its impact on the prognosis of childhood lymphoid leukemia.** . 95f. Dissertation (Masters Degree) - Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, 2018.

Introduction: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) "BCR-ABL1-like" exhibits a gene expression profile similar to that observed in patients with BCR-ABL1 + ALL. This subtype accounts for up to 15% of all B lineage ALL cases in the pediatric population and is often associated with the presence of total or partial deletion of the *IKZF1* gene. Negative domain isoforms have been associated with an increased chance of treatment failure and have been associated with poorer prognosis. **Objectives:** To analyze the presence of deletions of the *IKZF1* gene and the expression of its isoforms in bone marrow samples to the diagnosis of children with ALL by simplified technique and low-cost RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) and to evaluate the association of this with clinical, biological and survival factors. **Methodology:** It has been analyzed 137 bone marrow samples collected at the diagnosis of children with ALL, 100 samples of ALL B lineage, 35 of T lineage and 2 in which it was not possible to define the immunophenotype, all classified and treated according to GBTLI protocols -99. The presence of deletions of the *IKZF1* gene isoforms was analyzed by RT-PCR technique and confirmed by automatic sequencing. The association between *IKZF1* deletion and the variables age, white blood cell count, risk group, molecular subgroup, presence of minimal residual disease and event (recurrence or death) were analyzed by the Fisher exact test. Event-free survival, disease-free survival and overall survival were assessed by Kaplan-Meier curves and log-rank test. Multivariate analysis by Cox regression model was used to test the independence of prognostic factors. **Results:** Total or partial deletion in the *IKZF1* gene was observed in 27/100 samples of B-derived ALL, 15 of which showed hyperexpression of isoforms 6 or 10, in 9 the expression of the isoforms was of low intensity and in 3 there was total deletion of the gene. In the T- derived ALL samples, 3 alterations were observed, 2 hyperexpressions of the Ik6 isoform and a total deletion of the gene. The presence of strong Ik6/Ik10 isoform expression was associated in B-derived ALL with worse event-free survival (SLE), disease-free survival (SLD), and overall survival (OS) ($P < 0.001$). The presence of any deletion of the gene had an impact only on the SLE ($P = 0.003$). The 5-year event-free survival was $78.1 \pm 4.6\%$ versus $32 \pm 12.4\%$ ($P < 0.001$), for the groups with and without a strong deletion of *IKZF1* respectively, with relative risk of unfavorable event of 6,034 (95% CI: 2,105 - 17,295) for the presence of the deletion. Multivariate analysis by Cox regression model in B lineage ALL showed that the strong expression of Ik6 / Ik10 isoforms was the main independent prognostic factor ($P < 0.001$) when analyzed in association with age, immunophenotype (absence of CD10), marrow status bone in D28 of induction therapy (M2 / M3) and presence of DRM in induction D28 for both SLE, SLD and SG. Our data suggest that the use of simplified and low-cost *IKZF1* gene deletion analysis is capable of detecting patients at higher risk of relapse and may be useful in the stratification of patients with B lineage ALL in future treatment protocols. Multicentric studies with a greater number of cases are necessary to confirm these results.

Key words: Acute Lymphoid Leukemia, Childhood, *IKZF1*, Isoform 6, Isoform 10.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCGH	hibridização genômica comparativa por array
BCR-ABL 1	t (9;22), presença do cromossomo Philadelphia
CB	crise blástica
<i>CRLF2</i>	<i>cytokine receptor-like factor 2</i>
CSF1R	colony-stimulating factor 1 receptor
DN	domínio negativo
DRM	doença residual mínima
<i>EBF1</i>	early B-cell factor 1
EPOR	erythropoietin receptor
ETV6-RUNX1	t (12;21), TEL-AML1
FISH	hibridização in situ por fluorescência
GB	glóbulos brancos
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemias da Infância
GMALL	German multicenter ALL
ITK	inibidores de tirosino-quinase
<i>IKZF1</i>	gene da família <i>IKAROS</i>
IK 6	isoforma 6
IK 10	isoforma 10
<i>JAK2</i>	<i>janus kinase 2</i>
LLA	leucemia linfóide aguda
<i>LEF1</i>	lymphoid enhancer factor1
LMC	leucemia mieloide crônica
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
<i>PAX5</i>	paired box 5
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PCR-RT	reverse transcription polymerase chain reaction

SG	sobrevida global
SLD	sobrevida livre de doença
SLE	sobrevida livre de eventos
SNMP	single-nucleotide-polymorphism microarrays
STAT	signal transducer and acticator of transcription
TCTH	transplante de células tronco hematopoiéticas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência de LLA-B nos pacientes de 0 a 19 anos de 2003 a 2007.....	18
Figura 2: Frequência de subtipos citogenéticos nos pacientes pediátricos com LLA.....	19
Figura 3: Esquema das principais alterações genéticas observadas em LLA <i>Ph-like</i>	21
Figura 4: Caminhos envolvendo sinalização do receptor de citocinas e diferenciação de células B por reguladores transcricionais linfóides em células B progenitoras normais.....	22
Figura 5: Frequência dos tipos de alterações que ocorrem na LLA <i>Ph-like</i> de acordo com a idade do paciente.	23
Figura 6: Representação esquemática do gene <i>IKZF1</i> com as regiões <i>N-terminal zinc-finger</i> que mostra atividade de ligação do DNA e <i>C-terminal zinc-finger</i> responsável pela dimerização da proteína.	27
Figura 7: Visão geral da família de transcrição IKZF evidenciando os locais de ligação de DNA e os locais de dimerização	30
Figura 8: Representação esquemática das isoformas do <i>IKAROS</i>	31
Figura 9: Curva de SLE comparando os pacientes com LLA de linhagem B e LLA de linhagem T admitidos no presente estudo.....	36
Figura 10: Curva de SLE de todos os pacientes do estudo de acordo com a classificação do imunofenótipo.....	37
Figura 11: SLE dos pacientes do estudo diagnosticados como LLA de linhagem B.....	41
Figura 12: Exemplos de amplificação única de forte intensidade da isoforma Ik6 (setas amarelas) e amplificação fraca de Ik6 em comparação as outras isoformas ativas (setas azuis).....	42
Figura 13: Exemplo de amplificação única da isoforma Ik10 de forte intensidade (seta) e isoformas normais.	43
Figura 14: Presença de amplificação única da isoforma Ik6 de forte intensidade em amostra de LLA de linhagem T (seta).	43

Figura 15: Confirmação dos resultados no gel de acrilamida 8%, evidenciando amostras com presença de Ik6 (setas amarelas) e Ik10 (setas azuis).....	43
Figura 16: Sequenciamento evidenciando local do ponto de fusão dos éxons 3 e 8 devido deleção dos éxons de 4 a 7- forward (F) e reverse (R).....	45
Figura 17: Sequenciamento evidenciando local do ponto de fusão dos éxons 1 e 8 devido deleção dos éxons de 2 a 7- forward (F) e reverse (R).....	46
Figura 18: SLE em pacientes com LLA de linhagem B sem (negativo) ou com a presença de qualquer deleção do <i>IKZF1</i> (positivo).	48
Figura 19: SLE em pacientes com LLA de linhagem B com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene <i>IKZF1</i> (negativa).....	49
Figura 20: SLD em pacientes com LLA de linhagem B sem (negativa) ou com a presença de qualquer deleção do <i>IKZF1</i> (positiva).	50
Figura 21: SLD em pacientes com LLA de linhagem B com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene <i>IKZF1</i> (negativa).....	51
Figura 22: SG em pacientes com LLA de linhagem B sem (negativa) ou com a presença de qualquer deleção do <i>IKZF1</i> (positiva).	52
Figura 23: SG em pacientes com LLA de linhagem B com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene <i>IKZF1</i> (negativa).....	53
Figura 24: SLE em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco sem (negativa) ou com a presença de qualquer deleção do <i>IKZF1</i> (positivo) ..	55
Figura 25: SLE em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco com expressão forte das isoformas IK6/IK10(positiva) em comparação com outras alterações do gene (negativa)	55
Figura 26: SLD em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco sem (negativa) ou com a presença de qualquer deleção do <i>IKZF1</i> (positivo) ..	56
Figura 27: SLD em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco com expressão forte das isoformas IK6/IK10(positiva) em comparação com outras alterações do gene (negativa)	56
Figura 28: SG em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco sem (negativa) ou com a presença de qualquer deleção do <i>IKZF1</i> (positivo) ..	57

Figura 29: SG em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10(positiva) em comparação com outras alterações do gene (negativa)	57
Figura 30: SLE em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco sem (negativo) ou com a presença de qualquer deleção do <i>IKZF1</i> (positivo) ..	58
Figura 31: SLE em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene <i>IKZF1</i> (negativa)	59
Figura 32: SLD em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco sem (negativo) ou com a presença de qualquer deleção do <i>IKZF1</i> (positivo) ..	59
Figura 33: SLD em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene <i>IKZF1</i> (negativa)	60
Figura 34: SG em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco sem (negativo) ou com a presença de qualquer deleção do <i>IKZF1</i> (positivo) ..	60
Figura 35: SG em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene <i>IKZF1</i> (negativa)	61
Figura 36: Deleção de diferentes isoformas de domínio negativo do gene <i>IKZF1</i> . Comportam-se como domínio-negativo Ik6 e Ik10	66
Figura 37: RT-PCR com primers dos éxons de 1 a 8 evidenciando aumento da Ik6 nas linhas 4 a 6 e aumento de Ik10 nas linhas 6 a 8 e abaixo o aumento de Ik10 com expressão forte e fraca	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das alterações encontradas nas isoformas do <i>IKZF1</i>	38
Tabela 2: Tipos de expressão das isoformas detectadas nos pacientes do estudo.	42
Tabela 3: Avaliação das amostras controles com diagnóstico de LLA T-derivada. ..	44
Tabela 4: Sobrevida livre de eventos (SLE), Sobrevida livre de doença (SLD) e Sobrevida Global (SG) em 5 anos de acordo com as variáveis clínicas em biológicas nos pacientes com LLA de linhagem B.	47
Tabela 5: Sobrevida livre de eventos (SLE), Sobrevida livre de doença (SLD) e Sobrevida global (SG) em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco de acordo com a presença ou ausência de alterações do <i>IKZF1</i>	54
Tabela 6: Sobrevida livre de eventos (SLE), Sobrevida livre de doença (SLD) e Sobrevida global (SG) em pacientes com LLA de linhagem B classificados como de alto risco de acordo com a presença ou ausência de alterações do <i>IKZF1</i>	58
Tabela 7: Análise multivariável por modelo regressão de Cox para SLE com a presença de qualquer deleção de <i>IKZF1</i>	62
Tabela 8: Análise multivariável por regressão de Cox para SLE com a presença de expressão forte das isoformas com deleções domínio negativas <i>Ik6/Ik10</i>	62
Tabela 9: Análise multivariável por regressão de Cox para SLD com a presença de qualquer deleção do <i>IKZF1</i>	62
Tabela 10: Análise multivariável por regressão de Cox para SLD com a presença de expressão forte das isoformas com deleções domínio negativas <i>Ik6/Ik10</i>	63
Tabela 11: Análise multivariável por regressão de Cox para SG com a presença de qualquer deleção do <i>IKZF1</i>	63
Tabela 12: Análise multivariável por regressão de Cox para SG com a presença de expressão forte das isoformas com deleções domínio negativas <i>Ik6/Ik10</i>	63
Tabela 13: Associação entre a presença das alterações de <i>IKZF1</i> e as variáveis idade ao diagnóstico (<1 ou ≥9 anos x entre 1 e 9 anos), número de glóbulos brancos (GB) ao diagnóstico (≥ 50.000/dL x >50.000/dL), imunofenótipo (CALLA negativo x CALLA positivo), grupo de risco (alto risco x baixo risco), status morfológico da medula óssea (MO) no final da indução (M2/M3 x M1), Doença residual mínima (DRM) ao final da indução (positiva versus negativa, evento (recidiva ou óbito x remissão clínica) e óbito (óbito x vivo) (*teste exato de Fisher) .	64
Tabela 14: Tabela comparativa de estudo que analisaram alterações do gene <i>IKZF1</i> em pacientes com LLA	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Leucemia Linfóide Aguda	17
1.2 LLA <i>BCR-ABL1</i> -like	21
1.3 Deleção/mutação do gene <i>IKZF1</i>	25
1.4 Isoformas do <i>IKZF1</i>	29
 2 JUSTIFICATIVA.....	 32
 3 OBJETIVOS.....	 33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específicos	33
 4 DESENHO DO ESTUDO	 34
 5 MÉTODOS	 35
5.1 Pacientes.....	35
5.2 Análise da presença da mutação/deleção do <i>IKAROS</i>	37
5.3 Análise do sequenciamento das amostras com alteração do <i>IKZF1</i> (Ik6 e Ik10)	39
5.4 Análise estatística	39
 6 RESULTADOS.....	 41
6.1 Análise univariada da sobrevida livre de eventos, sobrevida livre de doença e sobrevida global de acordo com variáveis clínicas e biológicas nas amostras de LLA de linhagem B	46
6.2 Impacto das deleções de <i>IKZF1</i> de acordo com o grupo de risco em LLA de linhagem B	54
6.2.1 Pacientes classificados como baixo risco.....	54
6.2.2 Pacientes classificados como alto risco	58
6.3 A análise pela regressão de Cox comparou as variáveis estudadas	61
6.4 Associação entre alterações de <i>IKZF1</i> e variáveis clínicas e biológicas	64
 7 DISCUSSÃO	 65

8 CONCLUSÕES	74
9 REFERÊNCIAS.....	75
10 ANEXOS	83
ANEXO1: Tabela dos pacientes que entraram no estudo	83
ANEXO 2: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	89
ANEXO 3: Termo de consentimento livre e esclarecido, termo de assentimento e termo de dispensa.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Linfóide Aguda

A leucemia linfóide aguda (LLA) é a neoplasia mais frequente da infância e é caracterizada por bloqueio na diferenciação linfóide, causando um acúmulo de células progenitoras na medula óssea, sangue periférico e eventualmente sistema nervoso central (TIJCHON et al., 2013). É responsável por um terço dos casos de câncer pediátrico, podendo ocorrer por alterações genéticas intra-útero ou por aquisições genéticas secundárias pós-natal (GREAVES, 2018). Nos Estados Unidos são diagnosticados 6.000 casos/ano, com predomínio na infância. Aproximadamente 60% dos casos ocorrem em pacientes menores de 20 anos, com pico de incidência entre 2 e 5 anos de vida (INABA et al., 2013). A incidência norte-americana de LLA é de cerca de 30 casos por milhão de pessoas menores de 20 anos, variando significativamente de acordo com a raça e grupo étnico: 14,8 casos por milhões de negros, 35,6 casos por milhão de brancos e 40,9 casos por milhão de hispânicos. Ocorre com maior frequência no sexo masculino na proporção de 55% e 45% no sexo feminino (HUNGER; MULLIGHAN, 2015). Aproximadamente 85% dos casos na infância é B-derivada (SUN et al., 2018). A LLA de linhagem B é um distúrbio genético complexo adquirido, com múltiplas alterações em genes que regulam a hematopoiese, o ciclo e a proliferação celular (OU et al., 2017).

Os sintomas da LLA incluem hematomas ou sangramento devido à trombocitopenia, palidez e fadiga por anemia e infecção causada por neutropenia. A infiltração leucêmica do fígado, baço, linfonodos e mediastino é comum no diagnóstico. Leucemia extramedular no sistema nervoso central (SNC) ou testículos podem exigir modificações específicas na terapia (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

Katz et al. (2015) realizaram uma avaliação global da incidência de leucemia linfóide aguda entre 2003 a 2007 e evidenciaram que na população pediátrica (de 0 a 19 anos), entre os países selecionados (figura 1), Singapura apresentou a maior taxa de incidência (3,78 por 100.000 pessoas/ano). Austrália, Costa Rica e Itália também apresentaram uma taxa de incidência >3,5 por 100.000 pessoas/ano. Na China relataram a menor taxa de incidência nessa faixa etária (2,17 por 100.000), enquanto outros países como a República Tcheca e a Polônia também tiveram taxas de 2,4 por 100.000.

Figura 1: Incidência de LLA-B nos pacientes de 0 a 19 anos de 2003 a 2007.

Fonte: Katz et al. (2015, p.1631).

Apesar da taxa de sobrevida a longo prazo ser de aproximadamente 80-90%, a leucemia é a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer na infância e adolescência (TIJCHON et al., 2013). A recaída é o principal evento adverso e pode ocorrer em grupos heterogêneos, incluindo pacientes classificados como baixo risco (PALMI et al., 2013). Nas últimas décadas, a taxa de sobrevida global em crianças com diagnóstico de LLA melhorou drasticamente, passando de 10% na década de 1960 para quase 90% hoje. Apesar dessa melhora notável, cerca de 2% dos pacientes são refratários à quimioterapia de indução e em 10 a 15% dos pacientes ocorrem recidiva (SUN et al., 2018). Esses pacientes com recidiva podem ter alterações genéticas e moleculares responsáveis pelo insucesso do tratamento, podendo levar a sobrevida curta (SMITH et al., 2018).

Avanços na terapia da leucemia linfóide aguda pediátrica, incluindo a classificação de risco baseado na doença residual mínima (DRM), o progresso da quimioterapia, o tratamento de suporte e o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas (TCTH) proporcionaram a melhora do prognóstico da LLA pediátrica. A melhora no tratamento da LLA infantil desde meados da década de 1980 reduziu significativamente não apenas o risco de recidiva leucêmica, mas também o risco de desenvolver uma segunda neoplasia (PUI et al., 2014). A atribuição precisa do risco na LLA na infância é essencial para evitar o tratamento insuficiente ou excessivo (YEOH et al., 2018).

A melhora do tratamento na LLA infantil depende da avaliação de fatores de risco convencionais ao diagnóstico, tais como idade <1 ano ou ≥ 10 anos, glóbulos brancos (GB) $\geq 50 \times 10^9/L$, detecção de doença extramedular, imunofenótipo de células T e presença de rearranjo do gene *MLL* ou a fusão dos genes *BCR-ABL1*, bem como na detecção de marcadores moleculares de mau prognóstico. A análise de expressão gênica de linfoblastos no momento do diagnóstico identificaram vários genes com significativo potencial prognóstico (REYES-LEÓN et al., 2015).

O perfil de expressão genética e outras tecnologias genômicas abrangentes como a avaliação das anomalias do número de cópias do genoma ou o sequenciamento de DNA tem potencial para desvendar a heterogeneidade genética da LLA e captar diferenças que afetam resposta ao tratamento e que podem melhorar a classificação de risco e a identificação de novos alvos terapêuticos (KANG et al., 2009; HARVEY, 2010). As principais translocações são: $t(12;21)$ - *ETV6-RUNX1*, $t(1;19)$ - *TCF3-PBX1*, $t(9;22)$ - *BCR-ABL1* e rearranjos envolvendo o gene *MLL* (MULLIGHAN, 2011) (Figura 2). A translocação $t(12;21)$ (p13;q22) é a translocação cromossômica mais comum na LLA de linhagem B da infância, com uma frequência que varia de 15% a 30% entre os estudos realizados (AMPATZIDOU et al., 2018).

Figura 2: Frequência de subtipos citogenéticos nos pacientes pediátricos com LLA.

Fonte: Mullighan (2012a, p. 3409).

A LLA-B derivada é a leucemia mais comum da infância e envolve a expansão descontrolada de progenitores linfóides B na medula óssea. A doença é frequentemente iniciada por uma translocação cromossômica, mas se manifesta apenas quando progenitores leucêmicos na medula óssea acumulam um número de deleções gênicas adicionais e mutações que impulsionam a progressão da doença (MARKE et al., 2018).

O desenvolvimento das células B linfoides a partir da célula tronco hematopoiética é regulado por múltiplos fatores de transcrição que induzem a maturação da célula linfóide B e a bloqueiam para a maturação de linhagens alternativas. Os principais genes responsáveis pela maturação do linfócito incluem o *PAX5* (*paired box 5*), *IKZF1* (IKAROS), *EBF1* (*early B-cell factor 1*) e *LEF1* (*lymphoid enhancer factor1*), entre outros. (MULLIGHAN et al., 2008; IACOBUCCI et al., 2009; MARTINELLI et al., 2009).

Alterações genéticas envolvendo estes genes que regulam o desenvolvimento normal de linfócitos B são identificadas em 40% das LLA B-derivadas. O gene mais comumente envolvido é o *PAX5*, um gene chave para a maturação de linfócitos de linhagem B. Outros genes que regulam o desenvolvimento linfóide B e que estão frequentemente envolvidos incluem genes da família de fatores de transcrição *IKAROS* (*IKZF1*, *IKZF2*, *IKZF3*), *EBF1*, *TCF3*, *LEF1*, *RAG1/2*, *BLNK*, e *VPREB1* (MULLIGHAN; DOWNING, 2009; MULLIGHAN et al., 2011) (figura 3). As deleções ou alterações de sequência do gene supressor de tumor *CDKN2A/B* têm sido descritos em 30-35% dos casos e associados com maior risco de recaída (MULLIGHAN; DOWNING, 2009; PUI et al., 2011; MULLIGHAN, 2012). As deleções dos genes dos fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento e diferenciação das células B causam anormalidades no número de cópias. Os mais frequentes envolvidos nessas deleções na LLA-B são: *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*, *RB1*, *CDKN2A/B*, *ETV6*, e *BTG1* (HARRISON, 2013).

Figura 3: Esquema das principais alterações genéticas observadas em LLA *Ph*-like. A alteração do *IKZF1* está associada a bloqueio no desenvolvimento linfóide normal nos estágios pró-B para pré-B.

Fonte: Mullighan (2011, p. 396-400)

Uma descoberta notável a partir dessas análises genômicas é que as alterações de *PAX5* são comuns em LLA, mas não influenciam o resultado do tratamento, enquanto as alterações de *IKZF1* são menos comuns, mas fortemente associadas a resultados desfavoráveis nos subtipos distintos de LLA de alto risco: *BCR-ABL1* positivo e um novo subtipo de leucemia linfóide aguda "*BCR-ABL1-like*" (MULLIGHAN, 2011).

1.2 LLA *BCR-ABL1-like*

LLA *BCR-ABL1-like* ou cromossomo philadelphia-like (*Ph-like*) é um subtipo de leucemia linfóide de alto risco identificado por ter um perfil de expressão gênica similar a LLA *Ph* positiva, e é caracterizada por rearranjos ou mutações causando ativação do receptor de citocina e na sinalização da tirosino-quinase (ROBERTS, 2017; MAESE et al., 2017; PUI et al., 2017; RESHMI et al., 2017). Devido ao prognóstico adverso e potencial de resposta desses pacientes aos inibidores de tirosina quinase, a revisão de 2016 para a classificação da OMS de leucemia aguda reconheceu e incorporou LLA *Ph-like* na classificação de LLA B-derivada, confirmando a importância clínica deste subtipo (ROBERTS, 2017).

Esses rearranjos nos genes envolvidos no receptor de citocinas e na sinalização das quinases são a marca da LLA *BCR-ABL1-like*, identificados em 80 a 90% dos casos. Embora a frequência e o espectro de alterações genéticas subjacentes variem entre diferentes grupos etários e populações, a maioria envolve a ativação das vias de

sinização *ABL1* e ou *JAK-STAT* como um mecanismo comum de transformação. Essas alterações podem ser agrupadas em seis categorias: 1) rearranjo *CRLF2* com ou sem *JAK1* ou *JAK2* mutados, 2) fusões da classe ABL (rearranjos *ABL1*, *ABL2*, *CSF1R* ou *PDGFRB*), 3) rearranjos *JAK2* ou *EPOR*, 4) outras mutações ou alterações envolvendo a via *JAK-STAT*, 5) alterações na via *RAS*, 6) outras alterações das quinases (MAESE et al., 2017, MARKE et al., 2018). (Figura 4).

Figura 4: Caminhos envolvendo sinalização do receptor de citocinas e diferenciação de células B por reguladores transcricionais linfóides em células B progenitoras normais estão esquematicamente indicados à esquerda. Alterações destas vias ocorrem freqüentemente com *IKZF1* deletado ou mutado na LLA-B como indicado à direita.

Fonte: Marke et al. (2018, p. 569).

Segundo Pui et al. (2017), a prevalência da LLA *BCR-ABL1*-like é de aproximadamente 12% nas crianças, 21 % nos adolescentes (16 a 20 anos), 27% nos adultos de 21 a 39 anos e de 20 a 24% nos pacientes acima de 40 anos, sendo mais frequente nos indivíduos do sexo masculino e pacientes com Síndrome de Down. Também é mais expresso na população hispânica e é associado com alterações no gene *GATA3*. Este subtipo de LLA está associado com aumento de doença residual mínima (DRM) positiva no final na indução e aumento do risco de recaídas.

A LLA *BCR-ABL1*-like constitui um novo subgrupo de alto risco da LLA de linhagem B, segundo a maioria dos estudos, compreendem aproximadamente 15% de crianças e adolescentes (TRAN et al., 2018).

Assim como na LLA *Ph* positiva, deleções do *IKZF1* têm sido reportado em aproximadamente 70% das crianças e adultos com LLA *Ph*-like, tornando-se, desta forma, uma marca deste tipo de LLA devido sua alta frequência (MAESE et al., 2017; PUI et al., 2017). Essas alterações do *IKAROS* têm sido associadas ao pior prognóstico, em parte devido à desregulação da adesão e da localização de células leucêmicas em nichos errôneos na medula óssea (PUI et al., 2017).

O rearranjo *CRLF2* é o achado mais comum na LLA *Ph*-like, sua frequência aumenta com a idade, chegando a estar presente em 60% dos casos dos adolescentes e adultos. E em 50% dos casos, o rearranjo *CRLF2* é acompanhado de mutações em *JAK1* ou *JAK2*. A segunda alteração mais frequente na LLA *BCR-ABL1*-like é a fusão da classe ABL, ocorrendo em aproximadamente 15% das crianças e adultos (figura 5). Porém, pacientes com alterações do *IKZF1*, independente de outros perfis de expressão, podem ter resultados inferiores, com uma sobrevida global de 5 anos (OS) de 20% em adultos jovens (MAESE et al., 2017). Uma alta proporção de pacientes pediátricos com LLA *Ph*-like também exibem deleção de *IKZF1*, e também tem sido relatado como um fator preditor independente de resultados adversos ao tratamento da LLA-B da infância (ZHOU et al., 2011; TRAN et al., 2018).

Figura 5: Frequência dos tipos de alterações que ocorrem na LLA *Ph*-like de acordo com a idade do paciente.

A grande maioria dos estudos tanto de pacientes pediátricos como de pacientes adultos mostraram que a LLA *Ph*-like está associada com pior prognóstico, exceto o estudo Total XV do *St Jude*, que foi o primeiro ensaio clínico a usar DRM prospectivamente durante e após a indução da remissão para orientar o tratamento dirigido ao risco. Os mau respondedores receberam tratamento intensificado, incluindo transplante de células tronco hematopoéticas em 15% dos pacientes (PUI et al., 2017), evidenciando que a detecção ao diagnóstico das LLA *Ph*-like podem modificar o tratamento, melhorando o prognóstico destes pacientes.

A utilização do ácido retinóico tem sido utilizado em estudos para induzir a diferenciação e reverter o efeito da deleção do *IKZF1* em modelos de ratos. Inibidores da caseína quinase 2 podem reativar a função do *IKAROS* do alelo remanescente em estudos recentes com modelos animais. Esses estudos pré-clínicos podem potencialmente implicar no desenvolvimento de futuras terapias-alvo para as LLAs com deleção do *IKZF1* (OFRAN; IZRAELI, 2017).

In vitro, foi possível verificar que o uso do Ponatinibe, um potente inibidor de tirosino-quinase, pode levar ao aumento da apoptose, reduzindo a proliferação nos casos *BCR-ABL1*-like da mesma forma como ocorre nos casos *BCR-ABL1* (CHIARETTI et al., 2018).

Pacientes com LLA *Ph*-like possuem sobrevida livre de eventos e sobrevida global significativamente inferiores, enfatizando a importância de identificar esses pacientes com potenciais de apresentarem benefícios com o uso de terapias alvo. Pacientes com fusão da classe *ABL1* têm sido elegíveis para estudos com o uso do dasatinibe ao tratamento e pacientes com rearranjos *CRLF2*, mutações ou alterações da via JAK-STAT, para o uso de ruxolitinib pelo COG (Children's Oncology Group) (RESHMI et al., 2017).

A superexpressão de *CRLF2* e *Ik6*, variante do *IKZF1*, são indicadores importantes do prognóstico da LLA *Ph*-negativa. Eles podem representar referências úteis para orientar terapias da LLA na era dos inibidores da tirosina quinase, podendo modificar o destino de todos os pacientes *Ph*-positivos num próximo futuro (MI et al., 2012).

Segundo Inbar et al. (2017), a DRM deve ser monitorada extensivamente nesses pacientes. Se negativa no final da indução, os pacientes podem continuar com a intensificação e manutenção, como é frequentemente recomendado em pacientes pediátricos com LLA *Ph*-like. No entanto, nos pacientes DRM positivo,

dado o mau prognóstico, um TMO alogênico deve ser fortemente considerado mesmo nesta fase. No caso da positividade da DRM, a obtenção da sua negatividade com, por exemplo, blinatumomab ou inotuzumab ozogamicina é recomendada, seguida após pelo TCTH.

1.3 Deleção/mutação do gene *IKZF1*

Desde sua descoberta como chave reguladora para a linfopoese, o fator de transcrição *IKAROS* e os membros da sua família, codificado pelos genes *IKZF1-IKZF5*, tem sido pauta de muitos estudos na hematologia e imunologia (MERKENSCHLAGER, 2010).

O *IKZF1* é localizado na banda cromossômica 7p12 que codifica o gene *IKAROS*, que é um fator de transcrição que desempenha um papel crítico no desenvolvimento de todas as linhagens linfóides (REYES-LEÓN et al., 2015). As proteínas *IKAROS* pertencem a superfamília de *zinc-finger* que consistem em um átomo de zinco que está em coordenação específica com quatro aminoácidos, predominantemente cisteína e histidina. *IKZF1* é o membro mais estudado da família (JOHN; WARD, 2011). O gene *IKAROS* compreende 6 domínios de zinc-finger em 7 éxons: quatro nos éxons 3, 4 e 5 na região N-terminal, com atividade de ligação ao DNA e dois domínios no éxon 7 na região C-terminal que são requeridos para hetero e homodimerização entre as isoformas de *IKAROS* e interagem com outras famílias da proteína (MULLIGHAN et al, 2009; REYES-LEÓN et al., 2015).

A família de proteínas *IKAROS* compreende: *Ikaros* (*IKZF1*), *Aiolos* (*IKZF3*), *Helios* (*IKZF2*), *Eos* (*IKZF4*) e *Pegasus* (*IKZF5*). Essas proteínas participam de uma rede complexa de interações com genes reguladores, outros membros da família e uma série de outros fatores de transcrição para controlarem a expressão do gene, através inclusive da remodelação da cromatina. Nessa via, os genes da família *IKAROS* regulam o destino celular durante a hematopoese, principalmente no desenvolvimento do sistema de adaptação imune. Mutações de vários genes da família resultam em neoplasias hematológicas, especialmente aqueles de natureza linfóide (JOHN; WARD, 2011).

O gene *IKZF1* codifica a proteína *IKAROS* que funciona na fase muito precoce da hematopoiese. Os homodímeros *IKAROS* se ligam ao DNA e formam um complexo com histona desacetilase, atuando na remodelação da cromatina. Sabe-se

que *IKAROS* funciona como um supressor de neoplasias linfoblásticas. Suas alterações levam a diferenciação e proliferação de células linfoides e estão associadas a uma menor sobrevida em crianças com LLA B-derivadas (TOKUNAGA et al., 2013).

Alterações do *IKZF1* estão presentes em mais de 80% dos casos de LLA Ph+ em adultos e crianças e nos casos de progressão da leucemia mieloide crônica (LMC) para crise blástica linfóide, mas não na LMC fase crônica (MULLIGHAN et al., 2009; IACOBUCCI et al., 2009). Também tem sido encontrada frequentemente nos pacientes com síndrome de Down e LLA (35%) (BUITENKAMP et al., 2012), sendo rara na LLA de linhagem T (5%) (DORGE et al., 2013).

Assim, a perda de *IKZF1* ou expressão de isoformas *IKAROS* dominante-negativas (particularmente a isoforma IK6 que não possui éxons 3 a 6, e os *zinc-finger* N-terminais) resultam em um menor período de latência para o desenvolvimento de LLA em modelos experimentais e estariam associados a maior resistência a alguns inibidores da tirosina quinase, proporcionando um mecanismo plausível que explicaria porque os pacientes com LLA e *BCR-ABL1* positivo apresentam uma resposta de tratamento inferior aos pacientes com LMC (MULLIGHAN, 2011).

Estudos têm mostrado a presença da mutação *IKZF1* não apenas em pacientes com LLA Ph+ ou Síndrome de Down, mas também em pacientes com LLA sem alterações cromossômicas previamente conhecidas, embora com incidências diferentes (RUSSELL et al., 2009; IACOBUCCI et al., 2009).

As deleções do *IKZF1* são raramente detectadas na presença da translocação *ETV6-RUNX1*, representando aproximadamente 3% dos casos. Assim como no rearranjo *TCF-3* ocorrem em 3% dos casos e no rearranjo *MLL* em 5% dos casos (MARKE et al., 2018).

A alteração mais frequente do *IKZF1* encontrada nos pacientes com LLA é a deleção envolvendo todo o gene ou envolvendo somente algum éxon (MULLIGHAN et al., 2009; DORGE et al., 2013; CHEN et al., 2012). Como a isoforma dominante negativa IK6 onde ocorrem deleções dos éxons 4 ao 7. Outras deleções comuns afetam os éxons 2-3, éxons 2-7 e éxons 4-8 (MARKE et al., 2018) (Figura 6).

Figura 6: Representação esquemática do gene *IKZF1* com as regiões *N-terminal zinc-finger* que mostra atividade de ligação do DNA e *C-terminal zinc-finger* responsável pela dimerização da proteína.

Fonte: Martinelli et al. (2009, p. 5204).

Além das deleções, podem ocorrer mutações do tipo missense, frameshift e inserções, correspondendo a 7% das alterações do *IKZF1* na LLA-B (MARKE et al., 2018).

Martinelli et al. (2009) evidenciou em um estudo com a população adulta com LLA *Ph+* que a SLE é significativamente menor nos pacientes com a deleção do *IKZF1*, podendo levar a resistência aos Inibidores de tirosino-quinases (ITK). Desta forma, a presença da deleção do *IKZF1* representa o fator prognóstico mais importante na LLA *BCR-ABL1* positiva. Estudos recentes também tem mostrado o impacto negativo da deleção do *IKZF1* nas LLA *BCR-ABL1* negativas. O impacto prognóstico da deleção do *IKZF1* também foi confirmado por vários estudos de grupos pediátricos de LLA (HARVEY et al., 2010; ASAI et al., 2013; PALMI et al., 2013; OLSSOM et al., 2015, CLAPPIER et al., 2015).

Imamura et al. (2016) realizaram um estudo com esse grupo de LLA-B designadas “*BCR-ABL1-like*” no qual foram identificadas um certo número de fusões quiméricas, incluindo as que envolvem a tirosino-quinase e os receptores de citocinas. Foi encontrada alta prevalência de deleções do *IKZF1* (72,7%) nos pacientes com presença de fusões de tirosino-quinases, como *ABL1*, *PDGFRB*, *JAK2* e *CRLF2*, sugerindo que também são biologicamente similares aos pacientes com *BCR-ABL1*.

A deleção/mutação do *IKZF1* aumenta em três vezes a chance de falha de resposta ao tratamento na LLA (MULLIGHAN et al., 2009; KUIPER et al., 2010) e tem sido associada com má resposta ao tratamento quimioterápico e pior prognóstico em LLA *Ph1* negativa (MULLIGHAN et al., 2009; KUIPER et al., 2010; DEN BOER et al., 2009; CLAPPIER et al., 2015; OLSSON et al., 2015). Utilizando-se análise multivariável para estabelecimento de fatores prognósticos independentes incluindo idade, contagem de leucócitos no sangue periférico e citogenética desfavorável, a presença da mutação/deleção do *IKZF1* foi considerada fator de pior resposta ao tratamento independente desses fatores e o estudo da presença da deleção/mutação de *IKZF1* ao diagnóstico tem se mostrado importante na avaliação do risco, para estratificação do tratamento mais adequado (MULLINGHAN, 2011).

Em modelos murinos, o uso de retinoides em combinação com dasatinib parece ser opção terapêutica interessante em LLA com mutação do *IKZF1* (CHURCHMAN et al., 2015). Em crianças tratadas pelo EORTC *Children's Leukemia Group Study* 58951, a adição de pulsos de vincristina e esteroides durante a manutenção parece diminuir o risco de recidiva em pacientes com deleção do *IKZF1* (CLAPPIER et al., 2015).

As alterações do *IKAROS* promovem a aquisição de um fenótipo de células-tronco e a desregulação da adesão, o que resulta em uma deslocalização aberrante do microambiente da medula óssea e na ativação de vias de sinalização a jusante. Essa adesão anormal entre as próprias células leucêmicas e entre as células leucêmicas e o microambiente da medula óssea são em partes a causa da resistência ao tratamento nesses casos. In vivo, o bexaroteno reverteu à adesão aberrante no nicho da medula óssea e sinergizou com o dasatinib, resultando em quase o dobro da sobrevivência da leucemia em ratos *Ikaros* mutante (CHURCHMAN; MULLIGHAN, 2017).

A perda de *Ikaros* em precursores de células B bloqueia a diferenciação e perpetua a adesão estromal aumentando a sinalização da integrina. A combinação de sinalização de integrinas e citocinas em células pré-B deficientes em *Ikaros* promove sua sobrevivência e autorrenovação (YOSHIDA; GEORGOPOULOS, 2014).

Desta forma a deleção do *IKZF1* tem se mostrado importante fator prognóstico nas LLA pediátricas e deve estar presente na classificação de risco (ASAI et al., 2013).

Diante desses resultados, esse grupo de LLA infantil de linhagem B denominado "*BCR-ABL1-like*" tem sido tema de muitos estudos. Estas LLAs exibem um perfil de expressão gênica semelhante ao observado em pacientes com LLA *BCR-ABL1* positivos. Este subtipo representa até 15% de todos os casos de linhagem B e é frequentemente associada à deleção do *IKZF1* e alterações na ativação de tirosino-quinases (MULLIGHAN et al., 2009; DEN BOER et al., 2009; PUI et al., 2011; MULLIGHAN, 2012; BOER et al., 2017). A deleção parcial ou total do *IKZF1* tem sido identificada como um fator de alto risco de recaída, ou falha de resposta ao tratamento com incidência maior de DRM positiva tanto no D19 quanto do D46 pós indução (MULLIGHAN et al., 2009).

1.4 Isoformas do *IKZF1*

As cinco diferentes proteínas zinc-finger da família IKAROS (*IKZF1-IKZF5*) são capazes de se ligar ao DNA diretamente no núcleo A/GGGAA através do domínio zinc-finger N-terminal (MARKE et al., 2018). O *IKAROS* normal contém quatro zinc-fingers N-terminal e dois zinc-fingers C-terminal. Os zinc-fingers C-terminal são necessários para homo e heterodimerização entre as diferentes proteína *IKZF* (LIU et al., 2012; MARKE et al., 2018). No entanto, uma característica comum do *IKZF1* e membros da família relacionados é a presença de variantes mais curtas devido a splicing alternativo (MARKE et al., 2018), levando a exclusões de éxons.

Estas variantes muitas vezes não têm atividade de ligação ao DNA, mas retêm a capacidade de interagir com o *IKZF1-IKZF5* de comprimento total, criando isoformas dominantes-negativas (MARKE et al., 2018). O gene *IKZF1* consiste de oito exons, dos quais sete exons são codificadores e permitem múltiplos isoformas a serem geradas (LIU et al., 2012).

As isoformas diferem no número de zinc-finger N-terminais, e apenas as isoformas com pelo menos três zinc-fingers N-terminais são capazes de se ligar ao DNA. Portanto, isoformas mais curtas, sem a maioria ou a totalidade do N-terminal zinc-finger atenuam a capacidade de ligação de DNA e podem agir como isoformas dominante-negativas (DN) (LIU et al., 2012; ZHOU et al., 2011).

Uma variante bem conhecida de *splicing* do gene *IKZF1* humano é a isoforma IK6, que não possui os exons 4 a 7, faltando todos os zinc-fingers N-terminais,

comportando-se como domínio negativo (LIU et al., 2012; MARKE et al., 2018). É a forma mais comum das isoformas mais curtas, sendo capaz de suprimir a função de ligação ao DNA e é o mais forte repressor de transcrição da família Ikaros (ZHOU et al., 2011).

Figura 7: Visão geral da família de transcrição IKZF evidenciando os locais de ligação de DNA e os locais de dimerização.

Fonte: Marke et al. (2018, p. 566).

Pelo menos 13 isoformas de *IKAROS* humanos foram descritas. Isoformas longas (Ik1 a Ik3) têm pelo menos três zinc-finger, que são capazes de ligar-se ao DNA e, portanto, são considerados funcionais. As isoformas curtas (Ik4 a Ik10) faltam dois ou mais domínios de zinc-finger, não podendo, desta forma, ligar-se ao DNA, prejudicando a função das proteínas Ikaros, comportando-se como DN. (VSHYUKOVA et al., 2018).

Pacientes com expressão forte da Ik6 são mais propensos a terem anormalidades citogenéticas que tem associação com pior prognóstico, como a presença da t(9;22) ou cariótipos complexos, apresentando geralmente resposta pobre a quimioterapia (ZHOU et al., 2011).

Figura 8: Representação esquemática das isoformas do *IKAROS*.

Fonte: Vshyukova et al. (2018, p. 30).

Wang et al. (2014) demonstraram que a deleção do *IKZF1* com a expressão das isoformas Ik6 e Ik10 na LMC está associado ao aumento da transição da fase crônica para a crise blástica (CB), principalmente CB linfóide.

Han et al. (2017) investigaram o papel e mecanismo subjacente de Ik6 na apoptose celular induzida por drogas. Os resultados indicaram que o Ik6 protege as células leucêmicas contra apoptose pela ativação da via Akt-FoxO1, fornecendo resistência a apoptose induzida pela Daunorrubicina na indução da LLA.

Estudos mostram que a hiperexpressão do Ik6 tem sido identificado marcador de mau prognóstico nas crianças com LLA (DEN BOER et al., 2009; ZHOU et al., 2011; HAN et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

Dada a importância prognóstica das alterações das isoformas domínio-negativos nas LLAs de linhagem B pediátricas em estudos de grandes centros internacionais de tratamento em Oncologia Pediátrica é de fundamental importância a avaliação do seu comportamento nas crianças brasileiras e dentro dos protocolos de tratamento utilizados no Brasil. Tal fato poderá modificar os protocolos utilizados no país, ocasionando melhores respostas ao tratamento nos pacientes com deleções fortes do *IKZF1*.

Dado que as técnicas utilizadas nos estudos citados acima são em sua grande maioria, caros, complexos e necessitam de equipamentos sofisticados, não disponíveis na imensa maioria dos serviços de Oncologia Pediátrica em países em desenvolvimento como o Brasil, a determinação de técnicas mais simples e de custo acessível são fundamentais para a democratização da sua detecção em um maior número de centros possíveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Analisar a presença de deleções do gene *IKZF1* em amostras consecutivas de medula óssea ao diagnóstico de crianças com LLA pela técnica de RT-PCR (reverse-transcription-polymerase chain reaction);

3.2 Específicos

- Identificar a intensidade da expressão de isoformas através da análise da eletroforese em gel das PCRs e seu impacto prognóstico;

- Confirmar as alterações observadas pela técnica de RT-PCR através de sequenciamento direto de amostras que evidenciaram a alteração do *IKZF1*;

- Analisar a associação da presença das alterações do gene com fatores clínicos biológicos como idade, número de glóbulos brancos ao diagnóstico, imunofenótipo, resposta a terapia, doença residual mínima ao final da indução, recidiva e óbito.

4 DESENHO DO ESTUDO

5 MÉTODOS

5.1 Pacientes

Foram analisadas amostras consecutivas de medula óssea colhidas ao diagnóstico de pacientes com LLA tratados no Serviço de Oncologia e Hematologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da FMRP-USP estocadas nos bancos de tumores desta instituição e amostras procedentes do Centro Infantil Boldrini/UNICAMP colhidas ao diagnóstico de LLA que também já encontravam-se estocadas no banco de tumores do HC-FMRP. Todas classificadas e tratadas de acordo com os protocolos propostos pelo GBTLI-99 (BRANDALISE et al., 2010; SCRIDEI et al., 2009).

Foram inicialmente analisadas 181 amostras ao diagnóstico de crianças com LLA admitidas e acompanhadas no serviço de oncologia pediátrica das referidas instituições.

Foram excluídas 44 amostras, cujo cDNA não apresentava qualidade suficiente para o estudo após avaliação de expressão dos controles endógenos dos genes *GUSB* (com transcritos com tamanho de 100 pares de base) e *GAPDH* (com 800 pares de base).

Com isto foram incluídas 100 amostras consecutivas de LLA B-derivada (uma delas com marcador de imunoglobulina de superfície positivo, posteriormente classificada como LLA-B e excluída da análise por ter sido submetida a protocolo de tratamento diferente), 35 amostras de LLA T-derivada e 2 sem classificação de imunofenótipo de ambas as instituições.

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética das instituições participantes (Processo HCRP nº13/2016).

Não houve diferença estatística na curva de SLE comparando todos os pacientes com LLA B-derivada com os pacientes com LLA T-DERIVADA (Figura 9)

Figura 9: Curva de SLE comparando os pacientes com LLA de linhagem B e LLA de linhagem T admitidos no presente estudo.

Quando separamos os pacientes de linhagem B de acordo com a expressão do antígeno CALLA (CD10), foi observada uma menor sobrevida nos pacientes classificados como CALLA negativos (Figura 10).

Os dados referentes aos pacientes do estudo são mostrados na tabela no anexo 1.

Figura 10: Curva de SLE de todos os pacientes do estudo de acordo com a classificação do imunofenótipo.

Os dados referentes aos pacientes do estudo são mostrados na tabela no anexo 1.

5.2 Análise da presença da mutação/deleção do *IKAROS*

O RNA foi extraído com o reagente Trizol, produzido pela Invitrogen, (Califórnia, EUA) e o cDNA sintetizado utilizando primers oligo(dT) com o kit Superscript III Cells Direct cDNA synthesis, sintetizado pela Invitrogen, (Califórnia, EUA), conforme as especificações dos fabricantes.

As sequências de cDNA do *IKZF1* dos éxons 1 a 8 foram amplificadas por RT-PCR utilizando-se as sequências de primers sense 5'-AAAGCGCGACGCACAAATCC-3' e o primer antisense 5'-ATGGCGTTGTTGATGGCTTGGTC-3', sintetizados pela Exxtend Biotecnologia

Ltda (Campinas, Brasil) e Sigma-Aldrich (Texas, EUA), utilizando as sequências descritas por Tokunaga et al., 2013

Os controles endógenos utilizados foram *GUSB* (primer sense: GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT e primer antisense: CCGAGTGAAGATCCCCTTTT), com 100 pb, e *GAPDH* (primer sense: AGGGGTCTACATGGCAACTG e primer antisense: TGGAAGGACTCATGACCACA), com aproximadamente 800 pb, ambos sintetizado pela Invitrogen, (Califórnia, EUA).

A PCR foi realizado no aparelho Gene Amp® PCR System 9700 da Applied Biosystems, com os seguintes parâmetros: magnésio 0,5µL, tampão 2,5 µL, dNTP 0,5 µL, taq 0,2 µL primers IKZF1 0,5 µL cada (forward e reverse) e água 19,3 µL para completar 24 µL e posteriormente foi adicionado 1 µL do cDNA da amostra analisada em cada tubo. A temperatura de desnaturação foi 94° C por 3 minutos e após por mais 30 segundos, a temperatura de anelamento foi 64°C durante 30 segundos, e a de extensão 72°C por 1 minuto por 35 ciclos e a extensão final por 10 minutos.

O produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, visualizado sobre luz EV e fotografado. Para confirmação dos resultados parte das amostras foram reanalisadas em gel de acrilamida 8%.

A deleção no gene *IKZF1* foi classificada de acordo com o resultado do gel, sendo incluído inicialmente qualquer alteração do gene (alterações fortes e fracas, deleção total) e após, separadas somente as alterações consideradas fortemente positivas para a isoforma 6 ou para a isoforma 10. A classificação foi realizada de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 1: Classificação das alterações encontradas nas isoformas do *IKZF1*.

TIPO DE ALTERAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
Banda única de forte intensidade Ik6 ou Ik10 ou banda de forte intensidade Ik6 ou Ik10 mesmo com presença de outras isoformas associadas em menor intensidade	Forte
Banda Ik6 ou Ik10 de igual intensidade ou mais fraca em relação as outras isoformas	Fraca
Ausência de banda IK6 ou Ik10	Negativa
Não amplificou com controle positivo com controle endógeno GAPDH de 800 pdb (tamanho semelhante ao primer <i>IKZF1</i>)	Deleção total do gene

5.3 Análise do sequenciamento das amostras com alteração do *IKZF1* (Ik6 e Ik10)

Foram realizados sequenciamento direto amostras que evidenciaram alteração do *IKZF1* na RT-PCR, utilizando-se o primer sense 5'-GAGAATGGGCGTGCCTGTGAAA-3' e primer antisense 5'-CCGGAAGGCCCATGCTTTCCAA-3' (Exxtend Biotecnologia Ltda, Campinas, Brasil), como descrito por Tokunaga et al., 2013. Os produtos de PCR foram diretamente sequenciado utilizando *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e analisadas por software de análise de sequenciamento CHROMAS 2.6.5 (Technelysium Pty Ltd, EUA).

Os cromatogramas obtidos foram analisados através do Basic Local Alignment Search Tool¹, utilizando o programa BLAST (basic local alignment search tool), onde foi possível correlacionar com os dados do gene bank (gene *IKZF1*: NG_0344231.1 ou NC_0000007.14) com os dados do sequenciamento realizado.

5.4 Análise estatística

A sobrevida livre de eventos (SLE) foi calculada a partir da data do diagnóstico até o último acompanhamento ou o primeiro evento (sem remissão completa no final da indução, presença de recaída, neoplasia ou a morte por qualquer causa). A sobrevida livre de doença (SLD) foi calculada a partir da data da remissão até a data da recidiva ou óbito, excluindo-se os pacientes que não remitiram ou que tiveram óbito durante a terapia de indução e a sobrevida global (OS) foi a partir da data do diagnóstico até a data de morte por qualquer causa. Os cálculos de sobrevida foram realizados utilizando-se o método de curvas de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de *log rank*. O modelo de regressão de Cox foi utilizado para calcular o risco relativo para um dado evento, bem como para avaliar independência dos fatores prognósticos em análise multivariável. As diferenças proporcionais entre a presença de deleção do gene *IKZF1* e os critérios clínico-laboratoriais e biológicos (idade, número de glóbulos brancos ao diagnóstico, grupo de risco, imunofenótipo, morfologia da medula óssea e doença residual mínima ao

¹ Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 25/05/ 2018.

final da terapia de indução, subgrupo molecular, evento desfavorável e óbito) foram analisadas por teste exato de Fisher. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS 20.0 (IBM SPSS Statistics, EUA) e o nível de significância adotado foi de 5%.

6 RESULTADOS

Dos 99 pacientes com LLA de linhagem B, 49 foram do sexo masculino, 50 do sexo feminino. Desse total, 48 foram classificados como alto risco (26 apresentaram contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico $\geq 50.000/\text{dL}$, 33 apresentaram idade <1 ano ou ≥ 9 anos, 3 com $t(9;22)$, 7 apresentaram medula M2 ou M3 no final da indução e 10 apresentaram DRM+ ao final da terapia de indução). A pesquisa de DRM foi realizada como publicada anteriormente (Scrideli et al., 2009). A sobrevida livre de eventos em 5 anos para este grupo de pacientes foi de $70,7 \pm 4,7\%$ (Figura 11).

Figura 11: SLE dos pacientes do estudo diagnosticados como LLA de linhagem B.

Da amostra investigada, 88 eram CALLA positivo e desses, em 13 (14,7%) foram detectadas a $t(12;21)$. Nos pacientes com $t(12;21)$ alteração do *IKZF1* foi encontrada em 3 pacientes, sendo 1 com expressão forte da isoforma Ik6, 1 com expressão fraca de Ik6 e 1 com deleção total do gene. Expressão forte de Ik6 foi observada nos 3 pacientes com $t(9;22)$.

Nos 12 pacientes classificados como CALLA negativo, 5 apresentaram alterações do *IKZF1*: 3 deles com expressão forte Ik6, 1 com expressão forte Ik10 e 1 com expressão fraca Ik6.

Do total de pacientes diagnosticados com LLA de linhagem B cuja amostra colhida ao diagnóstico foi analisada para alterações do *IKZF1* (n=99), em 27 pacientes foram encontradas algum tipo de alteração. Em 15 pacientes foram observadas expressão forte das isoformas com deleção dominante negativo Ik6 ou Ik10 (sendo 13 da isoforma Ik6 e 2 da Ik10). Em 9 pacientes foi observada a expressão fraca da Ik6. Em 3 pacientes foram encontradas deleção total do gene (tabela 2).

Tabela 2: Tipos de expressão das isoformas detectadas nos pacientes do estudo.

N. pacientes	Expressão isoformas	IK6	IK10
15	Forte	13	2
9	Fraca	9	-
3	Deleção total	-	-
Total 27		21	2

A deleção total do gene foi confirmada através da não detecção da amplificação do gene *IKZF1* por RT-PCR e amplificação de gene de controle endógeno *GAPDH* com transcrito de tamanho semelhante ao *IKZF1*. Exemplos de amplificação forte, fraca das isoformas de domínio negativo e deleção total dos gene são mostradas nas figuras 12, 13 e 14. A figura 15 mostra a confirmação de amostras positivas no gel de acrilamida 8%.

Figura 12: Exemplos de amplificação única de forte intensidade da isoforma Ik6 (setas amarelas) e amplificação fraca de Ik6 em comparação as outras isoformas ativas (setas azuis).

Figura 13: Exemplo de amplificação única da isoforma Ik10 de forte intensidade (seta) e isoformas normais.

Figura 14: Presença de amplificação única da isoforma Ik6 de forte intensidade em amostra de LLA de linhagem T (seta).

Figura 15: Confirmação dos resultados no gel de acrilamida 8%, evidenciando amostras com presença de Ik6 (setas amarelas) e Ik10 (setas azuis).

Foram avaliados como controle 35 pacientes com LLA T-derivada e 2 pacientes sem classificação de imunofenótipo. Dos pacientes com LLA de linhagem T, 3 tiveram alterações do *IKZF1*, 2 apresentaram expressão forte da Ik6 e 1 apresentou deleção total do gene. Um dos pacientes com Ik6 teve recidiva com 19 meses do diagnóstico e foi a óbito, o outro paciente encontrava-se em remissão 30 meses após o diagnóstico (tabela 3). O paciente com deleção total do gene encontra-se em remissão há mais de 10 anos. Dos pacientes sem classificação de imunofenótipo, 1 foi excluído da curva de sobrevida por ter tido óbito nos primeiros dias do tratamento e outro apresentou expressão fraca do Ik6 e encontra-se em remissão clínica há mais de 10 anos. Entretanto devido ao baixo número de amostras na LLA T-derivada e baixo número de alterações, não foi possível chegar a conclusões, sendo essas amostras incluídas no estudo como controle do método.

Tabela 3: Avaliação das amostras controles com diagnóstico de LLA T-derivada.

N. pacientes	Alteração <i>IKZF1</i>	Evolução
32	Sem alterações	
1	Ik6 forte	óbito por recidiva
1	Ik6 forte	RCC 30 meses
1	Del total gene	RCC >10 anos

Sequenciamento automático foi realizado nas amostras que apresentaram as isoformas dominantes negativas e as mesmas foram confirmadas como Ik6 e Ik10 (figuras 16-17)

Figura 17: Sequenciamento evidenciando local do ponto de fusão dos éxons 1 e 8 devido deleção dos éxons de 2 a 7- forward (F) e reverse (R).

6.1 Análise univariada da sobrevida livre de eventos, sobrevida livre de doença e sobrevida global de acordo com variáveis clínicas e biológicas nas amostras de LLA de linhagem B

Foram analisados contagem de glóbulos brancos (GB) e idade ao diagnóstico, imunofenótipo (presença de CALLA positivo ou negativo), classificação de risco,

avaliação morfológica da medula óssea (MO) ao final da indução, status da DRM ao final da terapia de indução, a presença de qualquer deleção do *IKZF1* (Expressão fraca, expressão forte das isoformas Ik6 ou Ik10 ou deleção total do gene) e após, apenas a presença de expressão forte das isoformas com mutações dominante negativas Ik6 ou Ik10. Cada variável foi avaliada através das curvas de Kaplan-Meier e teste de log rank em relação a sobrevida livre de eventos (SLE), sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) (tabela 4)

Tabela 4: Sobrevida livre de eventos (SLE), Sobrevida livre de doença (SLD) e Sobrevida Global (SG) em 5 anos de acordo com as variáveis clínicas e biológicas nos pacientes com LLA de linhagem B.

VARIÁVEIS	SLE (5 anos)	SLD (5 anos)	SG (5 anos)
GB AO DIAGNÓSTICO			
GB < 50.000 (n=74)	74,1 ± 5,3 % (P=0,18)	75,2 ± 5,3 % (P= 0,843)	78,5 ± 5,0 % (P= 0,046)
GB ≥ 50.000 (n=25)	60 ± 9,8 %	75 ± 9,7 %	58,3 ± 10,1 %
IDADE AO DIAGNÓSTICO			
1 a 9 anos (n= 67)	77,5 ± 5,3 % (P=0,011)	78,7 ± 5,3 % (P= 0,146)	82,1 ± 4,6 % (P= 0,01)
<1 ou >9 anos (n= 32)	56,3 ± 8,8 %	66,7 ± 9,1 %	56,3 ± 8,8 %
IMUNOFENÓTIPO			
CALLA + (n= 87)	74,9 ± 4,8 % (P= 0,003)	78,6 ± 4,6 % (P= 0,014)	78,3 ± 4,6 % (P=0,001)
CALLA - (n= 12)	40 ± 14,6 %	48 ± 16,4 %	40,0 ± 14,6 %
RISCO			
BAIXO RISCO (n= 51)	79,1 ± 5,9 % (P= 0,073)	79,1 ± 5,6 % (P= 0,467)	85,3 ± 5,1 % (P= 0,008)
ALTO RISCO (n= 47)	61,3 ± 7,2 %	70,2 ± 7,2 %	60,3 ± 7,3 %
MO no D28			
< 5% BLASTOS (n= 88)	78,5 ± 4,5 % (P< 0,001)	79,4 ± 4,5 % (P< 0,001)	81,8 ± 4,3 % (P< 0,001)
> 5% BLASTOS (n= 6)	16,7 ± 15,2 %	16,7 ± 15,2 %	16,7 ± 15,2
DRM no D8			
NEGATIVO (n= 62)	83 ± 4,9 % (P< 0,001)	84,4 ± 4,8 % (P< 0,001)	86,4 ± 4,5 % (P< 0,001)
POSITIVO (n= 9)	22,2 ± 13,9 %	22,2 ± 13,9 %	22,2 ± 13,9 %
QUALQUER DELEÇÃO IKZF1			
NEGATIVA (n= 72)	75,8 ± 5,1 % (P= 0,15)	80,3 ± 4,9 % (P= 0,011)	79,9 ± 4,8 % (P= 0,003)
POSITIVA (n= 9)	56,9 ± 10 %	61,4 ± 10,3 %	56,9 ± 10,0 %
EXPRESSÃO FORTE IK6 OU IK10			
NEGATIVA (n= 84)	78,1 ± 4,6 % (P< 0,001)	83 ± 4,3 % (P< 0,001)	81,5 ± 4,3 % (P< 0,001)
POSITIVA (n= 15)	32 ± 12,5 %	34,3 ± 13,1 %	32,0 ± 12,4 %

Conforme mostrado na tabela 4, houve significância estatística para a SLE em relação a idade ao diagnóstico, imunofenótipo (ausência de CALLA), MO no D28, DRM no D28 e presença expressão forte das isoformas Ik6 ou Ik10 no modelo de análise univariável. Não houve significância estatística para a análise de qualquer deleção de *IKZF1*. As curvas de SLE de acordo com a presença de qualquer deleção ou expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 são mostradas nas figuras 18 e 19 respectivamente.

Figura 18: SLE em pacientes com LLA de linhagem B sem (negativo) ou com a presença de qualquer deleção do *IKZF1* (positivo).

Figura 19: SLE em pacientes com LLA de linhagem B com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene *IKZF1* (negativa).

Em relação a SLD, o imunofenótipo, MO no D28, DRM no D28 e tanto as avaliações de qualquer deleção do *IKZF1* como a avaliação separada apenas das isoformas com expressão forte mostraram-se com significância estatística, impactando diretamente na sobrevida livre de doença (tabela 4). As curvas de SLD de acordo com a presença de qualquer deleção ou expressão forte das isoformas *Ik6/Ik10* são mostradas nas figuras 20 e 21 respectivamente.

Figura 20: SLD em pacientes com LLA de linhagem B sem (negativa) ou com a presença de qualquer deleção do *IKZF1* (positiva).

Figura 21: SLD em pacientes com LLA de linhagem B com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene *IKZF1* (negativa).

No estudo comparando as variáveis com a sobrevida global, todos os fatores analisados mostraram ter impacto na sobrevida ($P < 0,05$) (Tabela 4). As curvas de SG de acordo com a presença de qualquer deleção ou expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 são mostradas nas figuras 22 e 23 respectivamente

Figura 22: SG em pacientes com LLA de linhagem B sem (negativa) ou com a presença de qualquer deleção do *IKZF1* (positiva).

Figura 23: SG em pacientes com LLA de linhagem B com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene *IKZF1* (negativa).

6.2 Impacto das deleções de *IKZF1* de acordo com o grupo de risco em LLA de linhagem B

6.2.1 Pacientes classificados como baixo risco

Nos pacientes classificados como de baixo risco ao diagnóstico, foi observada significância estatística apenas a SLD e a SG na presença da deleção forte do *IKZF1* com a presença das isoformas 6 ou 10 (tabela 5) (figuras 24 a 29).

Tabela 5: Sobrevida livre de eventos (SLE), Sobrevida livre de doença (SLD) e Sobrevida global (SG) em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco de acordo com a presença ou ausência de alterações do *IKZF1*.

TIPO DELEÇÕES <i>IKZF1</i>	DELEÇÕES <i>IKZF1</i>	SLE (5 anos)	SLD (5 anos)	SG (5 anos)
QUALQUER ALTERAÇÃO	AUSENTE (n= 38)	77,7 ± 7 % (P= 0,75)	77,7 ± 7 % (P= 0,75)	86,1 ± 5,8 % (P= 0,287)
	PRESENTE (n= 13)	83,1 ± 11%	83,1 ± 11 %	83,1 ± 7,4 %
EXPRESSÃO FORTE IK6/IK10	AUSENTE (n= 45)	81,2 ± 6 % (P= 0,49)	81,2 ± 6 % (P= 0,049)	88,2 ± 5 % (P= 0,007)
	PRESENTE (n= 6)	66,7 ± 19,2 %	66,7 ± 15,2 %	66,7 ± 19,2 %

Figura 24: SLE em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco sem (negativa) ou com a presença de qualquer deleção do *IKZF1* (positivo).

Figura 25: SLE em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco com expressão forte das isoformas *IK6/IK10* (positiva) em comparação com outras alterações do gene (negativa).

Figura 26: SLD em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco sem (negativa) ou com a presença de qualquer deleção do *IKZF1* (positivo).

Figura 27: SLD em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco com expressão forte das isoformas *IK6/IK10* (positiva) em comparação com outras alterações do gene (negativa).

Figura 28: SG em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco sem (negativa) ou com a presença de qualquer deleção do *IKZF1* (positivo).

Figura 29: SG em pacientes com LLA de linhagem B classificados como baixo risco com expressão forte das isoformas *IK6/IK10*(positiva) em comparação com outras alterações do gene (negativa).

6.2.2 Pacientes classificados como alto risco

Os pacientes classificados como de alto risco ao diagnóstico apresentaram significância estatística na SLE, SLD e SG tanto na presença de qualquer deleção de *IKZF1* bem como apenas nas expressões fortes das isoformas Ik6 ou Ik10 (Tabela 6)(figuras 30 a 35).

Tabela 6: Sobrevida livre de eventos (SLE), Sobrevida livre de doença (SLD) e Sobrevida global (SG) em pacientes com LLA de linhagem B classificados como de alto risco de acordo com a presença ou ausência de alterações do *IKZF1*.

TIPO DELEÇÕES <i>IKZF1</i>	DELEÇÕES <i>IKZF1</i>	SLE (5 anos)	SLD (5 anos)	SG (5 anos)
QUALQUER ALTERAÇÃO	AUSENTE (n= 33)	72,7 ± 7,8 % (P= 0,009)	82,8 ± 7 % (P= 0,003)	71,9 ± 7,9 % (P= 0,010)
	PRESENTE (n= 14)	34,3 ± 13,1%	40 ± 14,6 %	34,3 ± 13,1 %
EXPRESSÃO FORTE IK6 OU IK10	AUSENTE (n= 38)	73,7 ± 7,1 % (P< 0,001)	84,8 ± 6,2 % (P< 0,001)	73 ± 7,3 % (P<0,001)
	PRESENTE (n= 9)	11,1 ± 10,5 %	12,5 ± 11,7 %	11,1 ± 10,5 %

Figura 30: SLE em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco sem (negativo) ou com a presença de qualquer deleção do *IKZF1* (positivo).

Figura 31: SLE em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene *IKZF1* (negativa).

Figura 32: SLD em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco sem (negativo) ou com a presença de qualquer deleção do *IKZF1* (positivo).

Figura 33: SLD em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene *IKZF1* (negativa).

Figura 34: SG em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco sem (negativo) ou com a presença de qualquer deleção do *IKZF1* (positivo).

Figura 35: SG em pacientes com LLA de linhagem B classificados como alto risco com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (positiva) em comparação com outras apresentações do gene *IKZF1* (negativa).

6.3 A análise pela regressão de Cox comparou as variáveis estudadas

Foi observado uma menor SLE, SLD e SG em pacientes com expressão forte de *IKZF1* conforme mostrado na tabela 4 e figuras 18, 20 e 22. Análise multivariada por modelo de regressão de Cox, considerando as variáveis que se mostraram com significância em análise univariável, mostrou que expressão forte das isoformas com deleções dominante negativas Ik6/Ik10 foi o fator prognóstico independente mais importante (tabelas 8, 10 e 12). A variável qualquer deleção de *IKZF1*, se mostrou como fator prognóstico independente para SLD e SG (Tabelas 7, 9 e 11).

Tabela 7: Análise multivariável por modelo regressão de Cox para SLE com a presença de qualquer deleção de *IKZF1*.

	Valor de P	Risco relativo (RR)	95,0% de intervalo de confiança para RR	
			menor	maior
Idade	0,353	1,565	0,608	4,023
Imunofenótipo	0,799	1,090	0,561	2,118
MO no D28	0,758	1,314	0,231	7,492
DRM no 28	0,009	6,071	1,558	23,658
Qualquer deleção <i>IKZF1</i>	0,055	2,546	0,982	6,603

Tabela 8: Análise multivariável por regressão de Cox para SLE com a presença de expressão forte das isoformas com deleções domínio negativas *Ik6/Ik10*.

	Valor de P	Risco Relativo (RR)	95,0% de intervalo de confiança para RR	
			menor	maior
Idade	0,155	2,037	0,764	5,428
Imunofenótipo	0,602	0,834	0,423	1,646
MO no D28	0,869	1,155	0,210	6,345
DRM no D28	0,033	4,485	1,133	17,754
Expressão forte <i>Ik6/Ik10</i>	0,001	6,034	2,105	17,295

Tabela 9: Análise multivariável por regressão de Cox para SLD com a presença de qualquer deleção do *IKZF1*.

	Valor de P	Risco Relativo (RR)	95,0% de intervalo de confiança para RR	
			menor	maior
Imunofenótipo	0,689	1,153	0,574	2,319
MO no D28	0,630	1,546	0,263	9,095
DRM no D28	0,010	6,357	1,558	25,942
Qualquer deleção <i>IKZF1</i>	0,042	2,793	1,040	7,504

Tabela 10: Análise multivariável por regressão de Cox para SLD com a presença de expressão forte das isoformas com deleções domínio negativas *Ik6/Ik10*.

	Valor de P	Risco Relativo (RR)	95,0% de intervalo de confiança para RR	
			menor	maior
Imunofenótipo	0,845	0,931	0,453	1,913
MO no D28	0,794	1,271	0,210	7,683
DRM no D28	0,031	4,897	1,156	20,740
Expressão forte <i>Ik6/Ik10</i>	0,001	5,857	2,020	16,982

Tabela 11: Análise multivariável por regressão de Cox para SG com a presença de qualquer deleção do *IKZF1*.

	Valor de P	Risco Relativo (RR)	95,0% de intervalo de confiança para RR	
			menor	maior
Idade	0,221	2,279	0,610	8,514
GB ao diagnóstico	0,716	1,261	0,361	4,400
Imunofenótipo	0,817	1,095	0,507	2,363
Risco	0,794	0,798	0,147	4,344
MO no D28	0,754	1,358	0,201	9,185
DRM no D28	0,006	8,608	1,864	39,755
Qualquer deleção <i>IKZF1</i>	0,028	3,268	1,138	9,386

Tabela 12: Análise multivariável por regressão de Cox para SG com a presença de expressão forte das isoformas com deleções domínio negativas *Ik6/Ik10*.

	Valor de P	Risco Relativo (RR)	95,0% de intervalo de confiança para RR	
			menor	Maior
Idade	0,088	3,292	0,838	12,941
GB ao diagnóstico	0,740	1,246	0,341	4,544
Imunofenótipo	0,523	0,773	0,351	1,704
Risco	0,810	0,814	0,152	4,360
MO no D28	0,943	1,071	0,161	7,131
DRM no D28	0,017	6,639	1,410	31,260
Expressão forte <i>Ik6/Ik10</i>	<0,001	8,611	2,668	27,785

6.4 Associação entre alterações de *IKZF1* e variáveis clínicas e biológicas

A associação entre a presença das alterações de *IKZF1* e as variáveis idade ao diagnóstico (<1 ou ≥9 anos x entre 1 e 9 anos), número de glóbulos brancos ao diagnóstico (≥ 50.000/dL x >50.000/dL), imunofenótipo (CALLA negativo x CALLA positivo), grupo de risco (alto risco x baixo risco), status morfológico da medula óssea no final da indução (M2/M3 x M1), Doença residual mínima (DRM) ao final da indução (positiva versus negativa, evento (recidiva ou óbito x remissão clínica) e óbito (óbito x vivo) foi analisada pelo teste exato de Fisher. Além da presença de evento adverso e óbito foi evidenciando significado estatístico tanto com qualquer deleção do *IKZF1* como com a separação apenas de amostras com expressão forte das isoformas Ik6/Ik10, a presença de DRM no D28 esteve fortemente associada a expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 (Tabela 13).

Tabela 13: Associação entre a presença das alterações de *IKZF1* e as variáveis idade ao diagnóstico (<1 ou ≥9 anos x entre 1 e 9 anos), número de glóbulos brancos (GB) ao diagnóstico (≥ 50.000/dL x >50.000/dL), imunofenótipo (CALLA negativo x CALLA positivo), grupo de risco (alto risco x baixo risco), status morfológico da medula óssea (MO) no final da indução (M2/M3 x M1), Doença residual mínima (DRM) ao final da indução (positiva versus negativa, evento (recidiva ou óbito x remissão clínica) e óbito (óbito x vivo) (*teste exato de Fisher).

P (Bi-caudal)	IDADE	GB	CALLA	RISCO	MO D28	DRM D28	EVENTO	ÓBITO
QUALQUER ALTERAÇÃO DO <i>IKZF1</i>	0,637	0,616	0,297	0,822	1	0,116	0,014*	0,002*
EXPRESSÃO FORTE IK6 OU IK10	0,56	0,528	0,079	0,406	0,274	0,009*	<0,001*	<0,001*

7 DISCUSSÃO

Mullighan et al. (2009) estudaram uma coorte com crianças com LLA-B de alto risco para avaliarem possíveis causas de recidivas através de *single-nucleotide-polymorphism microarrays* (SNPM) e sequenciamento de amostras obtidas ao diagnóstico. Foram avaliadas inicialmente 221 crianças tratadas pelo estudo P9906 do *Children's Oncology Group* e excluídas as crianças com LLA de muito alto risco, como *BCR-ABL* positivo, hipodiploidia, leucemia do lactente. Mais de 50 alterações do número de cópias foram identificadas, a maioria relacionada a genes que regulam o desenvolvimento de células B com alterações do *PAX5* em 31,7% dos casos e do *IKZF1* em 28,6%. Foi identificado o *IKZF1* como sendo preditor de mau prognóstico, sendo esse resultado validado em outra coorte independente com 258 crianças com LLA-B.

Tokunaga et al. (2013), em um estudo com pacientes adultos com LLA-B, detectaram a presença de isoformas aberrantes em *IKZF1* usando a técnica RT-PCR, sendo encontrados na maioria desses pacientes isoformas com domínio negativo Ik6 e Ik10 (Figura 27). Foram avaliados 78 pacientes adultos com LLA e encontraram alterações do *IKZF1* em 41 casos (52,6%), sendo nos pacientes Ph-positivos 83,3% (20 de 24 casos) e nos pacientes Ph-negativos 38,9% (21 de 54 casos). Segundo os autores, os resultados mostram a frequência maior de alterações do *IKAROS* na população adulta, podendo, em partes, explicar o pior prognóstico na LLA-B no paciente adulto em relação ao pediátrico.

Figura 36: Deleção de diferentes isoformas de domínio negativo do gene *IKZF1*. Comportam-se como domínio-negativo IK6 e Ik10.

Fonte: Tokunaga et al. (2013, p. 203).

Asai et al. (2013) evidenciaram em um estudo feito no Japão com crianças com LLA (n=202) que a presença da deleção do *IKZF1* estava associada a redução tanto da SLE como da SG. Neste estudo, análises univariadas e multivariadas revelaram que a deleção de *IKZF1* foi um fator independente para SLE inferior em pacientes pediátricos. Os resultados mostraram uma SLE em 5 anos significativamente inferior (48,6% vs. 84,7%, log rank P = 0,0003) e SG (62,3% vs. 85,4%, log rank P = 0,009) para os pacientes com a presença da deleção (9,6% dos pacientes), concluindo que a estratificação precoce do risco em pacientes pediátricos com LLA deve ser baseada em um novo sistema de estratificação de risco, incluindo o status *IKZF1*.

Um estudo chinês realizado por Zou et al. (2015) avaliou 180 crianças com LLA-B e *BCR-ABL1* negativo e encontrou 27 casos (15%) de deleção do *IKZF1*, destas, quatro apresentavam deleções completas dos 8 éxons do gene, dezessete tinham deleção do exon 1, três tinham deleções dos éxons 4-7 e três crianças tinham deleções dos éxons 2-7. A SLE no grupo de deleção *IKZF1* era significativamente menor do que no grupo sem a deleção ($0,740 \pm 0,096$ vs $0,905 \pm 0,034$, P = 0,002). A análise de Cox mostrou que, após a exclusão de sexo, idade, contagem inicial de leucócitos, estado de líquido cefalorraquidiano na primeira visita,

resposta prednisona e cariótipo cromossômico, a deleção de *IKZF1* ainda afetou a SLE das crianças ($P < 0,05$).

Palmi et al. (2013) realizaram um estudo na Itália com 410 crianças com LLA e *BCR-ABL1* negativo e detectaram a presença da deleção do *IKZF1* em 13,2 % dos pacientes e evidenciaram um pior prognóstico nos pacientes com a alteração do gene. Aqueles com deleção de parte ou de todo o gene tiveram uma SLE inferior [70,2% (6,2) versus 85,2% (1,9) aos 5 anos, $P = 0,007$] e uma incidência cumulativa de recaída significativamente maior [24,2% (5,9) versus 13,1% (1,8) aos 5 anos, $P = 0,049$].

Um estudo realizado no Protocolo de LLA 05-001 (NCT00400946) do *Dana-Farber Cancer Institute* avaliou as características clínicas e resultados dos pacientes pediátricos (de 0 a 18 anos) com LLA Ph negativo. Dos 105 pacientes estudados, 15% (16) apresentaram fusão da classe ABL-1 (*ETV6-ABL1*: $n = 1$; *FOXP1-ABL1*: $n = 1$; *SFPQ-ABL1*: $n = 1$; *ZC3HAV1-ABL2*: $n = 1$) ou ativação da via *JAK-STAT* (*P2RY8-CRLF2*: $n = 8$; *PAX5-JAK2*: $n = 4$). Desses 16 pacientes, 69% (11) apresentaram deleção do *IKZF1* e foi associado com SLE inferior (TRAN et al., 2018).

Nakase et al. (2000), em um estudo japonês, avaliaram a presença de alterações dos genes da família Ikaros: *IKZF1* e *Aiolos* (*IKZF3*) na medula óssea de 46 pacientes adultos com LLA (41 LLA-B e 5 LLA-T) e observaram a hiperexpressão de Ik6 em 14 pacientes com LLA-B. O estudo foi realizado por RT-PCR e os resultados confirmados por sequenciamento e imunoblotting. Não encontraram alterações nos casos de LLA-T e não detectaram hiperexpressão de isoformas negativas de *Aiolos* nesses pacientes (identificados em estudos com ratos com comportamento de gene supressor de tumor em células B).

Um estudo realizado na China por Zhou et al. (2011) com 88 crianças com diagnóstico de LLA foi detectado por PCR e confirmado por sequenciamento a presença do aumento da expressão da isoforma 6 em 8 (11,43%) dos 70 casos de LLA-B e em 1 (5,56%) caso de 18 LLA T-derivada, associados com o aumento de DRM do D28 da indução (37,5% dos pacientes Ik6+ e 4,8% nos pacientes Ik6-) e alto risco de recidiva.

Liu et al. (2012) realizaram um estudo com pacientes adultos com leucemia na China. As isoformas dominantes negativas (DN) foram encontradas superexpressas na LLA-B Ph + em 57,9% dos casos (11/19) em comparação com a

LLA-B Ph- com 8,3% dos casos (2/24; $P= 0,001$) e LLA de linhagem T(0/19). Além disso, as isoformas DN foram detectadas em 21,1% (4/19) dos casos de LMC com crise blástica (1/13 mielóide, 2/4 linfóide e 1/2 misturado). Ik6 foi o mais frequente: 90,9% (10/11) na LLA-B Ph e 50,0% (2/4) na LMC com crise blástica. A Ik10 foi encontrada em 1 dos 11 LLA-B Ph + e 2 (um linfóide e um misto) dos 4 LMC em crise blástica. As isoformas de DN eram mais altamente expressa em crise blástica linfóide e mista (3/6; 50,0%) em comparação com crise blástica mielóide (1/13; 7,7%). Nesse estudo os pacientes com LLA com isoformas DN apresentaram menor taxa de remissão clínica após terapia de indução (30,8 x 74,4%, $P= 0,008$).

Kobitzsch et al. (2017) avaliaram 482 pacientes adultos com LLA-B *BCR-ABL1* negativos, tratados pelo estudo GMALL e detectaram alterações do *IKZF1* em 128 casos (27%). O estudo foi realizado por RT-PCR para detectar as isoformas (figura 28) e os resultados confirmados por MLPA. Enquanto 91(19%) apresentaram apenas um tipo de deleção, em 37 pacientes (8%) foram detectadas mais de um tipo de deleção. A deleção de dois ou mais éxons de 4 a 6 foram consideradas isoformas dominantes negativas por apresentarem retenção do domínio de dimerização. A perda do éxon 2 com o códon de início ATG abole a transcrição gênica e a perda do éxon 8 remove o domínio de dimerização, sendo utilizado o termo “perda de função” para as deleções que envolvem esses éxons. A alteração mais frequente encontrada foi a deleção dos éxons 4 a 7 (Ik6) em 71 casos, porém, nesse estudo, não mostrou efeito na sobrevida global (0,54 vs 0,56; $P=0,95$), enquanto as alterações que causam a “perda de função”, como as deleções dos éxons 2 a 7 (Ik10) encontradas em 47 pacientes, deleções dos éxons 4 a 8 em 26 pacientes, dos éxons 2 a 3 em 19 pacientes e dos éxons 2 a 8 em 19 pacientes tiveram redução na sobrevida global (0,37 vs 0,59; $P= 0,0012$). A deleção do *IKZF1* não foi associada com idade, sexo, GB ao diagnóstico ou grupo de risco classificado pelo GMALL. As deleções do *IKZF1* foram caracterizadas em forte e fraca de acordo com a intensidade no gel. A “perda da função do gene” com intensidade forte mostrou a redução da curva de sobrevida, enquanto a deleção fraca não teve impacto prognóstico.

Figura 37: RT-PCR com primers dos éxons de 1 a 8 evidenciando aumento da *Ik6* nas linhas 4 a 6 e aumento de *Ik10* nas linhas 6 a 8 e abaixo o aumento de *Ik10* com expressão forte e fraca.

Fonte: Kobitzsch et al. (2017, p.1741).

Ou et al. (2017) analisaram 21 pacientes (6 crianças, 7 adolescentes e 8 adultos) com LLA-B para detectarem a presença de deleção do *IKZF1* por aCGH e encontraram alterações em 9 pacientes (43%). Três pacientes apresentaram rearranjos macroscópicos do cromossomo 7, dois dos quais foram observados por análise de bandas G e em seis pacientes foram encontrados deleções de éxons, um paciente com deleção dos éxons de 2 a 7, dois pacientes de 2 a 8, dois pacientes de 4 a 7 e um paciente com deleção de éxon 1. A análise por FISH confirmou oito das nove deleções, apenas não detectou a deleção única do éxon 1. Nesse estudo aproximadamente 90% das deleções podem ser confirmadas por FISH.

A avaliação dos crianças com LLA- B tratadas pelo protocolo Total XV do *St Jude* entre 2000 e 2007 evidenciaram 11,6% de casos *BCR-ABL1*-like. , sendo 27% desses casos com a presença de alterações do *IKZF1*. Esses pacientes apresentaram altos níveis de DRM no D19 e muitos mantiveram DRM positiva no final da indução em relação aos outros pacientes com LLA-B. Este estudo demonstra que o prognóstico adverso da LLA *BCR-ABL1*-like pediátrica pode ser melhorado com uma terapia eficaz dirigida ao risco com base principalmente nos níveis de DRM durante e no final terapia de indução da remissão, pois apesar desses pacientes terem tido inferior resposta a indução da remissão, eles não apresentaram SLE

significativamente inferior. 15% dos pacientes BCR-ABL like foram encaminhados ao TCTH enquanto apenas 4,3% dos outros pacientes com LLA-B foram encaminhados, sendo ambos tratados com o mesmo protocolo (ROBERTS et al., 2014).

Em estudo mexicano realizado por Reyes-León et al. (2015) com 99 crianças com LLA-B foram encontradas 23 com expressão das isoformas Ik6 ou Ik8, realizadas por RT-PCR, porém a análise univariada não mostrou diferença estatística com recaída, óbito ou resposta a prednisona nesse grupo. A SG mostrou-se inferior (58% x 66%), porém não foi estatisticamente significativa ($p=0,531$).

Um estudo no México com 16 pacientes detectou por MLPA alteração do *IKZF1* em 7 pacientes (43%) com idade entre 13 e 60 anos. Apesar do n pequeno, os autores concluem que a deleção do *IKZF1* pode estar relacionada com pior prognóstico e maior probabilidade de falha terapêutica, além da possibilidade de ser mais frequente na população mexicana (RUIZ-DELGADO et al, 2016). O resumo dos resultados obtidos em pacientes adultos e pediátricos com LLA e alterações do gene *IKZF1* é mostrado na tabela 14.

Estudos recentes experimentais em ratos com LLA-B mostraram que as alterações de *IKZF1* têm múltiplos efeitos, incluindo a parada da diferenciação, o desvio da diferenciação da leucemia mielóide para linfóide e nas leucemias Ph+ confere resistência aos ITKs. Estes efeitos são em parte mediados pela aquisição de uma alteração aberrante nas células tronco hematopoiéticas acompanhadas por indução da expressão na superfície celular de células tronco e moléculas de adesão que medeiam invasão extravascular e residência no nicho e ativação de vias de sinalização de integrinas. Estes efeitos podem ser explorados em futuras pesquisas para o estudo de novas terapêuticas (CHURCHMAN; MULLIGHAN, 2017).

Nossos dados foram condizentes com a literatura, mostrando a pior resposta ao tratamento ou recidiva nos pacientes em que foi detectada a presença da deleção do *IKZF1*.

Nas amostras positivas foram encontradas as isoformas com domínio negativo em Ik6 ($n=13$) ou Ik10 ($n=2$), semelhante ao estudo na população adulta com LLA-B realizada por Tokunaga et al. (2013) e estudos na população pediátrica (MULLIGHAN, 2009; ZHOU et al, 2011; PALMI et al, 2013; ZOY et al, 2015 TRAN et al, 2018).

Dupuis et al. (2013) compararam a identificação de deleções do *IKZF1* por diferentes técnicas em pacientes adultos e pediátricos com LLA-B (n=139), e neste estudo, a RT-PCR identificou maior número de isoformas iK6 quando comparadas com MLPA ou com ensaio de PCR genômico.

O estudo sugere que o uso de técnica simplificada e de baixo custo para análise de deleções do gene *IKZF1* por RT-PCR é capaz de detectar pacientes com maior risco de recidiva, com resultados semelhantes aos encontrados nos estudos que utilizaram MLPA. A utilização da deleção do *IKZF1* na estratificação de risco ao diagnóstico em novos protocolos de tratamento pode intensificar o tratamento por prever riscos de recaídas ou falhas de resposta a terapia de indução. Estudos multicêntricos com maior número de casos são necessários para confirmação destes resultados.

De forma semelhante ao observado no presente estudo, a presença de deleção de *IKZF1* tem sido associada a presença de DRM ao final da indução em diferentes estudos publicados (PALMI et al, 2013; TRAN et al, 2018).

A presença de maior expressão de Ik6/ik10 esteve associado a pior sobrevida global tanto em pacientes classificados como baixo risco, quando naqueles classificados como alto risco.

Devido ao número pequeno de amostras de LLA T-derivada analisadas, o impacto das 3 alterações encontradas (2 deleções fortes *IKZF1* e 1 deleção total do gene) não foi possível de ser avaliado. Os casos de LLA T-derivada foram utilizados como controle do método, e a baixo número de alterações estão de acordo com a literatura que evidencia a alteração do gene ser mais frequentemente encontrada nos casos de LLA B-derivada (DORGE et al, 2013).

O resultados desse estudo poderão ser utilizado para direcionar futuros protocolos de tratamentos de LLA B-derivadas no país. A possibilidade de incluir a investigação da presença de deleções do *IKZF1* ao diagnóstico poderá mudar a classificação de risco dos pacientes e poderá ter um impacto melhor na curva de SLE, SLD e SG nos grupos de pacientes com expressão forte das isoformas 6 e 10.

É importante salientar que nosso estudo apresentou algumas limitações importantes. O número amostral foi relativamente pequeno e foram analisados pacientes nos quais o protocolo utilizado (GBTLI-99) não previa mudança de risco ou intensificação do tratamento com base nos níveis de doença residual mínima. No protocolo mais recente (GBTLI-2009) está prevista a intensificação do tratamento e

eventualmente transplante de células tronco hematopoiéticas com base nos níveis de DRM. Como observamos uma forte associação entre presença de expressão forte das isoformas Ik6/Ik10 com doença residual mínima no final da terapia de indução, seria fundamental observar se a intensificação do tratamento nestes pacientes alterou o impacto prognóstico das alterações do *IKZF1*.

Pelos motivos expostos acima, acreditamos que nossos dados devam ser vistos com cautela e que a validação destes resultados em amostras independentes, em um número maior de casos e submetidos a protocolos que modificam a estratificação e tratamento com base nos níveis de doença residual mínima é necessária para avaliar o real impacto das alterações do gene *IKZF1* em crianças com LLA.

Tabela 14: Tabela comparativa de estudo que analisaram alterações do gene *IKZF1* em pacientes com LLA.

Autor	Local	pacientes	n	Resultados	prognóstico	técnica
ASAI, 2013	Japão	LLA pediátrica Ph -	202	9,4% deleção IKZF1	pior prognóstico	MLPA
KOBITZSCH, 2017	Alemanha	LLA adulto Ph-	482	27% deleções IKZF1	pior prognóstico as isoformas que cursam com perda da função do gene	RT-PCR e MLPA
LIU, 2012	China	LLA adulto		57,9% isoformas DN na LLA Ph+ e 8,3% LLA Ph-	pior prognóstico	RT-PCR
MULLIGHAN, 2009	EUA	LLA pediátrica Ph -	221		pior prognóstico	SNPM
NAKASE, 2000	Japão	LLA adulto	46	30,4% expressão Ik6		RT-PCR
OU, 2017	EUA	LLA ped e adulto	21	43% deleção IKZF1		aCGH e FISH
PALMI, 2013	Itália	LLA pediátrica Ph -	410	13,2 % deleção IKZF1	pior prognóstico	MLPA
REYÉS-LEÓN, 2015	México	LLA pediátrica Ph -	99	16,2% expressã Ik6 ou Ik8	sem diferença	RT-PCR
ROBERTS, 2014	St Jude	LLA pediátrica Ph -	344	11,6% deleção IKZF1	sem diferença	SNMP
RUIZ-DELGADO, 2016	México	LLA ped e adulto	16	43% deleção IKZF1	possível pior prognóstico	MLPA
TOKUNAGA, 2013	Japão	LLA adulto	78	52,5% alteração IKZF1 (83,3% Ph+ e 38,9% Ph-)	----	RT-PCR
TRAN, 2018	Dana-Farber Cancer Institute	LLA pediátrica Ph -	105	15%(16) LLA Ph-like,11 com deleção IKZF1	pior prognóstico	MLPA
ZHOU, 2011	China	LLA pediátrica Ph -	88	11,43% Ik6+ em LLA-B e 5,56% Ik6+ em LLA-T	pior prognóstico	RT-PCR
ZOY, 2015	China	LLA pediátrica Ph -	180	15% alteração IKZF1	pior prognóstico	MLPA

8 CONCLUSÕES

Através de técnica simplificada usando RT-PCR (*reverse-transcription-polymerase chain reaction*) foi possível analisar amostras consecutivas de LLA ao diagnóstico. Foi encontrado nesse estudo 27 alterações do gene *IKZF1* em 100 amostras de LLA de linhagem B e em 3 de 35 LLA T estudadas .

Dessas 27 amostras de LLA B-derivada, em 15 foi encontrada expressão forte das isoformas de mutação de domínio negativo Ik6 (n=13) e Ik10 (n=2) do gene *IKZF1*. A avaliação da presença e intensidade de expressão destas isoformas foi avaliada pela eletroforese em gel e confirmada por sequenciamento direto.

A hiperexpressão das isoformas dominantes negativas Ik6 e Ik10 estiveram associadas significativamente a menor SLE, SLD e SG nas LLAs de linhagem B ($P<0,001$). Não foi possível analisar o impacto destas mutações nas LLA T devido ao baixo número de casos com tais alterações.

A análise da associação da presença das alterações do gene *IKZF1* com as variáveis clínicas e biológicas: idade, número de glóbulos brancos ao diagnóstico, imunofenótipo, status da medula óssea ao final da indução, doença residual mínima ao final da indução, evento desfavorável e óbito mostrou que as variáveis que foram significativamente associadas com alteração do *IKZF1* (expressão forte das isoformas Ik6/Ik10) foram doença residual mínima positiva ao final da indução, presença de evento desfavorável e óbito.

9 REFERÊNCIAS

AMPATZIDOU, M. et al. ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): The spectrum of clonal heterogeneity and its impact on prognosis. **Cancer Genetics**, v. 224-225, p. 1-11, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2018.03.001>>. Acesso em: 12 mai. 2018.

ASAI, D. et al. *IKZF1* deletion is associated with a poor outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Japan. **Cancer Medicine**, Japão, v. 2, n. 3, p. 412-419, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cam4.87>>. Acesso em: 4 mar. 2018.

BOER, J. M. et al. Tyrosine Kinase fusion genes in pediatric BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**, Holanda, v. 8, n. 3, p. 4618-4628, 2017. Disponível em: <[http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=13492&path\[\]=44817](http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=13492&path[]=44817)>. Acesso em: 8 abr. 2018.

BRANDALISE, S. R. et al. Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: randomized trial from the Brazilian Childhood Cooperative Group--protocol ALL-99. **Journal of Clinic Oncology**, Brasil, v. 28, n. 11, p. 1911-1918, 2010. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2009.25.6115>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

BUITENKAMP, T. D. et al. Outcome in children with Down's syndrome and acute lymphoblastic leukemia role of *IKZF1* deletions and *CRLF2* aberrations. **Leukemia**, v. 26, p. 2204-2211, 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/leu201284>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

CHEN, I. M. et al. Outcome modeling with *CRLF2*, *IKZF1*, *JAK*, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. **Blood**, v. 119, n. 15, p. 3512-3522, 2012. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/119/15/3512?sso-checked=true>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

CHIARETTI, S. et al. Rapid identification of BCR/ABL1-like lymphoblastic leukaemia patients using a predictive statistical model based on quantitative real time-polymerase chain reaction: clinical, prognostic and therapeutic implications. **British Journal of Haematology**, v. 181, n. 5, p. 642-652, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15251>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

CHURCHMAN, M. L. et al. Efficacy of Retinoids in *IKZF1*-Mutated *BCR-ABL1* Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Cell**, v. 28, n. 3, p. 343-356, 2015. Disponível em: <[https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(15\)00268-8](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(15)00268-8)>. Acesso em: 12 mar. 2018.

CHURCHMAN, M. L.; MULLIGHAN, C. G. Ikaros: exploiting and targeting the hematopoietic stem cell niche in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. **Experimental Hematology**, Memphis, v. 46, p. 1-8, 2017. Disponível em: <[https://www.exphem.org/article/S0301-472X\(16\)30703-2/pdf](https://www.exphem.org/article/S0301-472X(16)30703-2/pdf)>. Acesso em: 20 abr. 2018.

CLAPPIER, E. et al. *IKZF1* deletion is an independent prognostic marker in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, and distinguishes patients benefiting from pulses during maintenance therapy: results of the EORTC Children's Leukemia Group study 58951. **Leukemia**, v. 29, n. 11, p. 2154-2161, 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/leu2015134>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

DEN BOER, M. L. et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. **Lancet Oncol**, v. 10, p. 125-134, 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204508703395>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

DORGE, P. et al. *IKZF1* deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. **Haematologica**, v. 98, n. 3, p. 428-432, 2013. Disponível em: <<http://www.haematologica.org/content/98/3/428>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

DUPUIS, A. et al. Biclonal and biallelic deletions occur in 20% of B-ALL cases with *IKZF1* mutations. **Leukemia**, v. 27, p. 503-507, 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/leu2012204>> Acesso em: 22 de mar. 2018.

GREAVES, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Reviews Cancer** [online], 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41568-018-0015-6>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

HARRISON, C. J. Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. **Hematology**, v. 2013, n. 1, p. 118-125, 2013. Disponível em: <<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2013/1/118.full.pdf+html>>. Acesso em: 12 mai. 2018.

HAN, J. et al. Ikaros 6 protects acute lymphoblastic leukemia cells against daunorubicin-induced apoptosis by activating the Akt-FoxO1 pathway. **Journal of Leukocyte Biology**, v.101, n. 3, p.675-681, 2017. Disponível em: <<https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1189/jlb.2A0116-040RR>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

HARVEY, R. C. et al. Rearrangement of *CRLF2* is associated with mutation of *JAK kinases*, alteration of *IKZF1*, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 26, p. 5312-5321, 2010. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/115/26/5312?sso-checked=true>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukemia in children. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 1541-1552, 2015. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1400972>>. Acesso em: 15 abr. 2018.

IACOBUCCI, I. et al. Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on7p12 in the *IKZF1* gene in a large cohort of *BCR-ABL1*-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). **Blood**, v. 114, n. 10, p. 2159–2167, 2009. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/114/10/2159>>. Acesso em: 21 abr. 2018.

IMAMURA, T. et al. Characterization of pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with kinase fusions in Japan. **Blood Cancer Journal**, v. 6, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/bcj201628>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

INABA, H. et al. Acute lymphoblastic leukemia. **Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943-1955, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673612621874>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

INBAR, T. et al. Which patients should I transplant with acute lymphoblastic leukemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 30, n. 3, p. 249-260, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521692617300221>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

JOHN, L. B.; WARD, A. C. The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 9-10, p. 1272–1278, 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589011000988>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

KANG, I. et al. Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 7, p. 1394-1405, 2009. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/115/7/1394?sso-checked=true>>. Acesso em: 29 mar. 2018.

KATZ, A. J. et al. Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival and disease burden. **Cancer Causes Control**, v. 26, n. 11, p. 1627-1642, 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10552-015-0657-6>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

KOBITZSCH, B. et al. Loss-of-function but not dominant-negative intragenic *IKZF1* deletions are associated with an adverse prognosis in adult *BCR-ABL*-negative acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 102, n. 10, p. 1739-1747, 2017. Disponível em: <<http://www.haematologica.org/content/102/10/1739>>. Acesso em: 30 abr. 2018.

KUIPER, R. P. et al. *IKZF1* deletions predict relapse uniformly treated pediatric precursor B-ALL. **Leukemia**, v. 24, n. 7, p. 1258–1264, 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/leu201087>>. Acesso em: 9 fev. 2018.

LIU, P. et al. Expression of dominant-negative ikaros isoforms and associated genetic alterations in Chinese adult patients with leukemia. **Annals of Hematology**, v. 91, n. 7, p. 1039-1049, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00277-012-1415-4>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

MAESE, L. et al. How is the Ph-like being incorporates into ALL therapy? **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 30, n. 3, p. 222-228, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521692617300166>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

MARKE, R. et al. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 103, n. 4, p. 565-574, 2018. Disponível em: <<http://www.haematologica.org/content/103/4/565>>. Acesso em: 2 mai. 2018.

MARTINELLI, G. et al. *IKZF1* (*Ikaros*) deletions in *BCR-ABL1*-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMAAL WP report. **Journal of Clinic Oncology**, v. 27, n. 31, p. 5202–5207, 2009. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.21.6408>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

MERKENSCHLAGER, M. *Ikaros* in immune receptor signaling, lymphocyte differentiation, and function. **FEBS Lett**, v. 584, n. 4, p. 4910–4914, 2010. Disponível em: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/j.febslet.2010.09.042>>. Acesso em: 7 abr. 2018.

MI, J-Q. et al. Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia en China (II): prognosis related to genetic abnormalities in a series of 1091 cases. **Leukemia**, v. 26, n. 7, p.1507-1516, 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/leu201223>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

MULLIGHAN, C. G. et al. *BCR-ABL1* lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of *Ikaros*. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 110–114, 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature06866>>. Acesso em: 2 mar. 2018.

MULLIGHAN, C. G. et al. Deletion of *IKZF1* and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 470-480, 2009. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa0808253>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

MULLIGHAN, C. G.; DOWNING, J. R. Genome-wide profiling of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia: recent insights and future directions. **Leukemia**, v. 23, n. 7, p. 1209-1218, 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/leu200918>>. Acesso em: 11 mar. 2018.

MULLIGHAN, C. G. New Strategies in Acute Lymphoblastic Leukemia: Translating Advances in Genomics into Clinical Practice. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 3, p. 396-400, 2011. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/17/3/396>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

MULLIGHAN, C. G. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 10, p. 3407-3415, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3461902/>>. Acesso em: 12 abr. 2018.

MULLIGHAN, C. G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. **American Society of Hematology Education Program**, p. 389-396, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2012.1.389>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

NAKASE, K. et al. Dominant Negative Isoform os the Ikaros Gene in Patients with Adult B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Research**, v. 60, n. 15, p. 4062-4065, 2000. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/15/4062>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

OFRAN, Y.; IZRAELI, S. BCR-ABL (Ph)-like acute leukemia – Pathogenesis, diagnosis and therapeutic options. **Blood Reviews**, v. 31, n. 2, p. 11-16, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X16300741>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

OLSSON, L. et al. The clinical impact of *IKZF1* deletions in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is independent of minimal residual disease stratification in Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology treatment protocols used between 1992 and 2013. **British Journal of Haematology**, v. 170, n. 6, p. 847-858, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/bjh.13514>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

OU, Z. et al. The genomic landscape of *PAX5*, *IKZF1* and *CDKN2A/B* alterations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 150, n. 3-4, p. 242-252, 2017. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Abstract/456572>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

PALMI, C. et al. What is the relevance of *Ikaros* gene deletions as a prognostic marker in pediatric Philadelphia-negative precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 98, n. 8, p. 1226-1231, 2013. Disponível em: <<http://www.haematologica.org/content/98/8/1226>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

PUI, C. H. et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 551-565, 2011. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.30.7405>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

PUI, C.H. et al. A revised definition for cure of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 28, n. 12, p. 2336-2343, 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/leu2014142>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

PUI, C.H. et al. Philadelphia Chromosome-like Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**, v. 17, n. 8, p. 464-470, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S215226501730589X>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

RESHMI, C. S. et al. Targetable kinase gene fusions in high-risk B-ALL: a study from the Children's Oncology Group. **Blood**, v. 129, n. 25, p. 3352-3361, 2017. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/129/25/3352?sso-checked=true>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

REYES-LEÓN, A. et al. Expression of Ik6 and Ik8 isoforms and their association with relapse and death in mexican children with acute lymphoblastic leukemia. **PLoS One**, México, v. 10, n. 7, jul. 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130756>>. Acesso em: 15 abr. 2018.

ROBERTS, K. G. et al. Outcomes of Children with *BCR-ABL*-like acute lymphoblastic leukemia treated with risk-directed therapy based on the levels of minimal residual disease. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 27, p. 3012-3020, 2014. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.55.4105>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

ROBERTS, K. G. The biology of Philadelphia chromosome-like ALL. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 30, n. 3, p. 212-221, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521692617300208>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

RUIZ-DELGADO, G. J. et al. IKAROS gene deleted B-cell acute lymphoblastic leukemia in mexican mestizos: observations in seven patients and a short review of the literature. **Revista de Investigação Clínica**, v. 68, n. 4, p. 210-214, 2016. Disponível em: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2016/nn164h.pdf>>. Acesso em: 2 mar. 2018.

RUSSELL, L. J. et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, *CRLF2*, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2688-2698, 2009. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/114/13/2688?sso-checked=true>>. Acesso em: 5 abr. 2018.

SCRIDELI, C. A. et al. A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. **Haematologica**, v. 94, n. 6, p. 781-789, 2009. Disponível em: <<http://www.haematologica.org/content/94/6/781>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

SMITH, L. et al. Long-term survival after childhood acute lymphoblastic leukaemia: population-based trends in cure and relapse by clinical characteristics. **British Journal of Haematology**, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15424>>. Acesso em: 8 abr. 2018.

SUN, W. et al. Outcome of children with multiply relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia: a therapeutic advances in childhood leukemia & lymphoma study. **Leukemia**, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41375-018-0094-0.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

TIJCHON, E. et al. B-lineage transcription factors and cooperating gene lesions required for leukemia development. **Leukemia**, v. 27, n. 3, p. 541–552, 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/leu2012293>>. Acesso em: 12 abr. 2018.

TOKUNAGA, K. et al. High Frequency of *IKZF1* genetic alterations in adult patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. **European Journal of Haematology**, v. 91, n. 3, p. 201-208, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ejh.12155>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

TRAN, H. T. et al. Prognostic impact of kinase-activating fusions and *IKZF1* deletions in pediatric high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Blood Advances**, v. 2, n. 5, p. 529-533, 2018. Disponível em: <<http://www.bloodadvances.org/content/2/5/529?sso-checked=true>>. Acesso em: 2 mai. 2018.

VSHYUKOVA, V. et al. Expression of aberrantly spliced oncogenic Ikaros isoforms coupled with clonal *IKZF1* deletions and chimeric oncogenes in acute lymphoblastic leukemia. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 71, p. 29-38, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/1-s2.0-S1079979618300548/first-page-pdf>>. Acesso em: 12 mai. 2018.

WANG, L. et al. *Ikaros* transcripts Ik6/10 and levels of full-length transcript are critical for chronic myeloid leukaemia blast crisis transformation. **Leukemia**, v. 28, p. 1745-1747, 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/leu201499>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

YEOH, A. E. et al. Effective response metric: a novel tool to predict relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia using time-series gene expression profiling. **British Journal of Haematology**, v. 181, n. 5, p. 653-663, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15252>>. Acesso em: 9 mai. 2018.

YOSHIDA, T.; GEORGOPOULOS, K. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. *Int J Hematol*, v. 100, n. 3, p. 220-229, 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12185-014-1644-5>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

ZHOU, F. et al. Expression of *ikaros* isoform 6 in chinese children with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 33. n. 6, p. 429-432, 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/leu201499>>. Acesso em: 24 mar. 2018.

ZOU, Y. et al. Significance of *IKZF1* gene copy number abnormalities in *BCR/ABL*-negative B-lineage acute lymphoblastic leukemia in children. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi**, v. 17, n. 11, p. 1154-1159, 2015.

10 ANEXOS

ANEXO1: Tabela dos pacientes que entraram no estudo

amostra	deleção <i>IKZF1</i>	Tipo de deleção	Idade	sexo	GB diagn	imunofeno	molecular	risco	MO D28	DRM D28	status	SLE (m)	SG (m)
1	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	2	1	1	3		2	1	1	recidiva/obito	108	110
2	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	1	2	1	1	t(12;21)	1	1	1	recidiva/obito	68	114
3	neg	n	2	1	1	1		2	1	1	RCC	100	100
4	neg	n	1	1	2	2		2	1	1	RCC	175	175
5	neg	n	2	1	2	2		2	1	2	RCC	171	171
6	del total gene	del	1	1	2	2		2	1	1	RCC	173	173
7	neg	n	1	2	1	1	t(12;21)	1	1	1	RCC - TRANSF	6	6
8	positivo fraco (300pb)	expressão fraca Ik6	2	2	2	3		2	3	3	obito-sepse	0	0
9	neg	n	1	1	1	1		1	1	1	RCC	169	169
10	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	2	1	2	1	T(9;22)	2	2	2	s/ remissão	0	1
11	neg	n	2	2	2	3		2	3	3	obito/sepse	0	0
12	positivo fraco (300pb)	expressão fraca Ik6	1	1	1	1	T(12;21)	1	1	1	RCC	160	160
13	neg	n	1	2	1	1		1	1	1	RCC	151	151
14	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	1	2	2	1		2	2	2	obito	21	21
15	positivo fraco (300pb)	expressão fraca Ik6	1	2	1			1	1	1	RCC	120	120
16	neg	n	1	2	1	1		1	1	1	RCC	25	73
17	neg	n	1	1	1	1		1	1	1	RCC	23	71
18	neg	n	2	1	1	1		2	1	1	RCC	145	145
19	neg	n	1	2	1	1		1	1	1	RCC	138	138
20	neg	n	1	1	2	1		2	1	1	RCC	138	138
21	neg	n	1	1	1	1		1	1	1	RCC	46	46
22	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	1	2	1	1	T(9;22)	2	1	1	obito	46	47

amostra	deleção <i>IKZF1</i>	Tipo de deleção	Idade	sexo	GB diagn	imunofeno	molecular	risco	MO D28	DRM D28	status	SLE (m)	SG (m)
23	neg	n	2	2	1	1		2	1	1	RCC	120	120
24	neg	n	1	1	2	1	T(12;21)	2	1	1	RCC	139	139
25	neg	n	1	2	2	1	t(12;21)	2	1	1	RCC	138	138
26	neg	n	2	2	1	2		2	1	1	RCC	4	4
27	neg	n	1	1	2	2		2	1	1	RCC	129	129
28	neg	n	2	2	1	1		2	1	1	RECIDIVA	26	32
29	neg	n	1	1	1						obito	0	0
30	positivo (100 pb)	expressão forte Ik10	1	2	1	1		1	1	1	RCC	123	123
31	neg	n	1	1	1	1		1	1	1	RCC	112	112
32	neg	n	1	2	1	1		1	1	1	RCC	128	128
33	neg	n	1	1	1	2		2	1	1	RCC	116	116
34	neg	n	2	2	1	3		2	1	1	RCC	88	88
35	neg	n	2	2	2	1		2	1	1	RCC	96	96
36	neg	n	1	1	2	2		2	1		RCC	98	98
37	neg	n	2	2	2	1		2	1		RCC	104	104
38	neg	n	2	1	2	2		2	3	3	obito	0	0
39	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	1	2	1	1		1	1		RECIDIVA	97	98
40	neg	n	1	1	1	1		1	1		recidiva/RCC	27	123
41	neg	n	1	2	1	1		1	1		recidiva/obito	17	30
42	neg	n	2	2	1	1		2	3	3	obito	0	0
43	neg	n	1	1	1	1		1	1	1	recidiva/TMO/RCC	7	80
44	neg	n	1	1	1	1			1	1	RCC	49	49
45	positivo (100 pb)	expressão forte Ik10	2	1	2	3		2	1	2	recidiva/óbito	8	11
46	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	1	1	1	1		1	1	1	recidiva/obito	15	21
47	neg	n	1	1	2	1		2	1	1	RCC	56	56
48	neg	n	1	1	1	1		1	1	1	recidiva/obito	11	24

amostra	deleção <i>IKZF1</i>	Tipo de deleção	Idade	sexo	GB diagn	imunofeno	molecular	risco	MO D28	DRM D28	status	SLE (m)	SG (m)
49	neg	n	1	1	2	2		2	1	1	RCC	93	93
50	neg	n	1	1	2	2		2	1	1	RCC	94	94
51	neg	n	1	1	2	2		2	1	1	RCC	95	95
52	neg	n	2	1	2	2		2	1	1	RCC	81	81
53	neg	n	2	1	2	2		2	1	1	RCC	49	49
54	neg	n	2	1	1	2		2	1	1	RCC	94	94
55	neg	n	2	1	2	2		2	1	1	RCC	63	63
56	neg	n	2	1	2	2		2	3	3	obito por leucoestase	0	0
57	neg	n	1	2	2	2		2	1	1	obito por insuf resp	21	21
58	neg	n	1	1	2	2		2	1	1	RCC	58	58
59	neg	n	1	1	2	2		2	1	1	obito por ch septico	12	12
60	neg	n	2	1	2	2		2	1	1	RCC	57	57
61	neg	n	1	1	2	2		2	1	1	RCC	53	53
62	neg	n	1	1	2	2		2	2	2	recidiva/obito	8	11
63	neg	n	2	1	2	2		2	1	2	RCC	47	47
64	neg	n	2	1	2	2		2	1	1	RCC	47	47
65	neg	n	2	1	2	2		2	3	3	obito- hemorragia cerebral	0	0
66	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	1	1	1	2		2	1	2	recidiva/obito	19	21
67	neg	n	2	1	2	2		2	1	1	RCC	41	41
68	neg	n	2	1	2	2		2	1	1	RCC	40	40
69	neg	n	2	2	1	2		2	3	3	obito por ch septico	0	1
70	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	2	2	1	2		2	1	1	RCC	32	32
71	neg	n	2	2	1	2		2	1		obito/recidiva	23	25
72	neg	n	2	1	2	2		2	1	1	RCC	33	33
73	neg	n	1	1	2	2		2	1		RCC	23	23
74	neg	n	1	1	2	2		2			RCC	24	24

amostra	deleção <i>IKZF1</i>	Tipo de deleção	Idade	sexo	GB diagn	imunofeno	molecular	risco	MO D28	DRM D28	status	SLE (m)	SG (m)
75	neg	n	2	1	2	2		2	1		RCC	13	13
76	neg	n	1	1	1	1		1	1		RCC	58	58
77	neg	n	1	2	1	3		1	1	NA	obito	24	25
78	neg	n	1	2	1	1		1	1		RCC	55	55
79	neg	n	1	1	1	1		1	1	1	tto p/ recidiva	38	58
80	neg	n	1	2	1	1		1	1	1	RCC	51	51
81	neg	N	2	2	1	1		2	1	1	RCC	46	46
82	neg	N	1	2	1	1	T(12;21)	1	1	NA	RCC	127	127
83	neg	N	2	1	1	1		2	1	1	RCC	140	140
84	neg ?	N	1	2	1	1		1	1	1	RCC	56	56
85	neg	N	1	1	2	1	T(12;21)	2	1	NA	RCC	130	130
86	neg	N	1	1	1	1	t(12;21)	1	1	NA	RCC	54	54
87	neg	N	1	1	1	3		1	1	1	RCC	51	51
88	positivo fraco (300pb)	expressão fraca Ik6	2	1	1	1		2	1	1	RCC	52	52
89	neg	N	2	1	1	3		1	2		obito	14	14
90	neg	N	1	2	1	1		1	1	NA	RCC	51	51
91	positivo fraco (300pb)	expressão fraca Ik6	1	1	1	1		1	1		RCC	52	52
92	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	2	2	2	1	T(9;22)	2	1	NA	obito	11	13
93	neg	N	2	2	1	1		2	2	2	obito	9	9
94	neg	N	1	2	1	1		1	1	1	obito	18	40
95	neg	N	1	2	2	1		2	1		RCC	53	
96	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	1	1	1	3		1	1		obito	40	40
97	positivo fraco (300pb)	expressão fraca Ik6	1	1	1	1		1	1		RCC	52	52
98	neg	N	2	1	1	1		2	1		RCC	50	50
99	neg	N	1	1	2	1		2	2		obito	7	7
100	neg	N	2	2	1	1		2	1	1	RCC	52	52

amostra	deleção <i>IKZF1</i>	Tipo de deleção	Idade	sexo	GB diagn	imunofeno	molecular	risco	MO D28	DRM D28	status	SLE (m)	SG (m)
101	neg	N	1	1	2	3		2	1	1	RCC	49	49
102	neg	N	2	1	1	1		2	1		obito	30	30
103	neg	N	1	2	1	1		1	1		RCC	50	50
104	neg	N	2	2	1	1		2	1		RCC	49	49
105	neg	N	1	1	1	1		1	1	1	RCC	49	49
106	neg	N	1	1	2	1	T(12;21)	2	1	1	RCC	73	73
107	neg	N	1	2	1	1		1	1		RCC	48	48
108	neg	N	1	2	1	1	T(12;21)	1	1	1	RCC	116	116
109	neg	N	1	2	1	1		1	1	1	RCC	45	45
110	neg	N	1	2	2	1		2	1	1	RCC	45	45
111	neg	N	1	2	1	1		1	1	1	RCC	54	54
112	neg	N	1	2	1	1		1	1	1	RCC	43	43
113	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	2	1	1	1		2	1	2	obito	8	8
114	neg	N	2	2	1	1		2	1	2	obito	2	2
115	neg	N	1	2	1	1	T(12;21)	1	1	1	RCC	112	112
116	neg	N	1	1	2	1		2	1	1	RCC	125	125
117	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	1	1	1	1		1	1	1	RCC	42	42
118	neg	N	1	1	1	1		1	1	1	RCC	42	42
119	neg	N	2	1	2	1		2	3	3	obito	0	0
120	neg	N	1	2	1	1		1	1	2	RCC	85	85
121	neg	N	1	2	1	1		1	1		RCC	39	39
122	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	2	2	2	1		2	3	3	obito	0	0
123	positivo fraco (300pb)	expressão fraca Ik6	1	2	1	1		1	1		RCC	29	29
124	neg	N	1	1	1	1	T(12;21)	1	1	1	RCC	39	39
125	positivo fraco (300pb)	expressão fraca Ik6	1	1	1	1		1	1	1	RCC	45	45
126	neg	N	1	2	1	1		1	1		RCC	37	37

amostra	deleção <i>IKZF1</i>	Tipo de deleção	Idade	sexo	GB diagn	imunofeno	molecular	risco	MO D28	DRM D28	status	SLE (m)	SG (m)
127	del total gene	Del	2	1	1	1	T(12;21)	2	1	1	RCC	162	162
128	neg	N	1	2	2	1		2	1	1	obito	1	1
129	positivo (300pb)	expressão forte Ik6	1	1	1	3		2	1	2	recaída SNC	32	32
130	del total gene	Del	1	2	2	1		2	1	1	RCC	36	36
131	neg	N	2	1	1	1		2	1		RCC	34	34
132	neg	N	2	1	2	3		2	1	1	RCC	38	38
133	neg	N	2	1	1	1		2	2	2	RCC	37	37
134	neg	N	2	1	2	1		2	2	2	obito	6	6
135	neg	N	1	1	1	1		1	1		RCC	37	37
136	positivo fraco (300pb)	expressão fraca Ik6	1	2	1	1		1	1		RCC	34	34
137	del total gene	Del	2		2	1		2	1	1	RCC	108	108

Legenda:

Idade – 1: entre 1 e 9 anos/ 2: <1 ou >9 anos

Sexo- 1masculino/2: feminino

GB ao diagnóstico- 1: <50.000 /2: >50.000

Imunofenótipo- 1: LLA B-derivada CALLA+/ 2: LLA T-derivada/ 3: LLA-B derivada CALLA neg

RISCO- 1: baixo risco/ 2: alto risco

MO D28- 1: M1 / 2: M2 ou M3 / 3: não realizado

DRM D28- 1: negative/ 2: positive/ 3: não realizado

ANEXO 2: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2016.

Ofício nº 2096/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 13/2016

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **“ANÁLISE DE ALTERAÇÕES ENVOLVENDO GENES DA FAMÍLIA IKAROS E SEU IMPACTO NO PROGNÓSTICO NA LLA DA INFÂNCIA” – Projeto de Pesquisa versão 2**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 430ª Reunião Ordinária realizada em 20/06/2016, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Assentimento corrigido; TCLE corrigido e o Termo de Dispensa corrigido.**

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
LARISSA BUENO POLIS MOREIRA
PROF. DR. CARLOS ALBERTO SCRIDELI (Orientador)
Depto. de Puericultura e Pediatria

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO 3: Termo de consentimento livre e esclarecido, termo de assentimento e termo de dispensa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da Pesquisa: “Análise de alterações envolvendo genes da família IKAROS e seu impacto no prognóstico na LLA da infância”..

Pesquisadores Responsáveis: Larissa Bueno Polis Moreira/Carlos Alberto Scrideli

Informações e Esclarecimentos

Prezado paciente e responsável,

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) para participar de um estudo clínico, coordenado por Carlos Alberto Scrideli, docente do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Hospital das Clínicas.

Antes de decidir se quer participar, é importante que o (a) senhor (a) entenda a razão deste estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconforto.

Por favor, leia atentamente todas as informações deste folheto e faça perguntas se tiver qualquer dúvida.

Qual o objetivo deste estudo?

O objetivo deste estudo é buscar novas possibilidades para identificar genes que possam estar associados ao desenvolvimento e agressividade dos principais tipos de leucemia da criança e do adolescente.

Sabemos que nas células da leucemia, estes genes que serão estudados produzem substâncias (proteínas) com função alterada que podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da doença e agressividade da mesma.

Por isto, este trabalho pretende encontrar alterações nas células leucêmicas que possa ajudar no entendimento de como o câncer ocorre, abrindo perspectivas de novos tratamentos.

Para realizar o diagnóstico de leucemia linfóide aguda da criança ou adolescente sob sua responsabilidade legal foi retirado amostras de sangue da medula óssea . Depois dos testes, grande parte da amostra retirada ficou guardada como arquivo no laboratório. Esta parte guardada é a que gostaríamos de utilizar. Para este estudo, este material retirado será útil para sabermos como se comporta a leucemia para assim estudarmos o que está errado no sangue doente.

Como será o estudo?

O estudo será feito com esse material que foi retirado no momento do diagnóstico da leucemia. Nessa amostra iremos estudar o comportamento de diversas moléculas que estão no interior das células com leucemia e se estas moléculas podem ter importância no tratamento da doença.

Preciso participar?

A sua participação no estudo é voluntária e depende só do (a) senhor (a). Se decidir participar, o senhor deve assinar este documento chamado de Consentimento Livre e Esclarecido. Mesmo decidindo participar, poderá desistir a qualquer momento.

Se o (a) senhor (a) não participar do estudo ou desistir de participar, isso em nada afetará o atendimento neste hospital e continuará recebendo do seu médico o melhor tratamento que ele pode oferecer.

O que devo fazer?

Você não deverá fazer nada e o estudo será realizado com o material que será retirado devido ao tratamento de sua doença ou da doença que a criança ou adolescente sob sua responsabilidade legal, **não sendo necessária a coleta de nenhum material adicional.**

Quais são os possíveis riscos?

O uso deste material não implicará riscos adicionais para seu filho(a), nem exigirá que se submeta a qualquer procedimento adicional. O projeto de pesquisa foi apresentado e

aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do hospital. Serão fornecidos esclarecimentos e informações sobre a pesquisa caso houver interesse.

Quais são os possíveis benefícios?

Os benefícios serão os de entender melhor este tipo de câncer e da possibilidade da descoberta de novos tipos de tratamento para estas doenças.

A informação obtida será confidencial?

As informações sobre as condições de saúde serão arquivadas, mas seu nome não será incluído. A identificação será por um número, mantendo-se confidencial. Somente seus médicos saberão que as informações estão relacionadas com o (a) senhor(a) ou da criança ou adolescente sob sua responsabilidade legal.

O resultado deste estudo será publicado em revistas médicas nacionais e internacionais, mas sua identidade será preservada.

Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você e os pesquisadores não terão benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Porém, vocês poderão ter acesso aos resultados dessa pesquisa.

Você receberá uma via deste documento com a assinatura e rubrica em todas as páginas do(s) pesquisador(es) responsáveis. Solicitamos manter seu endereço atualizado, pois caso necessário será contactado posteriormente.

E se eu tiver dúvidas?

Se o (a) senhor (a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor, entre em contato. Estaremos à disposição para esclarecer antes, durante e após o encerramento da pesquisa.

Carlos Alberto Scrideli – Telefones (16) 3602-2651 ou (16) 98119-3449, E-mail: scrideli@fmrp.usp.br

Larissa Bueno Polis Moreira – Telefone: (16) 98116-4556, e-mail:
larissapolis@hotmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto: (16) 3602-2228 – para dúvidas éticas sobre o projeto

Autorização

Eu li este termo a respeito do estudo “**Análise de alterações envolvendo genes da família IKAROS e seu impacto no prognóstico na LLA da infância**”, minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e concordo em participar.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CRIANÇAS COM LEUCEMIA

Você está sendo convidado para participar de um estudo chamado “**Análise de alterações envolvendo genes da família IKAROS e seu impacto no prognóstico na LLA da infância**” que irá utilizar a amostra de sangue da medula óssea que foi colhido no momento do diagnóstico da sua doença no sangue e que sobrou após os testes iniciais e está guardado como arquivo no laboratório. Você não precisará fazer nenhum exame além desses que já foram realizados . Esta parte guardada é a que gostaríamos de utilizar para sabermos como se comporta a doença para assim estudarmos o que está errado na medula doente.

Se suas dúvidas foram esclarecidas e você entendeu o estudo e concorda em participar, é só assinar abaixo. Caso você não concorde em participar, seu tratamento não sofrerá nenhuma alteração. Estamos sempre disponíveis para retirar quaisquer dúvidas que surgirem

Pesquisadores responsáveis: **Carlos Scrideli** – Telefones (16) 3602-2651 ou (16) 98119-3449, E-mail: scrideli@fmrp.usp.br

Larissa Polis Moreira – Telefone: (16) 98116-4556, e-mail: larissapolis@hotmail.com

Nome paciente: _____

Nome responsável: _____

Assinatura: _____ Data _____

Pesquisador responsável: _____

Assinatura: _____ Data _____

PROJETO: “Análise de alterações envolvendo genes da família IKAROS e seu impacto no prognóstico na LLA da infância”..

Pesquisadores responsáveis: Larissa Bueno Polis Moreira/Carlos Alberto Scrideli

Solicitação de dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Solicito a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para os pacientes com material biológico estocado no banco regulamentado de tumor/medula e controles desta instituição, que perderam o seguimento neste hospital, apresentaram óbito ou que não consigam ser contactados e que já tenham assinado o TCLE para o armazenamento destas amostras nos respectivos bancos já aprovados por este comitê: bancos de tumores (registro 9375/2003), de DNA (registro 9374/2003) e de medula óssea (registro (9373/2003).

Responsáveis pelo banco de tumores: Prof.Dr. Luiz Gonzaga Tone e Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

Carlos Alberto Scrideli

Professor Associado

Departamento de Puericultura e Pediatria

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto