



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALBERTO YOICHI SAKAGUCHI

**POLIMORFISMOS DOS GENES *TGFB1* E *TGFBR2*:
RELAÇÃO COM SUSCETIBILIDADE E PROGNÓSTICO DA
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA NA POPULAÇÃO
INFANTOJUVENIL BRASILEIRA**

Londrina
2021

ALBERTO YOICHI SAKAGUCHI

**POLIMORFISMOS DOS GENES *TGFBI* E *TGFBR2*:
RELAÇÃO COM SUSCETIBILIDADE E PROGNÓSTICO DA
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA NA POPULAÇÃO
INFANTOJUVENIL BRASILEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Angelica Ehara Watanabe.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Marla Karine Amarante.

Londrina
2021

ALBERTO YOICHI SAKAGUCHI

**POLIMORFISMOS DOS GENES *TGFB1* E *TGFBR2*:
RELAÇÃO COM SUSCETIBILIDADE E PROGNÓSTICO DA
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA NA POPULAÇÃO
INFANTOJUVENIL BRASILEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Patologia Experimental da Universidade Estadual de
Londrina como requisito para obtenção do título de
Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Angelica Ehara
Watanabe
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira
Pontifícia Universidade Católica do Paraná –
PUC-PR

Prof^ª. Dr^ª. Carolina Batista Ariza
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^ª. Dr^ª. Gabriela Gonçalves de Oliveira
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS

Prof. Dr. Glauco Akelington Freire Vitiello
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2021.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos e considerações são para muitas pessoas e algumas instituições, pois, sem elas não estaria com a tese escrita e as pesquisas realizadas.

À minha mãe, Angela Saito Sakaguchi, pela paciência, educação, lição de vida e conselhos. Você sempre me acompanhou os sofrimentos desta jornada e preocupada com a minha saúde que não dormia direito. Minha gratidão é imensa, que sempre será a mãe maravilhosa!

Ao meu pai, Mario Yukio Sakaguchi, pelas mesmas considerações. Você também fez parte desta jornada porque sem você não estaria aqui com a tese escrita. Obrigado pela paciência e companheirismo desde criança, você sempre será o pai admirável!

À minha irmã, Ágatha Aki Sakaguchi, pelo companheirismo, carinho e amizade. Independente da diferença de idade, você fez parte desta jornada, pois você viu o quanto sacrifiquei vários dias escrevendo a tese. Sinto grato de verdade!

À minha família inteira, aos meus primos e primas, tios e tias e, em especial, aos meus avós, que também sempre percorreram nessas etapas da minha jornada acadêmica. Agradeço imensamente por acreditarem em mim, na minha capacidade, perseverança e determinação.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Angelica Ehara Watanabe, a minha “Sensei”, pela orientação, credibilidade e aceito como aluno de mestrado e doutorado, e membro do Laboratório de Polimorfismos Genéticos e Imunologia. Toda a sua sabedoria sempre será acolhida com muito amor, carinho e admiração. Muito obrigado pelas discussões, oportunidades e por tudo. Você sempre será a minha mãe científica!

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Marla Karine Amarante pelo ensinamento e paciência. A minha “Co” que considero como a minha segunda mãe científica, você é uma pessoa muito admirável, querida e abençoada de Deus. Durante o doutorado, sinto que sofremos e batalhamos juntos e, o que fizemos a não desistir foi a fé que temos no nosso interior. Nós caímos algumas vezes, mas levantamos várias vezes. Então, a sua disposição foi muito essencial e imprescindível para conclusão deste trabalho. Muito obrigado pelos conselhos, amizade e sempre estar me escutando dos meus planos, desabafos e paciência. Sempre vou te admirar!

Aos amigos, colegas e parceiros do laboratório: Bruna Karina Banin Hirata, Caroline Yukari Motoori Fernandes, Cintya Mayumi Ishibashi, Glauco Akelinghton Freire Vitiello, João Felipe Guapo Pasquini, Luiz Henrique Fernandes Spolador, Sarah Lott Moretto, Mayara Bocchi, Nathalia de Sousa Pereira, Vânia Darc de Castro, com os quais passei maior

parte da minha jornada e na colaboração de outros trabalhos. Agradeço pela amizade compartilhada, conselhos, sugestões e companhia. Desejo sucesso a todos vocês!

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira, Profa, Dra. Carolina Batista Ariza, Profa. Dra. Gabriela Gonçalves de Oliveira e Prof. Dr. Glauco Akelington Freire Vitiello, pelo aceite em avaliar o trabalho.

Ao médico onco-hematologista Fausto Celso Trigo pela disponibilidade, dedicação e colaboração com as amostras biológicas para execução deste trabalho. A sua presença sempre vai ser essencial e precioso para o desenvolvimento do nosso trabalho e futuras pesquisas relacionadas às doenças hematológicas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina pelo conhecimento compartilhado e pela formação acadêmica e científica.

Às agências de fomento à pesquisa pelo financiamento desse projeto: CNPq, CAPES e Fundação Araucária.

Aos órgãos e entidades públicas pela colaboração desse trabalho: Superintendência de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (SETI), Conselho Estadual dos Direitos da Criança e do Adolescente (CEDCA), Secretaria da Justiça, Família e Trabalho do Governo do Paraná (SEJUF).

À instituição, Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade gloriosa de realizar as pesquisas desde o mestrado até a conclusão final do doutorado. Nunca acreditei que estudaria nesta instituição, foi uma das realizações. Além disso, foi gratificante em poder implementar e compartilhar o meu conhecimento clínico durante a minha pesquisa.

Aos amigos que auxiliaram nesta jornada desafiadora, especialmente ao meu amigo e considerável “irmão” Glauco Akelington Freire Vitiello. Você é um dos amigos que realmente me acompanhou desde a jornada do mestrado até o doutorado. Eu agradeço muito pela amizade, conselhos, pelas convivências sociais e profissionais e pelo apoio durante todo o trajeto acadêmico. Este laço de amizade vou levar para sempre!

A todos os voluntários que participaram deste projeto, especialmente aos pacientes do Hospital Universitário e do Hospital do Câncer de Londrina.

À Deus pelas oportunidades, força divina, persistência, por seu amor e bênção infinita. O Senhor sabe o quanto foi difícil e duro vencer esta etapa, e escrever a tese durante a minha jornada de trabalho. Sem o Senhor, não estaria neste momento avançando mais um passo para os meus desejos. Sempre acreditarei no Senhor e na minha fé para que o Senhor conceda

ótimas oportunidades. Agradeço profundamente ao Senhor por não ter desistido de mim, por sempre estar iluminando e guiando no caminho certo e justo. Gratidão eterna!

SAKAGUCHI, A. Y. **Polimorfismos dos genes *TGFBI* e *TGFBR2*: relação com suscetibilidade e prognóstico da leucemia linfóide aguda na população infanto juvenil brasileira.** 2021. 78 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma neoplasia hematológica que apresenta maior incidência na faixa pediátrica e acomete o processo fisiológico da hematopoese, acumulando principalmente células precursoras das linhagens B e T não funcionais, denominadas de linfoblastos. Essas células perdem a capacidade de diferenciação celular e acometem o compartimento da medula óssea e/ou sangue periférico, comprometendo outras linhagens celulares. A etiologia específica da LLA permanece desconhecida, no entanto, algumas hipóteses sugerem o envolvimento do sistema imunológico na LLA. Uma das moléculas implicadas é a citocina fator de crescimento transformador beta (TGF β), a qual fisiologicamente apresenta um papel pleiotrópico, incluindo função reguladora da hematopoese. Dentro da família do TGF β , o TGF β 1 é a isoforma mais abundante e, junto com os seus receptores (TGF β R1 e TGF β R2), pode ativar uma cascata de sinalização seguida de expressão gênica em diferentes tipos de células alvo. Alguns estudos apontam para influências dos polimorfismos dos genes *TGFBI* e *TGFBR2* nas neoplasias hematológicas, inclusive LLA. Sendo assim, este trabalho visou avaliar as variantes genéticas do *TGFBI* (rs1800468, G-800A; rs1800469, C-509T; rs1800470, C29T; rs1800471, G74C) e suas estruturas haplotípicas, e do *TGFBR2* (rs3087465, G-875A) entre pacientes com LLA e crianças livres de neoplasia, suas associações com a suscetibilidade e o prognóstico dos pacientes com LLA, e correlacionar a presença das variantes com seus dados clinicopatológicos. Os resultados apontaram que o polimorfismo C29T em heterozigose apresentou um efeito protetor em comparação com homozigoto selvagem nos LLA geral e subtipo LLA de células B (LLA-B). Em contrapartida, o alelo T do C29T foi associado à suscetibilidade tanto para LLA geral quanto para LLA-B. Numa análise de correlação, o polimorfismo G74C apresentou uma correlação negativa com recaída para os LLA geral e subtipo LLA-B, e o haplótipo GTTG no modelo dominante correlacionou-se negativamente com óbito apenas para LLA geral. No entanto, os haplótipos GCTG no modelo recessivo e GCCG no modelo dominante correlacionaram-se positivamente com óbito e idade, respectivamente, para LLA geral. Na estratificação de risco, o polimorfismo C-509T no modelo dominante observou-se uma correlação negativa com óbito para LLA geral Alto Risco (AR), enquanto que, haplótipo GTTG no mesmo modelo correlacionou-se negativamente com óbito no mesmo grupo de risco. O haplótipo GCCG no modelo dominante correlacionou-se positivamente com recaída para LLA geral Baixo Risco (BR), e o haplótipo GCTG no modelo recessivo apresentou uma correlação positiva com óbito para LLA geral AR. Ainda, o haplótipo GCCG no modelo dominante correlacionou-se positivamente com recaída para LLA-B BR. Com relação ao polimorfismo rs3087465 (G-875A) do *TGFBR2*, os resultados apontaram uma associação com suscetibilidade para LLA geral e subtipo LLA-B. Ainda, o G-875A associou-se com suscetibilidade no grupo AR tanto para LLA geral quanto para LLA-B, aumentando a chance de recaída para estes subtipos. Num estudo de correlação, o G-875A apresentou uma correlação positiva com grupo de risco de recaída para os subtipos LLA geral e LLA-B. Além disso, o polimorfismo G-875A correlacionou-se positivamente com recaída nos modelos dominante e aditivo na LLA-T. É imprescindível que investigações adicionais com alvo nas vias de sinalização desta citocina e seu receptor sejam conduzidas a fim de elucidar sua influência na leucemogênese desta neoplasia. Desta forma, a citocina TGF β 1 junto com um dos

receptores (TGF β RII) podem servir como marcadores de prognóstico e de suscetibilidade da LLA na população infantojuvenil brasileira.

Palavras-chave: LLA; polimorfismos genéticos; TGF β 1; TGF β R2; suscetibilidade.

SAKAGUCHI, A. Y. ***TGFBI* and *TGFBR2* gene polymorphisms**: relation with susceptibility and prognosis of Brazilian childhood acute lymphoblastic leukemia. 2021. 78 p. Doctoral Thesis (Post-graduate in Experimental Pathology) – Londrina State University, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematological neoplasia that has a higher incidence in the pediatric range and affects the physiological process of hematopoiesis, accumulating mainly precursor cells from non-functional B and T lines, called lymphoblasts. These cells lose their capacity for cell differentiation and affect the bone marrow compartment and/or peripheral blood, compromising other cell lines. The specific etiology of ALL remains unknown, however, some hypotheses suggest the involvement of the immune system in ALL. One of the involved molecules is the transforming growth factor beta cytokine (TGF β), which physiologically has a pleiotropic role, including the regulation of hematopoiesis. Within the TGF β family, TGF β 1 is the most abundant isoform and, together with its receptors (TGF β R1 and TGF β R2), can trigger a signaling cascade followed by gene expression in different types of target cells. Some previous studies have demonstrated the importance of polymorphisms in the *TGFBI* and *TGFBR2* gene in the hematological neoplasms, including ALL. Therefore, this work aimed to evaluate genetic variants of *TGFBI* (rs1800468, G-800A; rs1800469, C-509T; rs1800470, C29T; rs1800471, G74C) and their haplotypic structures, and *TGFBR2* (rs3087465, G-875A) in ALL patients and neoplasia-free children and their associations based on the susceptibility and prognosis of ALL, and to correlate the presence of the variants with their clinicopathological data. The results showed that the C29T polymorphism in heterozygosis demonstrated a protective effect compared to the wild homozygote in the general ALL and B-cell ALL (B-ALL). In contrast, the T allele from C29T was associated with susceptibility to both general ALL and B-ALL. In a correlation analysis, G74C polymorphism showed a negative correlation with relapse for both general ALL and B-ALL, and the GTTG haplotype in dominant model correlated negatively with death only for general ALL. However, GCTG haplotype in recessive model and GCCG haplotype in dominant model correlated positively with death and age, respectively, for general ALL. In risk stratification, C-509T in dominant model showed a negative correlation with death for general ALL High Risk (HR), whereas GTTG haplotype in the same model correlated negatively with death in the same risk group. GCCG haplotype in dominant model was positively correlated with relapse for general ALL Low Risk (BLANK; KARLSSON), and GCTG haplotype in recessive model showed a positive correlation with death for general ALL HR. In addition, GCCG haplotype in dominant model correlated positively with relapse for B-ALL LR. Regarding *TGFBR2* rs3087465 (G-875A) polymorphism, results showed an association with susceptibility to B-ALL. Furthermore, G-875A associated with susceptibility in HR group for both general ALL and B-ALL, increasing the chance of relapse for these subtypes. In a correlation analysis, G-875A showed a positive correlation with risk of relapse for both general ALL and B-ALL subtypes. Moreover, G-875A polymorphism correlated positively with relapse in dominant and additive models for T-ALL. It is essential that additional investigations targeting the signaling pathways of this cytokine and its receptor are conducted in order to elucidate its influence on the leukemogenesis of this neoplasia. Thus, TGF β 1 cytokine with one of the receptors (TGF β R2) may serve like prognosis and susceptibility markers for Brazilian childhood ALL.

Keywords: ALL; genetic polymorphisms; TGF β 1; TGF β R2; susceptibility.

SAKAGUCHI, A. Y. **Polimorfismos de los genes *TGFBI* y *TGFBR2*: relación con la susceptibilidad y pronóstico de la leucemia linfocítica aguda en niños y adolescentes brasileños.** 2021. 78 p. Tesis Doctoral (Programa de Post grado em Patología Experimental) – Universidad Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMEN

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es una neoplasia hematológica que tiene una mayor incidencia en el rango pediátrico y afecta el proceso fisiológico de la hematopoyesis, acumulando principalmente células precursoras de las líneas B y T no funcionales, llamadas linfoblastos. Estas células pierden su capacidad de diferenciación celular y afectan el compartimento de la médula ósea y/o la sangre periférica, comprometiendo otras líneas celulares. La etiología específica de la LLA sigue siendo desconocida, sin embargo, algunas hipótesis sugieren que la participación del sistema inmunológico en la LLA. Una de las moléculas implicadas es el factor de crecimiento transformante de citocinas beta ($TGF\beta$), que fisiológicamente tiene un papel pleiotrópico, incluida la función reguladora de la hematopoyesis. Dentro de la familia $TGF\beta$, $TGF\beta 1$ es la isoforma más abundante y, junto con sus receptores ($TGF\beta RI$ y $TGF\beta RII$), puede activar una cascada de señalización seguida de expresión génica de diferentes tipos de células diana. Algunos estudios apuntan a influencias de los polimorfismos de los genes *TGFBI* y *TGFBR2* en neoplasias hematológicas, incluida la LLA. Así, este trabajo tuvo como objetivo evaluar las variantes genéticas de *TGFBI* (rs1800468, G-800A; rs1800469, C-509T; rs1800470, C29T; rs1800471, G74C) y sus estructuras haplotípicas, y *TGFBR2* (rs3087465, G-875A) en pacientes con Niños libres de LLA y neoplasias, sus asociaciones con la susceptibilidad y pronóstico de los pacientes con LLA, y correlacionar la presencia de las variantes con sus datos clínicos y patológicos. Los resultados mostraron que el polimorfismo heterocigoto C29T mostró un efecto protector en comparación con el homocigoto salvaje en los LLA general y subtipo LLA tipo B (LLA-B). Por el contrario, el alelo C29T T se asoció con susceptibilidad tanto a la LLA general como a la LLA-B. En un análisis de correlación, el polimorfismo G74C mostró una correlación negativa con la recaída para los LLA general y subtipo LLA-B, y el haplotipo GTTG en el modelo dominante se correlacionó negativamente con la muerte solo para la LLA general. Sin embargo, los haplotipos GCTG en el modelo recesivo y GCCG en el modelo dominante se correlacionaron positivamente con la muerte y la edad, respectivamente, para la LLA general. En la estratificación del riesgo, el polimorfismo C-509T en el modelo dominante mostró una correlación negativa con la muerte para la LLA general de alto riesgo (AR) LLA, mientras que el haplotipo GTTG en el mismo modelo se correlacionó negativamente con la muerte en el mismo grupo de riesgo. Los haplotipos de GCCG en el modelo dominante se correlacionaron positivamente con la recaída de la LLA de bajo riesgo (BR) general, y el haplotipo de GCTG en el modelo recesivo mostró una correlación positiva con la muerte de la LLA de AR general. Además, el haplotipo GCCG en el modelo dominante se correlacionó positivamente con la recaída a LLAB BR. Con respecto al polimorfismo *TGFBR2* rs3087465 (G-875A), los resultados mostraron una asociación con la susceptibilidad a los LLA general y subtipo LLA-B. Además, el G-875A se asoció con susceptibilidad en el grupo de AR tanto para la LLA general como para la LLA, lo que aumenta la posibilidad de recaída para estos subtipos. En un estudio de correlación, el G-875A mostró una correlación positiva con el riesgo de recaída para los subtipos de LLA general y LLA-B. Además, el polimorfismo G-875A se correlacionó positivamente con la recaída en los modelos dominante y aditivo en LLA-T. Es fundamental que se realicen investigaciones adicionales dirigidas a las vías de señalización de esta citocina y su receptor para dilucidar su influencia en la leucemogénesis de esta neoplasia. Así, la citocina

TGF β 1 junto con uno de los receptores (TGF β RII) pueden servir como marcadores pronósticos y de susceptibilidad de LLA en la población infantil y adolescente brasileña.

Palabras clave: LLA; polimorfismos genéticos; TGF β 1; TGF β R2; susceptibilidad.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação imunofenotípica do EGIL para as LLA.	20
Tabela 2 -	Classificação das leucemias agudas/linfomas linfoblástica B e T de acordo com a OMS 2016.	20
Tabela 3 -	Classificação de risco da LLA segundo o GBTLI.	22
Tabela 4 -	Concentrações dos reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene TGFB1.....	29
Tabela 5 -	Condições utilizadas para a amplificação da região promotora e do éxon 1 do gene TGFB1.....	30
Tabela 6 -	Sequência de oligonucleotídeos (primers), enzimas de restrição, e tamanhos dos fragmentos do produto de PCR e dos produtos de clivagem dos polimorfismos da região promotora (rs1800468 e rs1800469) e do éxon 1 (rs1800470 e rs1800471) do gene TGFB1.....	30
Tabela 7 -	Concentrações dos reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene TGFBR2.	30
Tabela 8 -	Condições utilizadas para a amplificação da região promotora do gene TGFBR2.	31
Tabela 9 -	Sequência de oligonucleotídeos (primers), enzimas de restrição, e tamanhos dos fragmentos do produto de PCR e dos produtos de clivagem da região promotora do polimorfismo do gene TGFBR2.	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AgNO ₃	Nitrato de prata
BMP	Proteína morfogenética óssea
C	Citosina
CD	Marcadores ou grupo de diferenciação
CDKN1	Inibidor 1B quinase dependente de ciclina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CMV	Citomegalovírus
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP _C
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EBV	Vírus <i>Epstein Barr</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGIL	Grupo Europeu de Classificação Imunológica das Leucemias
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
FAB	Grupo Franco-Américo-Britânico
G	Guanina
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância
GDF	Fator de crescimento e diferenciação
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
HCL	Hospital do Câncer de Londrina
HHV	Herpesvírus Humano
HSC	Células-tronco hematopoéticas
HTLV-1	Vírus Linfotrópico da célula T humana 1
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IC	Intervalo de Confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
JPLSG	Grupo de Estudo de Linfoma/Leucemia Pediátrica do Japão
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica

6-MP	6-Mercaptopurina
MPO	Mieloperoxidase
MRD	Doença Residual Mínima
MTX	Metotrexato
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Razão de Chances
pb	Par(es) de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido ribonucleico
SMD	Síndrome Mielodisplásico
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de base única
T	Timina
TdT	Deoxinucleotidil Transferase
TGFβ	Fatores de Crescimento Transformadores Beta
TGFβR1	Receptor 1 de TGFβ
TGFβR2	Receptor 2 de TGFβ
Tregs	Células T regulatórias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)	17
1.1.1	Diagnóstico e Classificação Clínica da LLA	18
1.1.2	Tratamento e Classificação de Risco da LLA	21
1.2	FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA (TGFB) E SUAS VARIAÇÕES GENÉTICAS NA PATOGÊNESE DA LLA E DOENÇAS HEMATOLÓGICAS	22
1.2.2	Polimorfismos Genéticos do Gene TGFB1 e TGFB2	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVOS GERAIS	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	28
3.2	COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	28
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	28
3.4	ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE TGFB1	29
3.5	ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO DE TGFB2	30
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
	REFERÊNCIAS	32
4	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	40
4.1	ARTIGO 1: IMPACT OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 (TGFB1) HAPLOTYPE STRUCTURES IN BRAZILIAN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA	40
4.2	ARTIGO 2: INVOLVEMENT OF TGFB2 POLYMORPHISM IN CLINICAL PRESENTATION OF BRAZILIAN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS	59
5	CONCLUSÃO	72

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	ANEXOS.....	75
	ANEXO A.....	75
	ANEXO B.....	76

1 INTRODUÇÃO

As leucemias são doenças hematológicas e/ou medulares com conceitos biológicos, aspectos clínicos, prognóstico e resposta terapêutica distintos, caracterizadas pela presença de células anormais e imaturas (blastos), suprimindo a produção fisiológica dos componentes celulares do sistema hematopoiético (JULIUSSON; HOUGH, 2016; POLYCHRONAKIS; DOUNIAS; MAKROPOULOS; RIZA *et al.*, 2013).

Ainda, as leucemias podem ser classificadas de acordo com a linhagem e grau de maturação (AN; FAN; XU, 2017), sendo que as leucemias que pertencem à linhagem mieloide incluem aquelas acometendo granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, eritrócitos, plaquetas (derivados dos megacariócitos) e mastócitos. Por outro lado, as leucemias da linhagem linfóide podem acometer células B ou T ou *natural killer* (NK) (ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J. *et al.*, 2016; VARDIMAN; THIELE; ARBER; BRUNNING *et al.*, 2009).

Notavelmente, as células e os componentes do sistema imunológico são essenciais para manutenção do microambiente medular, regulação da hematopoiese e preservação da homeostase (RIETHER; SCHURCH; OCHSENBEIN, 2015). No entanto, algumas alterações genéticas podem interferir na atividade basal destas células, e subsequentemente desregular o processo hematopoiético.

Dentre essas alterações, os polimorfismos genéticos de base única podem ser definidos como variações genéticas em linhagem germinativa acometendo ao menos de 1% da população (FORRESTER; DICK; MCMENAMIN; ROBERTS *et al.*, 2016; KARKI; PANDYA; ELSTON; FERLINI, 2015). Estes polimorfismos podem resultar na modificação funcional da estrutura ou do perfil de expressão de uma proteína, afetando, por exemplo, a função de moléculas do sistema imunológico (ALBERT, 2011; KUBISTOVA; MRAZEK; PETREK, 2009).

Nesse cenário, uma das moléculas alvo do estudo é o fator de crescimento transformador beta (TGF β), cujo gene foi investigado através de quatro polimorfismos, bem como uma variante genética do seu receptor TGF β RII, com a intenção de demonstrar seu envolvimento na leucemia linfóide aguda (LLA) em população infantojuvenil brasileira.

1.1 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)

O Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima para o triênio 2020-2022, a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer para cada ano no Brasil. Com exclusão de tumores de pele não melanoma a ocorrência será de 450 mil novos casos de câncer, sendo que, destes 8.460 são em crianças e adolescentes até os 19 anos de idade. Para as leucemias, de uma maneira específica, estimam-se 5.920 casos novos em homens e 4.890 em mulheres para cada ano dentro do triênio 2020-2022 (INCA, 2019).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), as leucemias foram a décima quinta causa mais frequente de cânceres no mundo e a décima causa de mortes por câncer em 2020 no mundo, especificamente 474.519 casos confirmados e 311.594 mortes (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021).

A leucemia linfóide aguda (LLA) é caracterizada como uma doença hematológica maligna devido à expansão clonal e acúmulo de células progenitoras da linhagem linfóide (linfoblastos) não funcionais no compartimento da medula óssea e/ou sangue periférico. Esta população de células imaturas adquire a capacidade de substituir as células hematopoiéticas normais e ocupar todo o espaço medular. Além disso, é uma doença mais frequente em crianças e adolescentes com aproximadamente de 80% dos casos nessa faixa etária e pico de incidência entre 1 e 6 anos (KATZ; CHIA; SCHOONEN; KELSH, 2015).

No ano de 2018, foram registrados 5.930 novos casos de LLA nos Estados Unidos, sendo que 3.280 casos ocorreram em homens e 2.650 ocorreram em mulheres. Além disso, foram registradas 1.500 mortes por LLA nesse país, sendo 850 dessas em homens e 650 em mulheres. Notoriamente, essa doença acomete predominantemente a população masculina (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). Um levantamento epidemiológico no Brasil, no período de 1980 a 2015, demonstrou a ocorrência de 10.135 óbitos de leucemia da faixa pediátrica, sendo 5.854 do sexo masculino e 4.276 do sexo feminino (SARAIVA; SANTOS; MONTEIRO, 2018).

A etiologia da LLA permanece amplamente desconhecida, entretanto, alguns fatores de risco para a doença estão estabelecidos, sabendo-se que essa é uma doença multifatorial. Dentre esses incluem-se exposição à radiação ionizante, hidrocarbonetos como benzeno, os pesticidas, consumo de álcool e cigarro (BISPO; PINHEIRO; KOBETZ, 2019; METAYER; ZHANG; WIEMELS; BARTLEY *et al.*, 2013). Além disso, existem, ainda, alguns agentes biológicos, como vírus, que são associados à LLA, comprometendo a resposta imunológica, como vírus Epstein-Barr (EBV), vírus linfotrópico da célula T humana 1 (HTLV-

1), herpesvírus humano do tipo 6 e 7 (HHV-6 e HHV-7) e citomegalovírus (CMV), e a predisposição genética como alterações genéticas que podem estar relacionados ao desenvolvimento da LLA (ANIES RIZK; DARWISH, 2019; FRANCIS; WALLACE; WENDT; LI *et al.*, 2017; GREAVES, 2018).

Quanto as manifestações clínicas da LLA, elas dependem de duas variáveis biológicas: os órgãos e tecidos que são locais de desenvolvimento do sistema linfóide, e o grau de acometimento destes órgãos e tecidos que leva a sintomatologia clínica (MOPPETT; DOMMETT, 2017).

A maioria das manifestações clínicas se deve ao comprometimento da medula óssea. Como a medula óssea é o órgão responsável pela hematopoiese, na LLA as células leucêmicas habitam todo o espaço medular, comprometendo as células normais. As consequências deste comprometimento são sintomas de anemia (palidez, letargia), trombocitopenia (hematomas, petéquias, sangramento da mucosa) e leucopenia (febre, infecção). Ao comprometimento desses três componentes do sangue (hemácias, plaquetas e leucócitos) dá-se o nome de pancitopenia (BRIX; ROSTHOJ, 2014; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017b).

Além desses sinais, o envolvimento de locais extramedulares é comum, causando hepatoesplenomegalia e linfadenopatia em 20% dos pacientes (ALVARNAS; BROWN; AOUN; BALLEEN *et al.*, 2015). O comprometimento do sistema nervoso central (SNC), identificado pela presença de blastos no líquido cefalorraquidiano (LCR), apresenta-se em 8 a 10% dos pacientes (JABBOUR; O'BRIEN; KONOPLEVA; KANTARJIAN, 2015; PUI; HOWARD, 2008; SIRVENT; SUCIU; RIALLAND; MILLOT *et al.*, 2011).

Não obstante, o sintoma mais frequente é a dor óssea, que está presente em 40-50% dos casos, notoriamente devido à expansão medular ou infiltração periosteal. Já, a dor articular e artrite estão presentes em 18% e 9% dos casos, respectivamente. Ainda, 16% dos pacientes da faixa pediátrica sofre fratura óssea, 55% dos casos apresentam dores lombares e nas costas ao diagnóstico (BRIX; ROSTHOJ; HERLIN; HASLE, 2015; HALTON; GABOURY; GRANT; ALOS *et al.*, 2009; SEN; MOPPETT; RAMANAN, 2015).

1.1.1 Diagnóstico e Classificação Clínica da LLA

O diagnóstico da LLA se inicia com o exame físico do paciente, seguido de análise quantitativa e qualitativa do sangue total através da confecção da extensão (esfregaço)

sanguínea e hemograma. Após suspeita levantada por esses exames, é realizada a punção e biópsia de medula óssea e análise citogenética. A presença de 20% ou mais de blastos leucêmicos (linfoblastos) na medula óssea ou sangue periférico com megacariócitos ou plaquetas diminuídos ou ausentes confirma o diagnóstico. Ainda, em caso de suspeita de envolvimento do SNC, é realizado exame de LCR para verificar a existência ou não de blastos (ALVARNAS; BROWN; AOUN; BALLEEN *et al.*, 2015; LUSTOSA DE SOUSA; DE ALMEIDA FERREIRA; CAVALCANTE FÉLIX; DE OLIVEIRA LOPES, 2015; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017a; TORRES; SANTANA ROSA; CAVALCANTE, 2017).

Quanto à classificação, três modelos são estabelecidos para classificar e subclassificar a LLA: (1) o primeiro modelo criado foi o grupo Franco-Américo-Britânico (FAB) (BENNETT; CATOVSKY; DANIEL; FLANDRIN *et al.*, 1976) ; (2) outro modelo classifica as LLAs por meio de achados citogenéticos, o qual foi criado pela OMS em 1997 e atualizado em 2016 (ARBER, D. A.; ORAZI, ATTILIO; HASSERJIAN, ROBERT; THIELE, JÜRGEN *et al.*, 2016; HARRIS; JAFFE; DIEBOLD; FLANDRIN *et al.*, 1999); (3) já o modelo do grupo Europeu de Classificação Imunológica das Leucemias (EGIL) classifica as leucemias através de imunofenotipagem de células leucêmicas (BENE; CASTOLDI; KNAPP; LUDWIG *et al.*, 1995).

A classificação elaborada pelo grupo FAB leva em consideração a análise morfológica e citoquímica dos blastos obtidos da medula óssea e sangue periférico, e, atualmente encontra-se em desuso. Sendo assim, a LLA é classificada em blastos do tipo L1, L2 e L3, baseando-se no diâmetro celular, citoplasma, presença ou ausência de nucléolo, vacuolização do citoplasma e basofilia (ABDUL-HAMID, 2011; BENNETT; CATOVSKY; DANIEL; FLANDRIN *et al.*, 1976; LADINES-CASTRO; BARRAGÁN-IBAÑEZ; LUNA-PÉREZ; SANTOYO-SÁNCHEZ *et al.*, 2016).

No grupo FAB, os subtipos imunofenotípicos de LLA, como B e T, não eram distinguidos, dificultando estudos prospectivos controlados no tratamento desses subgrupos. Para sanar este tipo de problema, o grupo EGIL elaborou uma classificação para estratificar as leucemias agudas de acordo com a imunofenotipagem por citometria de fluxo (Tabela 1) (BENE; CASTOLDI; KNAPP; LUDWIG *et al.*, 1995). Dentro deste contexto, a técnica de citometria de fluxo determina a quantificação e morfologia citológica de linfoblastos e prevê informações acerca do subtipo da doença e das linhagens acometidas (CRAIG, 2017; CRAIG; FOON, 2008; MCKENNA; WASHINGTON; AQUINO; PICKER *et al.*, 2001).

Tabela 1. Classificação imunofenotípica do EGIL para as LLA.

Classificação	Imunofenótipo	Frequência	
		Adultos	Crianças
LLA de linhagem B	HLADR, CD19 ⁺ , e/ou CD79a ⁺ , e/ou CD22 ⁺ , e/ou CD24 ⁺ , e/ou CD34 ⁺		
BI (Pró-B)	CD19 ⁺ , CD22 ⁺ , CD34 ⁺ , TdT ⁺ , cCD79a ⁺ , CD10 ⁺	11%	5-9%
BII (B comum)	CD10 ⁺ (CALLA), TdT ⁺	49%	53-65%
BIII (Pré-B)	CD19 ⁺ , CD22 ⁺ , CD34 ⁺ , TdT ⁺ , cIgM ⁺	12%	14-20%
BIV (B madura)	Ig (citoplasma ou superfície), TdT ⁻ , CD34 ⁻	2-4%	2-3%
LLA de linhagem T	CD1a, CD2, CD3 ⁺ (citoplasma/superfície), CD4, CD5, CD7, CD8, CD34	25%	11-16%
TI (Pró-T)	cCD3 ⁺ , CD7 ⁺	7%	
TII (Pré-T)	cCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD2 ⁺ e/ou CD5 ⁺ e/ou CD8 ⁺		
TIII (T cortical ou tímica)	CD1a ⁺ , cCD3 ⁺ , sCD3 ^{+/-}	17%	
TIV (T madura)	cCD3 ⁺ , sCD3 ⁺ , CD1a ⁻	1%	

CD: marcadores de diferenciação (cluster of differentiation); c: citoplasmático; s: superfície; CALLA: antígeno comum da LLA; HLA-DR: Antígeno Leucocitário Humano do tipo DR da classe II; Ig: Imunoglobulina. Fonte: Adaptado de (ABDUL-HAMID, 2011; CHIARETTI; ZINI; BASSAN, 2014; MANNELLI, 2016).

Segundo os critérios do EGIL, é exigido que a marcação imunofenotípica com anticorpo monoclonal atinja um limite mínimo de 20% de reação positiva para blastos, exceto para mieloperoxidase (MPO), CD3, CD79a e enzima nuclear deoxinucleotidil transferase terminal (TdT), que são considerados positivos no nível de expressão de 10% (BENE; CASTOLDI; KNAPP; LUDWIG *et al.*, 1995; BÉNÉ; NEBE; BETTELHEIM; BULDINI *et al.*, 2011).

A última revisão da classificação das leucemias foi realizada em 2016 pela OMS (Tabela 2), com intuito de integrar dados clínicos, prognósticos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos (ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J. *et al.*, 2016; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017a).

Tabela 2. Classificação das leucemias agudas/linfomas linfoblástica B e T de acordo com a OMS 2016.

Leucemia/linfoma linfoblástica B
Leucemia/linfoma linfoblástica B sem anormalidade genética especificada
Leucemia/linfoma linfoblástica B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(v;11q23.3); rearranjo <i>KMT2A</i>
Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástica B com hiperdiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástica B com hipodiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(5;14)(q31.1;q32.3); <i>IL3-IGH</i>
Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástica B, <i>BCR-ABL1-like</i>
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástica B com <i>iAMP21</i>
Leucemia/linfoma linfoblástica T
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástica T precoce
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástica de célula <i>Natural Killer</i> (NK)

KMT2A: gene da leucemia de linhagem mista ou linfóide/mieloide; *ETV6*: gene da variante 6 do fator de transcrição transformação específica do eritroblasto (*erythroblast transformation-specific*) (CAMBIEN; RICARD; TROESCH; MALLETT *et al.*); *RUNX1*: fator de transcrição relacionada ao runt-1 ou gene leucemia mieloide aguda-1 (*AML1*); *IL3*: gene da interleucina-3; *IGH*: gene da imunoglobulina de cadeia pesada; *TCF3*: gene do fator de transcrição 3 (também conhecido como E2A); *PBX1*: gene homeobox 1 da leucemia de célula pré-B; *iAMP21*: gene da amplificação intracromossomal do cromossomo 21; t: translocação; v: variável.

Fonte: Adaptado de (ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J. *et al.*, 2016; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017a).

Atualmente, o uso da imunofenotipagem em associação com a citogenética é estabelecido na área clínica para direcionar no tratamento mais adequado, específico e eficaz, evadindo a falha terapêutica e amenizar o máximo de efeitos colaterais dos pacientes.

1.1.2. Tratamento e Classificação de Risco da LLA

O protocolo terapêutico para LLA normalmente consiste em três fases – a fase de indução, intensificação (ou consolidação) e manutenção. A fase de indução é considerada uma etapa que define como remissão completa e o restabelecimento da hematopoiese normal, com finalidade de reduzir para menos de 5% de blastos na medula óssea e ausência de qualquer sinal ou sintoma da doença. Dentro dessa fase, são administrados medicamentos como vincristina, corticosteroides, asparaginase com ou sem antraciclina (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010; KATO, 2020; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017a).

Após a remissão completa, os pacientes são destinados para terapia de intensificação ou consolidação, que se refere à readministração do regime terapêutico da indução ou administração de altas doses de medicamentos quimioterápicos que ainda não foram utilizados na fase de indução, os quais incluem citarabina, ciclofosfamida e metotrexato (MTX). O objetivo dessa fase é tentar erradicar as células leucêmicas por meio de altas doses de quimioterapia e fármacos combinados (KATO, 2020; KAUSHANSKY; LICHTMAN; PRCHAL; LEVI *et al.*, 2016).

A fase final do tratamento pode durar em torno de 2 anos. Apesar do acúmulo de metabólitos ativos dos medicamentos e a terapia combinada demonstrarem uma melhora no curso clínico dos pacientes (CHESSELLS; HARRISON; LILLEYMAN; BAILEY *et al.*, 1997; SCHMIEGELOW; SCHRÖDER; GUSTAFSSON; KRISTINSSON *et al.*, 1995), esses podem apresentar efeitos colaterais ou secundários.

Na fase de manutenção, o intuito é eliminar os resíduos de células leucêmicas, pois existe uma alta taxa de recidiva ou recaída nos pacientes. Quanto a medicação, é

administrado normalmente 6-mercaptopurina (6-MP) e MTX com vincristina e corticosteroides (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013; KATO, 2020).

Existem vários protocolos de tratamento para classificar os grupos de risco da LLA, como grupo Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) (CONTER; BARTRAM; VALSECCHI; SCHRAUDER *et al.*, 2010) e Grupo de Estudo de Linfoma/Leucemia Pediátrica do Japão (JPLSG) (KOH; KATO; SAITO; KADA *et al.*, 2018). No Brasil, o Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância (GBTLI), atualizado em 2009, estratifica os dois grandes grupos de risco, baixo risco (BR) e alto risco (AR), levando em consideração os parâmetros hematológicos, linhagens celular e a resposta terapêutica (Tabela 3). Esse protocolo ressalta também que os pacientes classificados como BR podem ser reclassificados se durante o tratamento apresentar características do AR (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

Sabe-se que a administração dos medicamentos na LLA interfere nas atividades leucêmicas e, por outro lado, pode modular o microambiente das células saudáveis (VAGACE; GERVASINI, 2011). Portanto, investigar os mecanismos efetores e conhecer as moléculas do sistema imunológico na regulação da hematopoiese é de suma importância na compreensão do desenvolvimento da LLA.

Tabela 3. Classificação de risco da LLA segundo o GBTLI.

Idade	Baixo Risco ≥1 ano a <9 anos	Alto Risco <1 ano e >9 anos
Leucometria ao diagnóstico	<50.000/mm ³	≥50.000/mm ³
Leucometria no 7º dia de tratamento	<5.000/mm ³	≥5.000/mm ³ *
Blasto no sangue periférico e comprometimento medular no 14º dia de tratamento	Ausência de blastos e baixo comprometimento medular	Presença de blastos e/ou comprometimento medular extenso
Medula no 28º dia de indução	Baixa contagem de células leucêmicas	Evidência de acometimento extramedular ao final da indução
Comprometimento do SNC	Ausência de blastos no líquido no 14º dia de tratamento	Persistência de blastos leucêmicos

*Respondedores lentos ao tratamento; SNC: Sistema Nervoso Central. Fonte: Adaptado de (BRANDALISE; VIANA; PINHEIRO; MENDONÇA *et al.*, 2016; CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

1.2 FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA (TGFB) E SUAS VARIAÇÕES GENÉTICAS NA PATOGÊNESE DA LLA E DOENÇAS HEMATOLÓGICAS

Como discutido previamente, a etiologia específica da LLA permanece desconhecida, apesar de alguns fatores genéticos serem estabelecidos. No entanto, algumas

hipóteses são relevadas que sugerem o envolvimento das moléculas do sistema imunológico na patogênese da LLA, como o fator de crescimento transformador beta (TGF β).

Dentro da família do TGF β , existem as subfamílias das ativinas e inibinas, das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), dos fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) e dos fatores neurotróficos derivados da glia (GDNFs), e além do TGF β propriamente dito (KUBICZKOVA; SEDLARIKOVA; HAJEK; SEVCIKOVA, 2012). O fator de crescimento transformador beta 1 (TGF β 1) é a isoforma mais abundante em relação às outras isoformas (TGF β 2 e TGF β 3) e, as três isoformas são codificadas por genes homólogos em diferentes cromossomos, as quais obedecem um padrão de expressão espaço-temporal durante a embriogênese. Entretanto, essas atuam pelos mesmos receptores transmembrana desencadeando vias de sinalização similares (CHANG; BROWN; MATZUK, 2002; CHEIFETZ; WEATHERBEE; TSANG; ANDERSON *et al.*, 1987; DAVID; MASSAGUÉ, 2018).

Além disso, o TGF β 1 é considerado uma citocina altamente pleiotrópica, ou seja, pode apresentar vários papéis, como regulador do crescimento celular, diferenciação, apoptose, produção da matrix extracelular, invasão, motilidade, angiogênese, e também regulador da hematopoiese (BLANK; KARLSSON, 2015; XU; ZHENG; YUAN; ZHEN *et al.*, 2018). Em relação a secreção, existem várias células que apresentam esta capacidade, como os linfócitos, macrófagos do tipo M2 com função anti-inflamatória, plaquetas, neutrófilos e, no processo carcinogênico, as células tumorais (ALLEVA; BURGER; ELGERT, 1994; GROTENDORST; SMALE; PENCEV, 1989; PICKUP; NOVITSKIY; MOSES, 2013; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008).

Dentro do contexto da hematopoiese, o TGF β 1 participa na regulação sobre as células tronco hematopoiéticas (HSCs) e interage no microambiente da medula óssea através da ativação das células de Schwann, células da glia e megacariócitos. Essas células servem para manutenção do microambiente medular com capacidade de regular o TGF β pela ligação do TGF β latente via integrina α v β 8 para a clivagem proteolítica pelas enzimas metaloproteinases (YAMAZAKI; EMA; KARLSSON; YAMAGUCHI *et al.*, 2011; ZHAO; PERRY; MARSHALL; VENKATRAMAN *et al.*, 2014). Além disso, essa citocina apresenta papel regulador na imunidade inata pelas células NK, macrófagos e neutrófilos, e na imunidade adaptativa pela expansão das células T regulatórias (Tregs). No entanto, quando ocorre alguma falha no papel fisiológico, ele perde esta função e pode promover progressão tumoral e metástase (BATLLE; MASSAGUÉ, 2019; FLAVELL; SANJABI; WRZESINSKI; LICONA-LIMÓN, 2010; SANJABI; OH; LI, 2017), comprometendo a via de sinalização dessa citocina.

O início da transdução de sinal do TGF β ocorre pela interação de um par de receptores transmembrana que apresenta atividade Serina/Treonina quinase – os receptores de TGF β do tipo I (TGF β RI) e do tipo II (TGF β RII). Após a interação do TGF β RII, ocorre o recrutamento do TGF β RI formando o complexo de sinalização, desencadeando a fosforilação em resíduos de serina na cauda citoplasmática de TGF β RI, seguida de fosforilação de proteínas sinalizadoras citoplasmáticas chamadas SMADs dependentes de receptor (R-SMADs), SMAD2 e SMAD3 (KUBICZKOVA; SEDLARIKOVA; HAJEK; SEVCIKOVA, 2012).

O TGF β pode atuar de duas maneiras: a primeira via está relacionada com efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos tanto nas células epiteliais quanto nas hematopoiéticas. Por outro lado, existe a via alternativa que está relacionada com a indução de sobrevivência, proliferação e motilidade celular (SIEGEL; MASSAGUÉ, 2003; ZHANG, 2017). Em conjunto com estes efeitos, o TGF β atua como promotor tumoral na implicância da patogênese do câncer, promovendo metástase, resistência aos efeitos apoptóticos e indução de tolerância imunológica seguida de progressão tumoral (DAVID; MASSAGUÉ, 2018; PICKUP; OWENS; MOSES, 2017).

A sinalização pelo TGF β na LLA tem sido investigada e implicada na patogênese da doença. Pacientes com LLA-T pediátrica apresentam baixos níveis ou ausência de expressão da SMAD3, o que pode prejudicar o controle inibitório da proliferação de células T. Os camundongos *knockout* para o SMAD3 não apresentam efeito indutor da LLA-T. Porém, a perda do inibidor 1B quinase dependente de ciclina (CDKN1) com a perda do SMAD3 promoveu o desenvolvimento da LLA-T nestes animais (WOLFRAIM; FERNANDEZ; MAMURA; FULLER *et al.*, 2004).

A atuação da via de transdução de sinal do TGF β no contexto fisiológico é desencadeada por um conjunto de células imunológicas e proteínas que regulam esta citocina impedindo sua ação patológica. No entanto, algumas alterações genéticas como polimorfismos genéticos podem estar relacionadas na modulação da ação do TGF β .

1.2.2 Polimorfismos Genéticos dos Genes *TGFB1* e *TGFBR2*

O gene do TGF β 1, *TGFB1*, está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.1), e apresenta diversos polimorfismos genéticos descritos. Dentre eles, quatro polimorfismos, sendo dois na região promotora (rs1800468 ou G-800A e rs1800469 ou C-509T) e dois na sequência que codifica o peptídeo sinal dessa citocina (rs1800470 ou T29C e rs1800471 ou G74C), têm sido amplamente estudados na patogênese de cânceres

(MARTELOSSI CEBINELLI; PAIVA TRUGILO; BADARÓ GARCIA; BRAJÃO DE OLIVEIRA, 2016).

O polimorfismo G-800A, se localiza em uma região que interage com uma família de fatores de transcrição denominado de proteína ligante ao elemento de resposta ao 3' 5' monofosfato de adenosina cíclico (AMP_c) (CREB), sugerindo que esse polimorfismo possa influenciar o controle da expressão do gene *TGFBI* (GRAINGER, 1999).

O polimorfismo C-509T está localizado na região promotora e parece influenciar os níveis plasmáticos da citocina TGFβ1 em estudos com gêmeas (GRAINGER, 1999). Para o polimorfismo C-509T e inferência de haplótipos do gene *TGFBI*, dois estudos do tipo caso-controle envolvendo pacientes diagnosticados com LLA infantojuvenil foram realizados, porém, não demonstraram uma associação estatisticamente significativa na frequência genotípica ou alélica entre casos e controles. (DAI; GAST; HORSKA; SCHRAPPE *et al.*, 2009; GRAINGER, 1999; HEALY; ROY-GAGNON; SINNETT, 2009).

Em estudo que o polimorfismo T29C foi avaliado com síndrome mielodisplásica (SMD), observou-se uma associação significativa de risco nos pacientes portadores do alelo T com grau severo de citopenia (GYULAI; BALOG; BORBÉNYI; MÁNDI, 2005).

Já em relação ao polimorfismo G74C, dois trabalhos foram realizados juntamente com o polimorfismo T29C, uma análise em leucemia mieloide aguda (LMA) e outro em leucemia mieloide crônica (LMC). No estudo com LMA, não se observou uma associação significativa para T29C, porém, houve uma associação significativa de risco para G74C nos pacientes com genótipo GC. Além disso, ao se analisar a estrutura haplotípica, não demonstrou-se uma associação estatisticamente significativa (NURSAL; PEHLIVAN; SAHIN; PEHLIVAN, 2016). Em relação ao estudo com LMC, não observou-se diferença estatística nos dois polimorfismos estudados, porém, observou-se uma associação significativa de proteção quando analisou-se a estrutura haplotípica do gene *TGFBI* (PEHLIVAN; SAHIN; PEHLIVAN; OZDILLI *et al.*, 2014).

O gene do TGFβRII (*TGFBR2*) está localizado no braço curto do cromossomo 3 (locus 3p22), e foi identificado um polimorfismo na região promotora desse gene (rs3087465 ou G-875A) que parece desencadear um aumento de sua expressão. (SEIJO, EDWARD R.; SONG, HUIJUAN; LYNCH, MELANIE A.; JENNINGS, RON *et al.*, 2001). Esse polimorfismo é investigado em diversos tipos de cânceres, e uma meta-análise sugeriu que o alelo A poderia estar associado com a proteção contra o câncer de forma geral, o qual é consistente com a literatura de que o TGFβ pode agir como supressor tumoral (HUANG;

ZHONG; YU; WANG, 2014). Entretanto, esse polimorfismo tem sido pouco investigado na LLA ou em doenças hematológicas, sendo assim, é de grande relevância demonstrar o papel deste polimorfismo (SAKAGUCHI; AMARANTE; OLIVEIRA; HIROKI *et al.*, 2020) no contexto hematológico.

Existem poucos trabalhos mostrando a influência desses polimorfismos na severidade das leucemias, e o impacto destes polimorfismos do *TGFBI* nos diferentes subtipos da LLA permanece incerto. Porém, essas variantes podem contribuir de alguma forma a nível de alterar a secreção do TGF β no contexto hematológico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os polimorfismos dos genes *TGFBI* (rs1800468 ou G-800A, rs1800469 ou C-509T, rs1800470 ou C29T e rs1800471 ou G74C) e *TGFBR2* (rs3087465 ou G-875A) em relação à suscetibilidade e o prognóstico da leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes da população brasileira.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Artigo 1:
 - ❖ Analisar as frequências genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos do gene *TGFBI* (rs1800468 ou G-800A, rs1800469 ou C-509T, rs1800470 ou C29T e rs1800471 ou G74C) em pacientes com LLA e crianças livres de neoplasia (grupo controle);
 - ❖ Avaliar possíveis associações entre essas variantes genéticas e a suscetibilidade à LLA em um estudo caso-controle;
 - ❖ Analisar a possível associação dessas variantes com o risco de recidiva;
 - ❖ Analisar a correlação entre estas variantes genéticas e parâmetros clinicopatológicos de subtipos de LLA.

- Artigo 2:
 - ❖ Analisar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene *TGFBR2* (rs3087465 ou G-875A) em pacientes com LLA e crianças livres de neoplasia;
 - ❖ Avaliar possíveis associações entre essa variante genética e a suscetibilidade à LLA;
 - ❖ Correlacionar o polimorfismo rs3087465 com parâmetros clinicopatológicos de pacientes LLA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto realizado foi cadastrado na Plataforma Brasil e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP/UEL 189/2013 – CAAE Nº 17123113400005231). Todos os participantes deste estudo receberam um código após seus responsáveis legais assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e houve o assentimento dos pacientes e participantes do grupo controle envolvidos neste estudo. O convite aos pacientes e seus responsáveis foi realizado durante o atendimento clínico no Serviço de Oncopediatria do HCL.

3.2 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para obtenção das amostras foi coletado 2 mL do sangue periférico em tubo contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

Para o estudo dos polimorfismos genéticos dos genes *TGFBI* e *TGFBR2*, foram incluídos 121 pacientes no artigo 1 e 107 pacientes no artigo 2. Todos os pacientes tinham de 0 a 19 anos e foram diagnosticados com LLA atendidos no Hospital do Câncer de Londrina (HCL). Esses pacientes foram classificados em linhagem das células T ou B, conforme imunofenotipagem realizada por laboratório especializado e em AR e BR de recidiva de acordo com a GBTLI-LLA 2009.

O grupo controle foi composto por 161 crianças oriundas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Esse grupo foi composto por 137 crianças no artigo 1 e 161 crianças no artigo 2. As crianças e adolescentes (0-19 anos) pertencentes a este grupo não possuíam histórico de neoplasia, processos inflamatórios e infecciosos (apresentaram testes bioquímicos, imunológicos e hematológicos normais, de acordo com os valores de referência).

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A partir de sangue periférico coletado em tubo EDTA, o DNA foi extraído utilizando o kit comercial *Biopur Mini Spin Plus* (*Biometrix Diagnostica*, Curitiba, Paraná,

Brasil) segundo as especificações do fabricante. As amostras foram ressuspensas em 50µL de tampão de eluição, quantificadas por espectrofotometria no aparelho *NanoDrop 2000c*® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos da América [EUA]). Além disso, foi adotada a absorvância no comprimento de onda de 260nm para determinar a concentração de ácidos nucleicos, e, para verificar o grau de pureza em relação a proteínas foi obtida a razão entre as absorvâncias 260 a 280nm.

3.4 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE *TGFBI*

A análise dos polimorfismos do gene *TGFBI* (rs1800468, rs1800469, rs1800470, rs1800471) foi realizada por reações em cadeia da polimerase (PCR), seguidas de restrição enzimática, em conformidade com a técnica descrita por JIN; HEMMINKI; GRZYBOWSKA; KLAES *et al.* (2004). Neste estudo, dois segmentos do gene *TGFBI* foram amplificados pela técnica de PCR, sendo que um deles incluindo os polimorfismos da região promotora (rs1800468 ou G-800A e rs1800469 ou C-509T) e o outro flanqueando os polimorfismos presentes no éxon 1, na região do peptídeo sinal (rs1800470 ou C29T e rs1800471 ou G74C).

As concentrações dos reagentes estão descritas conforme a tabela 4, sendo que foram as mesmas para ambas as regiões e, foram utilizadas sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos e ciclagem da reação para análise dos polimorfismos da região promotora e do éxon 1 (tabelas 5 e 6).

Tabela 4. Concentrações dos reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene *TGFBI*.

Reagentes (Concentração)	Concentração final	Volume (µL)
<i>Buffer</i> (10X)*	1X	2,50
MgCL ₂ (50mM)*	1,0mM	2,00
dNTP (1,25mM)*	0,1mM	2,00
<i>Primer Forward</i> (2,5µM)	0,20µM	2,00
<i>Primer Reverse</i> (2,5µM)	0,20µM	2,00
Albumina sérica bovina (20X)*	0,8X	1,00
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/µL)*	1U	0,20
Água ultrapura (Mili-Q)	-	13,80
Amostra	~100ng	~1,00
Total	-	25,00

Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

Tabela 5. Condições utilizadas para a amplificação da região promotora e do éxon 1 do gene *TGFBI*.

Etapa	Região promotora		Éxon 1		Número de ciclos
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo	
Desnaturação inicial	94°C	10min	96°C	10min	1
Desnaturação	94°C	45s	96°C	45s	35
Hibridação	59°C	60s	62°C	60s	
Extensão	72°C	75s	73°C	75s	
Extensão final	72°C	10min	73°C	10min	1

Tabela 6. Sequência de oligonucleotídeos (*primers*), enzimas de restrição, e tamanhos dos fragmentos do produto de PCR e dos produtos de clivagem dos polimorfismos da região promotora (rs1800468 e rs1800469) e do éxon 1 (rs1800470 e rs1800471) do gene *TGFBI*.

Polimorfismos genéticos	Iniciadores (primers)	Produto PCR	Enzimas restrição	Produto clivagem
rs1800468 (G-800A)	F:5'-GCAGTTGGCGAGAACAGTTG-3'	595pb	<i>HpyCH4IV</i>	Alelo G: 402, 195pb
rs1800469 (C-509T)	R:5'-CCAGAACGGAAGGAGAGTCAG-3'		<i>Bsu36I</i>	Alelo A: 597pb Alelo C: 488, 109pb Alelo T: 597pb
rs1800470 (C29T)	F:5'-TTCCCTCGAGGCCCTCCTA-3'	294pb	<i>MspAII</i>	Alelo C: 149pb
rs1800471 (G74C)	R:5'-GCCGCAGCTTGGACAGGATC-3'		<i>BglI</i>	Alelo T: 161pb Alelo G: 131, 102pb Alelo C: 163, 131pb

*A: Adenina; C: Citosina; G: Guanina; T: Timina; F: Primer *Forward*; R: Primer *Reverse*; pb: pares de base.

3.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO DE *TGFBR2*

Para a análise do polimorfismo do gene *TGFBR2*, foi estudado um polimorfismo da região promotora deste gene pela técnica de PCR seguida de restrição enzimática descrita pela primeira vez por SEIJO, E. R.; SONG, H.; LYNCH, M. A.; JENNINGS, R. *et al.* (2001). As concentrações dos reagentes, ciclagem da reação, sequências dos primers e a enzima de restrição estão descritas conforme as tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7. Concentrações dos reagentes utilizados na PCR para amplificação do gene *TGFBR2*.

Reagentes (Concentração)	Concentração final	Volume (µL)
Buffer (10X)*	1X	2,50
MgCL ₂ (50mM)*	1,5mM	0,75
dNTP (1,25mM)*	0,1mM	2,00
Primer <i>Forward</i> (2,5µM)	0,15µM	1,50
Primer <i>Reverse</i> (2,5µM)	0,15µM	1,50
Taq DNA Polimerase (5U/µL)*	1U	0,20
Água ultrapura (Mili-Q)	-	15,55
Amostra	~100ng	~1,00
Total	-	25,00

*Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

Tabela 8. Condições utilizadas para a amplificação da região promotora do gene *TGFBR2*.

Etapa	Região Promotora		Número de ciclos
	Temperatura	Tempo	
Desnaturação inicial	95°C	5min	1
Desnaturação	94°C	45s	35
Hibridação	59°C	45s	
Extensão	72°C	45s	
Extensão final	72°C	10min	1

Tabela 9. Sequência de oligonucleotídeos (*primers*), enzimas de restrição, e tamanhos dos fragmentos do produto de PCR e dos produtos de clivagem da região promotora do polimorfismo do gene *TGFBR2*.

Polimorfismo genético	Iniciadores (primers)	Produto PCR	Enzimas restrição	Produto clivagem
rs3087465 (G-875A)	F:5'-GGA ATG TCT TGG GCA AAT CT-3' R:5'-ACC TGA ATG CTT GTG CTT TTA TT-3'	152 pb	<i>HpyCH4III</i>	Alelo G: 152 pb Alelo A: 93, 59 pb

*A: Adenina; C: Citosina; G: Guanina; T: Timina; F: Primer *Forward*; R: Primer *Reverse*; pb: pares de base.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de associação do tipo caso-controle foram realizadas pelo cálculo de *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) a 95%. Dos polimorfismos estudados, foram testados modelos genotípicos (heterozigotos ou homozigotos variantes contra homozigotos selvagens), dominante (heterozigotos e homozigotos variantes contra homozigotos selvagens) e recessivo (homozigotos variantes contra homozigotos selvagens e heterozigotos).

A inferência das estruturas haplotípicas foi realizada no software PHASE (STEPHENS; SCHEET, 2005; STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001). As estruturas haplotípicas de cada grupo foram sujeitas a cálculo de OR com IC a 95%.

Os cálculos de coeficiente de correlação de Tau-b (tabelas quadradas) e Tau-c (tabelas retangulares) de Kendall foram realizados, correlacionando os polimorfismos genéticos e estruturas haplotípicas do caso com parâmetros clínicos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software IBM® SPSS® Statistics (IBM®, Armonk, New York, USA). Todos os testes foram bicaudais e o nível de significância adotado foi de 0,05.

REFERÊNCIAS

ABDUL-HAMID, G. Classification of Acute Leukemia. 2011.

ALBERT, P. R. What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality. **J Psychiatry Neurosci**, 36, n. 6, p. 363-365, Nov 2011.

ALLEVA, D. G.; BURGER, C. J.; ELGERT, K. D. Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. **The Journal of Immunology**, 153, n. 4, p. 1674-1686, 1994.

ALVARNAS, J. C.; BROWN, P. A.; AOUN, P.; BALLEEN, K. K. *et al.* Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2015. **J Natl Compr Canc Netw**, 13, n. 10, p. 1240-1279, Oct 2015.

AN, Q.; FAN, C. H.; XU, S. M. Recent perspectives of pediatric leukemia - an update. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 21, n. 4 Suppl, p. 31-36, Oct 2017.

ANIES RIZK, M.; DARWISH, A. Study of Epstein Barr virus, Human Herpes 6 and Human Herpes 7 in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 8, n. 03, p. 251-262, 2019.

ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, 127, n. 20, p. 2391-2405, May 19 2016.

ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, 127, n. 20, p. 2391-2405, 2016.

BATLLE, E.; MASSAGUÉ, J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. **Immunity**, 50, n. 4, p. 924-940, 2019.

BENE, M. C.; CASTOLDI, G.; KNAPP, W.; LUDWIG, W. D. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia**, 9, n. 10, p. 1783-1786, Oct 1995.

BÉNÉ, M. C.; NEBE, T.; BETTELHEIM, P.; BULDINI, B. *et al.* Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. **Leukemia**, 25, n. 4, p. 567-574, 2011.

BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.-T.; FLANDRIN, G. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. **British Journal of Haematology**, 33, n. 4, p. 451-458, 1976.

BISPO, J. A. B.; PINHEIRO, P. S.; KOBETZ, E. K. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. a034819, 2019.

BLANK, U.; KARLSSON, S. TGF- β signaling in the control of hematopoietic stem cells. **Blood**, 125, n. 23, p. 3542-3550, 2015.

BRANDALISE, S. R.; VIANA, M. B.; PINHEIRO, V. R. P.; MENDONÇA, N. *et al.* Shorter Maintenance Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The Experience of the Prospective, Randomized Brazilian GBTLI ALL-93 Protocol. **Frontiers in Pediatrics**, 4, 2016.

BRIX, N.; ROSTHOJ, S. Bone marrow involvement is not manifest in the early stages of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Dan Med J**, 61, n. 8, p. A4883, Aug 2014.

BRIX, N.; ROSTHOJ, S.; HERLIN, T.; HASLE, H. Arthritis as presenting manifestation of acute lymphoblastic leukaemia in children. **Arch Dis Child**, 100, n. 9, p. 821-825, Sep 2015.

CAMBIEN, F.; RICARD, S.; TROESCH, A.; MALLET, C. *et al.* Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. **Hypertension**, 28, n. 5, p. 881-887, Nov 1996.

CAZÉ, M. O.; BUENO, D.; SANTOS, M. E. F. d. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Revista HCPA. Porto Alegre. Vol. 30, n. 1 (2010), p. 5-12**, 2010.

CHANG, H.; BROWN, C. W.; MATZUK, M. M. Genetic Analysis of the Mammalian Transforming Growth Factor- β Superfamily. **Endocrine Reviews**, 23, n. 6, p. 787-823, 2002.

CHEIFETZ, S.; WEATHERBEE, J. A.; TSANG, M. L. S.; ANDERSON, J. K. *et al.* The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. **Cell**, 48, n. 3, p. 409-415, 1987.

CHESELLS, J. M.; HARRISON, G.; LILLEYMAN, J. S.; BAILEY, C. C. *et al.* Continuing (maintenance) therapy in lymphoblastic leukaemia: lessons from MRC UKALL X. **British Journal of Haematology**, 98, n. 4, p. 945-951, 1997.

CHIARETTI, S.; ZINI, G.; BASSAN, R. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, 6, n. 1, p. e2014073, 2014.

CONTER, V.; BARTRAM, C. R.; VALSECCHI, M. G.; SCHRAUDER, A. *et al.* Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. **Blood**, 115, n. 16, p. 3206-3214, 2010.

CRAIG, F. E. The utility of peripheral blood smear review for identifying specimens for flow cytometric immunophenotyping. **International Journal of Laboratory Hematology**, 39, p. 41-46, 2017.

CRAIG, F. E.; FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, 111, n. 8, p. 3941-3967, 2008.

DAI, L.; GAST, A.; HORSKA, A.; SCHRAPPE, M. *et al.* A case-control study of childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms in the TGF- β and receptor genes. **Pediatric Blood & Cancer**, 52, n. 7, p. 819-823, 2009.

DAVID, C. J.; MASSAGUÉ, J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 19, n. 7, p. 419-435, 2018.

FLAVELL, R. A.; SANJABI, S.; WRZESINSKI, S. H.; LICONA-LIMÓN, P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . **Nature Reviews Immunology**, 10, n. 8, p. 554-567, 2010.

FORRESTER, J. V.; DICK, A. D.; MCMENAMIN, P. G.; ROBERTS, F. *et al.* Chapter 3 - Genetics. *In*: FORRESTER, J. V.; DICK, A. D., *et al.* (Ed.). **The Eye (Fourth Edition)**: W.B. Saunders, 2016. p. 130-156.e131.

FRANCIS, S. S.; WALLACE, A. D.; WENDT, G. A.; LI, L. *et al.* In utero cytomegalovirus infection and development of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 129, n. 12, p. 1680-1684, 2017.

GBTLI. **Grupo Brasileiro para o Tratamento de Leucemia Infantil. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Criança e do Adolescente.** 2009.

GRAINGER, D. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. **Human Molecular Genetics**, 8, n. 1, p. 93-97, 1999.

GREAVES, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, 18, n. 8, p. 471-484, 2018.

GROTENDORST, G. R.; SMALE, G.; PENCEV, D. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. **Journal of Cellular Physiology**, 140, n. 2, p. 396-402, 1989.

GYULAI, Z.; BALOG, A.; BORBÉNYI, Z.; MÁNDI, Y. Genetic Polymorphisms in Patients with Myelodysplastic Syndrome. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, 52, n. 3-4, p. 463-475, 2005.

HALTON, J.; GABOURY, I.; GRANT, R.; ALOS, N. *et al.* Advanced vertebral fracture among newly diagnosed children with acute lymphoblastic leukemia: results of the Canadian Steroid-Associated Osteoporosis in the Pediatric Population (STOPP) research program. **J Bone Miner Res**, 24, n. 7, p. 1326-1334, Jul 2009.

HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G. *et al.* World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. **Journal of Clinical Oncology**, 17, n. 12, p. 3835-3849, 1999.

HEALY, J.; ROY-GAGNON, M. H.; SINNETT, D. No evidence for association between TGFB1 promoter SNPs and the risk of childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia among French Canadians. **Haematologica**, 94, n. 7, p. 1034-1035, Jul 2009.

HUANG, Y.-S.; ZHONG, Y.; YU, L.; WANG, L. Association between the TGFBR2 G-875A Polymorphism and Cancer Risk: Evidence from a Meta-analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 15, n. 20, p. 8705-8708, 2014.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, 381, n. 9881, p. 1943-1955, 2013.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. 2019. 78-85-7318-389-4. 120 p.

JABBOUR, E.; O'BRIEN, S.; KONOPLEVA, M.; KANTARJIAN, H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, 121, n. 15, p. 2517-2528, Aug 1 2015. Review.

JIN, Q.; HEMMINKI, K.; GRZYBOWSKA, E.; KLAES, R. *et al.* Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming growth factor beta1 and its receptors in familial and unselected breast cancers. **Int J Cancer**, 112, n. 1, p. 94-99, Oct 20 2004.

JULIUSSON, G.; HOUGH, R. Leukemia. **Prog Tumor Res**, 43, p. 87-100, 2016. Review.

KARKI, R.; PANDYA, D.; ELSTON, R. C.; FERLINI, C. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. **BMC Med Genomics**, 8, p. 37, Jul 15 2015.

KATO, M. B-Cell Precursor ALL. p. 47-57, 2020.

KATZ, A. J.; CHIA, V. M.; SCHOONEN, W. M.; KELSH, M. A. Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden. **Cancer Causes Control**, 26, n. 11, p. 1627-1642, Nov 2015.

KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M. A.; PRCHAL, J. T.; LEVI, M. M. *et al.* Williams Hematology. 9ed, p. 2528, 2016.

KOH, K.; KATO, M.; SAITO, A. M.; KADA, A. *et al.* Phase II/III study in children and adolescents with newly diagnosed B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: protocol for a nationwide multicenter trial in Japan. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, 48, n. 7, p. 684-691, 2018.

KUBICZKOVA, L.; SEDLARIKOVA, L.; HAJEK, R.; SEVCIKOVA, S. TGF- β – an excellent servant but a bad master. **Journal of Translational Medicine**, 10, n. 1, p. 183, 2012.

KUBISTOVA, Z.; MRAZEK, F.; PETREK, M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, 153, n. 2, p. 93-102, Jun 2009.

LADINES-CASTRO, W.; BARRAGÁN-IBAÑEZ, G.; LUNA-PÉREZ, M. A.; SANTOYO-SÁNCHEZ, A. *et al.* Morphology of leukaemias. **Revista Médica del Hospital General de México**, 79, n. 2, p. 107-113, 2016.

LUSTOSA DE SOUSA, D. W.; DE ALMEIDA FERREIRA, F. V.; CAVALCANTE FÉLIX, F. H.; DE OLIVEIRA LOPES, M. V. Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 37, n. 4, p. 223-229, 2015.

MANNELLI, F. Immunophenotyping of Acute Leukemias – From Biology to Clinical Application. 2016.

MARTELOSSI CEBINELLI, G. C.; PAIVA TRUGILO, K.; BADARÓ GARCIA, S.; BRAJÃO DE OLIVEIRA, K. TGF- β 1 functional polymorphisms: a review. **European Cytokine Network**, 27, n. 4, p. 81-89, 2016.

MCKENNA, R. W.; WASHINGTON, L. T.; AQUINO, D. B.; PICKER, L. J. *et al.* Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. **Blood**, 98, n. 8, p. 2498-2507, 2001.

METAYER, C.; ZHANG, L.; WIEMELS, J. L.; BARTLEY, K. *et al.* Tobacco Smoke Exposure and the Risk of Childhood Acute Lymphoblastic and Myeloid Leukemias by Cytogenetic Subtype. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 22, n. 9, p. 1600-1611, 2013.

MOPPETT, J.; DOMMETT, R. Clinical Presentation and Prognostic Factors. *In*: VORA, A. (Ed.). **Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia**. 1 ed.: Springer International Publishing, 2017. cap. 2, p. 20.

NURSAL, A. F.; PEHLIVAN, M.; SAHIN, H. H.; PEHLIVAN, S. The Associations of IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, and TGF- β 1 Functional Variants with Acute Myeloid Leukemia in Turkish Patients. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, 20, n. 9, p. 544-551, 2016.

PEHLIVAN, M.; SAHIN, H. H.; PEHLIVAN, S.; OZDILLI, K. *et al.* Prognostic Importance of Single-Nucleotide Polymorphisms in IL-6, IL-10, TGF- β 1, IFN- γ , and TNF- α Genes in Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, 18, n. 6, p. 403-409, 2014.

PICKUP, M.; NOVITSKIY, S.; MOSES, H. L. The roles of TGF β in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, 13, n. 11, p. 788-799, 2013.

PICKUP, M. W.; OWENS, P.; MOSES, H. L. TGF- β , Bone Morphogenetic Protein, and Activin Signaling and the Tumor Microenvironment. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 9, n. 5, p. a022285, 2017.

POLYCHRONAKIS, I.; DOUNIAS, G.; MAKROPOULOS, V.; RIZA, E. *et al.* Work-related leukemia: a systematic review. **J Occup Med Toxicol**, 8, n. 1, p. 14, May 22 2013.

PUI, C. H.; HOWARD, S. C. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. **Lancet Oncol**, 9, n. 3, p. 257-268, Mar 2008.

RIETHER, C.; SCHURCH, C. M.; OCHSENBEIN, A. F. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. **Cell Death Differ**, 22, n. 2, p. 187-198, Feb 2015.

SAKAGUCHI, A. Y.; AMARANTE, M. K.; OLIVEIRA, C. E. C.; HIROKI, C. H. *et al.* Transforming Growth Factor Beta 1: Possible Involvement with Acute Lymphoblastic Leukemia Prognosis in Pediatric Patients. **Clinical Oncology and Research**, 3, n. 9, p. 6-6, 2020.

SANJABI, S.; OH, S. A.; LI, M. O. Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 9, n. 6, p. a022236, 2017.

SARAIVA, D. d. C. A.; SANTOS, S. d. S.; MONTEIRO, G. T. R. Tendência de mortalidade por leucemias em crianças e adolescentes nas capitais dos estados brasileiros: 1980-2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 27, n. 3, 2018.

SCHMIEGELOW, K.; SCHRØDER, H.; GUSTAFSSON, G.; KRISTINSSON, J. *et al.* Risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is related to RBC methotrexate and mercaptopurine metabolites during maintenance chemotherapy. Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology. **Journal of Clinical Oncology**, 13, n. 2, p. 345-351, 1995.

SEIJO, E. R.; SONG, H.; LYNCH, M. A.; JENNINGS, R. *et al.* Identification of genetic alterations in the TGF β type II receptor gene promoter. **Mutat Res**, 483, n. 1-2, p. 19-26, Nov 1 2001.

SEIJO, E. R.; SONG, H.; LYNCH, M. A.; JENNINGS, R. *et al.* Identification of genetic alterations in the TGF β type II receptor gene promoter. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 483, n. 1-2, p. 19-26, 2001.

SEN, E. S.; MOPPETT, J. P.; RAMANAN, A. V. Are you missing leukaemia? **Arch Dis Child**, 100, n. 9, p. 811-812, Sep 2015.

SIEGEL, P. M.; MASSAGUÉ, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. **Nature Reviews Cancer**, 3, n. 11, p. 807-820, 2003.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 69, n. 1, p. 7-34, 2019.

SIRVENT, N.; SUCIU, S.; RIALLAND, X.; MILLOT, F. *et al.* Prognostic significance of the initial cerebro-spinal fluid (CSF) involvement of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) treated without cranial irradiation: results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Children Leukemia Group study 58881. **Eur J Cancer**, 47, n. 2, p. 239-247, Jan 2011.

STEPHENS, M.; SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. **Am J Hum Genet**, 76, n. 3, p. 449-462, Mar 2005.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Am J Hum Genet**, 68, n. 4, p. 978-989, Apr 2001.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, Feb 4 2021.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer J**, 7, n. 6, p. e577-e577, 2017a.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer J**, 7, n. 6, p. e577, Jun 30 2017b.

TORRES, F.; SANTANA ROSA, I. S.; CAVALCANTE, M. S. Leucemia linfóide aguda e seus principais conceitos. **Revista Científica FAEMA**, 8, n. 2, p. 151, 2017.

VAGACE, J. M.; GERVASINI, G. Chemotherapy Toxicity in Patients with Acute Leukemia. *In*: INTECHOPEN (Ed.). **Acute Leukemia - The Scientist's Perspective and Challenge**. Mariastefania Antica, 2011.

VARDIMAN, J. W.; THIELE, J.; ARBER, D. A.; BRUNNING, R. D. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, 114, n. 5, p. 937-951, Jul 30 2009.

VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, 8, n. 7, p. 523-532, 2008.

WOLFRAIM, L. A.; FERNANDEZ, T. M.; MAMURA, M.; FULLER, W. L. *et al.* Loss of Smad3 in Acute T-Cell Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, 351, n. 6, p. 552-559, 2004.

XU, X.; ZHENG, L.; YUAN, Q.; ZHEN, G. *et al.* Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. **Bone Research**, 6, n. 1, 2018.

YAMAZAKI, S.; EMA, H.; KARLSSON, G.; YAMAGUCHI, T. *et al.* Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. **Cell**, 147, n. 5, p. 1146-1158, 2011.

ZHANG, Y. E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 9, n. 2, p. a022129, 2017.

ZHAO, M.; PERRY, J. M.; MARSHALL, H.; VENKATRAMAN, A. *et al.* Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. **Nature Medicine**, 20, n. 11, p. 1321-1326, 2014.

4 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 ARTIGO 1: IMPACT OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 (TGFB1) HAPLOTYPE STRUCTURES IN BRAZILIAN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a heterogeneous disease diagnosed in both children and adults, but its incidence peaks between 2 and 5 years. In hematopoietic microenvironment, TGFβ1 is an important regulator from bone marrow-derived hematopoiesis to adult homeostasis, acting in myelopoiesis and lymphopoiesis. *TGFB1* polymorphisms [rs1800468 (G-800A), rs1800469 (C-509T), rs1800470 (T29C) and rs1800471 (G74C)] were assessed by polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and haplotype structures were inferred for 121 ALL children and 137 controls, and case-control analyses were performed by association studies and calculated by Odds Ratios (OR) with Confidence Interval (CI) 95%. Clinicopathological parameters (age, sex, risk group, relapse and deaths) were tested for correlation with *TGFB1* genetic variants. In this study, C29T polymorphism was a statistically significant protective factor in heterozygosis when compared to wild homozygosis in general ALL (OR = 0.49 IC= 0.25–0.95 $p < 0.05$) and B-ALL (OR = 0.48 IC= 0.24–0.95). Otherwise, C29T in recessive model was significantly associated with increased risk for both general ALL (OR = 2.03 IC=1.21–3.41 $p < 0.01$) and B-ALL subtype (OR = 2.13 IC= 1.24–3.67 $p < 0.01$). No association was found between any of the polymorphisms and the susceptibility for low (LR) or high risk (HR) of relapse groups in general sample or in B-ALL. No association was found for any of the other haplotypes tested with ALL subtypes, nor for ALL risk groups. G74C genotypic model negatively correlated with relapse in general ALL and B-ALL. Furthermore, GCCG and GCTG haplotype positively correlated with age and death, respectively. Otherwise, GTTG has shown a significant negative correlation with death. Interestingly, C-509T in dominant model negatively correlated with death in HR general ALL, whereas GTTG haplotype presented negative correlation with death in the same risk classification. A significant positive correlation between GCCG haplotype and relapse was observed in both LR general ALL and B-ALL. Additionally, GCTG haplotype positively correlated with death in HR general ALL. This study demonstrated for the first time the impact of *TGFB1* haplotype structures over the clinical parameters preconized by Brazilian childhood ALL protocol treatment, and this cytokine may be a promising candidate as a prognostic factor in childhood ALL.

Keywords: ALL, *TGFB1*, haplotype.

1 Introduction

Among the transforming growth factor beta (TGF β) subfamily of growth factors, which comprises three TGF β isoforms, TGF β 1 is the most abundant, widely distributed and well-studied member (Chen and Ten Dijke 2016).

In hematopoietic microenvironment, TGF β 1 is an important regulator in fetal bone marrow-derived hematopoiesis and adult homeostasis, acting both in myelopoiesis and lymphopoiesis (Abou-Ezzi, Supakorndej et al. 2019, Bataller, Montalban-Bravo et al. 2019). Although this cytokine exerts an inhibitory effect on proliferation and differentiation of hematopoietic stem cell progenitor (Fortunel, Hatzfeld et al. 2000, Soderberg, Karlsson et al. 2009, Blank and Karlsson 2015), it presents ability to regulate lymphopoiesis for both B-lineage and T-lineage (Lee, Ellingsworth et al. 1987, Tang, Nuccie et al. 1997, Park, Seo et al. 2005, Sanjabi, Oh et al. 2017).

Several isolated studies described TGF β roles in myeloid lineage-derived hematological malignancies, such as myelodysplastic syndrome (MDS) (Zhou, McMahon et al. 2011), acute myeloid leukemia (AML) (Jakubowiak, Pouponnot et al. 2000), chronic myeloid leukemia (CML) (Zhu, Wang et al. 2011), essential thrombocytosis (Zauli, Visani et al. 1993) and idiopathic myelofibrosis (MF) (Vannucchi, Bianchi et al. 2005).

In comparison with other hematological malignancies, few studies explored the role of TGF β 1 in acute lymphoblastic leukemia (Bataller, Montalban-Bravo et al. 2019). Two studies investigated the involvement of SMAD3, the main cytoplasmic mediator activated through TGF β 1 signaling, in pediatric T-ALL and B-ALL development (Wolfraim, Fernandez et al. 2004, Ford, Palmi et al. 2009).

The *TGFBI* gene is located on chromosome 19, specifically at 19q13.1 locus, and several functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) potentially affecting cancer susceptibility have been reported in this gene (Martelossi Cebinelli, Paiva Trugilo et al. 2016). Among these are rs1800468 (G-800A, g4245G>A) and rs1800469 (C-509T, g4536C>T), located on the *TGFBI* promoter region, and rs1800470 (C29T, Pro10Leu, g.5911C>T) and rs1800471 (G74C, Arg25Pro, g.5956G>C) on the codon 10 and codon 25, respectively, on the signal peptide sequence. (Dai, Gast et al. 2009, Healy, Roy-Gagnon et al. 2009, Winkler, Taschik et al. 2015).

The location of these polymorphisms is related to gene expression regulation and protein secretion, possibly influencing on TGF β 1 production. According to previous evidence, variant T from C-509T polymorphism might be related to increased TGF β 1 production (Grainger, Heathcote et al. 1999), while variant T from C29T polymorphism decrease TGF β 1 secretion

(Dunning, Ellis et al. 2003) and variant A from G-800A has been associated with decreased TGF β 1 circulating levels (Cotton, Gbadegesin et al. 2002, Vitiello, Amarante et al. 2020).

Haplotype structures including these four polymorphisms have not yet been investigated in childhood ALL. Therefore, the aim of the present study was to verify the possible effects of these *TGFBI* genetic variants, on the susceptibility, clinical-pathological parameters and risk stratification of ALL subtypes in Brazilian childhood.

2 Materials and Methods

2.1 Sample characterization

The research protocol was approved by Ethics Committee for Research Involving Human Subjects of the Londrina State University (CAAE N $^{\circ}$ 17123113.4.0000.5231) and a signed free informed consent was obtained from the legal guardians of all children involved in the study and we also obtained the consent of patients with the decision-making ability to participate in the project.

It was collected 2 mL of peripheral blood from 121 pediatric patients with ALL diagnosis confirmed by the guidelines from division of Hematology/Oncology of Londrina Cancer Hospital. ALL stratification and its risk of relapse were based on GBTLI Protocol (GBTLI 2009).

In addition, 2 mL of peripheral blood from 137 children was collected for the control group in University Hospital of Londrina State University. These individuals had no present inflammatory diseases and no abnormalities in hematological, biochemical and immunological tests at blood collection time.

Even with the use of ancestry informative markers-Brazilian population is considered an admixed population, with no clear differences regarding the distributions of Caucasoid, African and Amerindian ancestry markers among individuals (Naslavsky, Scliar et al. 2020). Furthermore, these samples [ALL patients and neoplasia-free children (control group)] were from the region of Londrina, geographically located in southern Brazil (Parana State). Therefore, this present research was not stratified into ethnic groups. The ancestry of Parana population presents the higher degree of European genetic ancestry (Caucasian population) in comparison with other Brazilian regions (Parra, Amado et al. 2003, Pena, Bastos-Rodrigues et al. 2009, Lins, Vieira et al. 2010, Kehdy, Gouveia et al. 2015, Souza, Resende et al. 2019).

In relation to haplotype distribution, our neoplasia-free children population was compared with populations registered in database from 1000 genomes project made freely

available through LDlink application (<https://analysistools.nci.nih.gov/LDlink/>) (Machiela and Chanock 2015).

2.2 DNA extraction

Genomic DNA was isolated from whole peripheral blood using Biopur Mini Spin Plus Kit (Biometrix Diagnostica, Curitiba, Parana, Brazil), following the manufacturer's instructions. The DNA samples were quantified in a NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) at 260 nm wavelength. The absorbance ratios of 260/280 and 260/230 nm were applied to analyze DNA purity.

2.3 *TGFBI* genotyping

TGFBI polymorphisms were evaluated through polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, as described by Jin, Hemminki et al. (2004) with modifications described in Vitiello, Guembarovski et al. (2018).

PCRs and RFLP were performed according to Vitiello, Guembarovski et al. (2018). All PCR reagents were acquired from Invitrogen™ (Carlsbad, CA, USA), and all restriction enzymes and their corresponding buffers were purchased from New England Biolabs® (Ipswich, USA).

2.4 Haplotype analysis

The inference of *TGFBI* haplotype structures was based on the genotypes of all samples using PHASE software version 2.1.1 (Stephens, Smith et al. 2001, Stephens and Scheet 2005). Moreover, permutation test was also evaluated in this software to check haplotype distribution differences between control group and ALL patients. Linkage disequilibrium analysis was performed using Haploview 4.2 software (Barrett, Fry et al. 2005).

2.5 Statistical analyses

Odds Ratios (OR) with 95% confidence intervals (CIs) were calculated for case-control association studies. The models of association considered in analyses were: genotypic model (variant homozygotes or heterozygotes versus wild homozygotes), dominant model (variant homozygotes and heterozygotes versus wild-type homozygotes) and recessive model (variant homozygotes versus heterozygotes and wild-type homozygotes). In addition, association between *TGFBI* haplotype structures and ALL risk of relapse was also analyzed.

The correlation analyses were performed by Kendall's rank correlation tests assessing *TGFBI* genetic variants and clinicopathological parameters.

All statistical analyses were performed in IBM® SPSS® Statistics software version 22 (IBM®, Armonk, New York City, NY, USA). All tests were two-tailed and had significance levels set at 0.05.

3 Results

3.1 Sample characterization

The ALL patients (n = 121) were stratified among the main subtypes regarding immunophenotypes: B-lineage ALL (n = 100) and T-lineage ALL (n = 21). ALL patients' clinicopathological features for each subtype are summarized in Table 1.

Table 1. Clinicopathological features distribution of ALL patients and control group.

Parameter	ALL general (n = 121)	B-ALL (n = 100)	T-ALL (n = 21)	Control (n = 137)
Age (years)				
Median (IQ range)	6.0 (9)	6.0 (9)	10.0 (7)	12.0 (7)
Mean (SD)	7.8 (5.2)	7.5 (5.2)	9.2 (4.8)	11.6 (5.7)
≥ 1 and < 9 [n (%)]	72 (59.5)	62 (62.0)	10 (47.6)	34 (24.8)
< 1 and ≥ 9 [n %]	49 (40.5)	38 (38.0)	11 (52.4)	103 (75.2)
Sex [n (%)]				
Male	64 (52.9)	51 (51.0)	13 (61.9)	65 (47.4)
Female	57 (47.1)	49 (49.0)	8 (38.1)	72 (52.6)
Risk group [n (%)]				
High Risk (HR)	90 (74.4)	69 (69.0)	21 (100)	–
Low Risk (LR)	31 (25.6)	31 (31.0)	0 (0)	–
Relapse [n (%)]				
Positive	15 (12.4)	11 (11.0)	4 (19.0)	–
Negative	106 (87.6)	89 (89.0)	17 (81.0)	–
Deaths [n (%)]				
Yes	29 (24.0)	21 (21.0)	8 (38.1)	–
No (Survivors)	92 (76.0)	79 (79.0)	13 (61.9)	–

Both ALL patients and control children were tested for Hardy-Weinberg equilibrium test and no deviation from the expected genotype distribution was observed for any genetic polymorphism. C-509T and C29T presented the highest linkage disequilibrium among any pair of the studied *TGFBI* polymorphisms ($D' = 0.73$; $LOD = 31.0$; $r^2 = 0.443$; Table S1).

3.2 *TGFBI* polymorphisms and ALL susceptibility

Genotype frequencies for each individual polymorphism in control group, general ALL sample and in ALL subgroups (T and B) are shown in Table 2. No differences in genotype distribution was noted comparing neoplasia-free children to any of ALL groups. Similarly, the genotypes distribution did not differ between the risk groups (Table S2).

Table 2. Genotypes distribution among ALL subtypes and control group.

Genotype	Subtypes [n (%)]			
	Control	General ALL	B-ALL	T-ALL
G-800A				
GG	127 (92.7)	111 (91.7)	90 (90.0)	21 (100)
GA	8 (5.8)	10 (8.3)	10 (10.0)	0 (0)
AA	2 (1.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
p value	Reference	0.77	0.46	–
C-509T				
CC	51 (37.2)	45 (37.2)	38 (38.0)	7 (33.3)
CT	71 (51.8)	58 (47.9)	46 (46.0)	12 (57.2)
TT	15 (11.0)	18 (14.9)	16 (16.0)	2 (9.5)
p value	Reference	0.99	0.90	0.73
C29T				
CC	24 (17.5)	27 (22.3)	22 (22.0)	5 (23.8)
CT	75 (54.8)	41 (33.9)	33 (33.0)	8 (38.1)
TT	38 (27.7)	53 (43.8)	45 (45.0)	8 (38.1)
p value	Reference	0.33	0.39	0.49
G74C				
GG	124 (90.5)	106 (87.6)	89 (89.0)	17 (81.0)
GC	13 (9.5)	14 (11.6)	11 (11.0)	3 (14.2)
CC	0 (0)	1 (0.8)	0 (0)	1 (4.8)
p value	Reference	0.45	0.70	0.19

Next, we examined the association between these polymorphisms and ALL risk through case-control association analyses. C29T polymorphism was a statistically significant protective factor in heterozygosis when compared to wild homozygosis in both general ALL and B-ALL (OR = 0.49; CI = 0.25–0.95; $p < 0.05$; OR: 0.48; CI = 0.24–0.98; $p < 0.05$, respectively). Otherwise, C29T T allele in recessive model was significantly associated with increased risk for both general ALL (OR = 2.03; CI = 1.21–3.41; $p < 0.01$) and B-ALL subtype (OR = 2.13; CI = 1.24–3.67; $p < 0.01$) (Table 3). No association was found between any of the polymorphisms and the susceptibility for Low Risk (LR) or High Risk (HR) of relapse groups in general sample or in B-ALL (Table S3).

Table 3. Case-control association analyses in the ALL subtypes.

Model	ALL subtypes [OR (CI 95%)]		
	General ALL	B-ALL	T-ALL
G-800A			
GA vs GG	1.43 (0.55–3.75)	1.76 (0.67–4.64)	–
Dominant	1.14 (0.46–2.85)	1.41 (0.56–3.53)	0.93 (0.88–0.97)
C-509T			
CT vs CC	0.93 (0.55–1.57)	0.87 (0.50–1.52)	1.23 (0.45–3.34)
TT vs CC	1.36 (0.62–3.01)	1.43 (0.63–3.25)	0.97 (0.18–5.18)
Dominant	1.00 (0.60–1.66)	0.97 (0.57–1.65)	1.19 (0.45–3.13)
Recessive	1.33 (0.63–2.79)	1.44 (0.67–3.09)	0.86 (0.18–4.04)
C29T			
CT vs CC	0.49 (0.25–0.95)*	0.48 (0.24–0.98)*	0.51 (0.15–1.71)
TT vs CC	1.24 (0.62–2.47)	1.29 (0.63–2.66)	1.01 (0.30–3.45)
Dominant	0.74 (0.40–1.37)	0.75 (0.40–1.44)	0.68 (0.23–2.04)
Recessive	2.03 (1.21–3.41)**	2.13 (1.24–3.67)**	1.60 (0.62–4.17)
G74C			
GC vs GG	1.26 (0.57–2.80)	1.18 (0.51–2.75)	1.68 (0.44–6.52)
Dominant	1.35 (0.62–2.96)	1.18 (0.51–2.75)	2.24 (0.66–7.68)

*p<0.05

**p<0.01

Dominant model: heterozygotes and variant homozygotes vs wild homozygotes.

Recessive model: variant homozygotes vs wild homozygotes and heterozygotes.

3.3 *TGFBI* haplotype structures and ALL susceptibility

Table 4 shows the allele distribution of *TGFBI* haplotype structures of each group. In the represented haplotype structures, SNPs were ordered from G-800A to the G74C locus (left to right). As shown, no significant differences were observed in global haplotype distribution through permutation analysis. Also, no significant difference in haplotype structures was noted between risk groups (Table S4).

Table 4. Haplotype distribution among ALL subtypes and control

Haplotype structure#	Haplotype count [n (%)]			
	Control	General ALL	B-ALL	T-ALL
GCCG	23 (8.39)	8 (3.31)	6 (3.00)	2 (4.76)
GCCC	9 (3.29)	10 (4.13)	6 (3.00)	4 (9.52)
GCTG	127 (46.35)	114 (47.11)	95 (47.50)	19 (45.24)
GCTC	1 (0.37)	6 (2.48)	5 (2.50)	1 (2.38)
GTCG	88 (32.12)	76 (31.41)	64 (32.00)	12 (28.57)
GTCC	3 (1.09)	1 (0.41)	1 (0.50)	0 (0)
GTTG	10 (3.65)	17 (7.02)	13 (6.50)	4 (9.53)
ACTG	13 (4.74)	10 (4.13)	10 (5.00)	0 (0)
Total	274	242	200	42
p value	Reference	0.29	0.35	0.30

#SNP alleles were considered in haplotype structures in the following order: G-800A, C-509T, C29T and G74C.

To refine statistical analyses, each haplotype was tested for association with ALL susceptibility through case-control association studies. In these analyses, each haplotype was

tested against the entire remaining sample. Dominant model was derived for all haplotypes, while recessive model could be tested only for the two most frequent alleles. GCTC and GTCC haplotypes were not in these analyses due to their rarity in our sample, and it was not observed significant association between control group and ALL subtypes in haplotype structures analyses (Table 5). Moreover, no association was found for any of the other haplotypes tested with ALL subtypes, nor for ALL risk groups (Tables S5).

Table 5. Recessive and dominant association models for haplotype structures.

Model	ALL Subtypes [OR (CI 95%)]		
	General ALL	B-ALL	T-ALL
Recessive			
GCTG	1.62 (0.89–2.98)	1.74 (0.93–3.25)	1.11 (0.34–3.59)
GTCG	1.47 (0.66–3.29)	1.56 (0.68–3.57)	1.10 (0.23–5.29)
Dominant			
GCTG	0.72 (0.42–1.24)	0.70 (0.40–1.24)	0.83 (0.30–2.30)
GTCG	0.82 (0.50–1.33)	0.84 (0.50–1.40)	0.73 (0.29–1.83)
GCCC	1.14 (0.44–2.98)	0.91 (0.31–2.64)	2.37 (0.59–9.58)
GCCG	0.58 (0.24–1.41)	0.52 (0.19–1.39)	0.86 (0.18–4.04)
GTTG	1.80 (0.78–4.17)	1.57 (0.64–3.85)	2.99 (0.84–10.59)
ACTG	1.03 (0.42–2.52)	1.27 (0.52–3.12)	–

*p<0.05

3.4 Influence of *TGFBI* variants and haplotype structures over the ALL clinical parameters

To find out the possible impact of examined genetic variants over the ALL clinical parameters, Kendall's correlation tests were performed both for individual *TGFBI* variants (Table 6) and haplotype structures (Table 7).

Table 6. Correlation between polymorphisms and relapse of ALL subtypes.

ALL subtypes	Models by SNP	Relapse [Tau (p-value)]
General ALL	G74C	
	Genotypic	-0.061 (0.002)**
B-ALL	Dominant	–
	G74C	
	Genotypic	-0.048 (0.008)**
	Dominant	

*p<0.05

**p<0.01

Table 7. Correlation between haplotype models and clinicopathological parameters of ALL subtypes.

ALL subtypes	Models by Haplotype	Parameter [Tau (p-value)]	
		Age	Deaths
General ALL	Recessive		
	GCTG	–	0.203 (0.026)*
	Dominant		
	GCCG	0.187 (0.04)*	–
	GTTG	–	-0.211 (0.021)*

*p<0.05

G74C genotypic model negatively correlated with relapse and death in both general ALL (Tau = -0.061 ; $p < 0.01$) and B-ALL (Tau = -0.048 ; $p < 0.01$) (Table 6). Furthermore, GCTG haplotype recessive model presented positive correlation with death for general ALL (Tau = 0.203 ; $p < 0.05$), and GCCG in dominant model positively correlated with age for general ALL (Tau = 0.187 ; $p < 0.05$). Otherwise, GTTG dominant model correlated negatively with death for general ALL (Tau = -0.211 ; $p < 0.05$) (Table 7).

We also tested the correlation between polymorphisms (Table S6) and haplotype structures (Table S7) with risk stratification by ALL subtypes. Interestingly, C-509T dominant model presented significant negative correlation with death for HR in general ALL (Tau = -0.211 ; $p < 0.05$) (Table S6). GCCG haplotype correlated positively with relapse for both LR general ALL (Tau = 0.358 ; $p < 0.05$) and LR B-ALL (Tau = 0.358 ; $p < 0.05$) (Table S7). Moreover, GCTG haplotype presented significantly positive correlation with death for HR general ALL (Tau = 0.245 ; $p < 0.05$) (Table S7). However, GTTG correlated negatively with death for HR general ALL (Tau = -0.250 ; $p < 0.05$) (Table S7).

4 Discussion

TGF β 1 exerts pivotal roles in hematopoiesis, regulating a wide range of physiological processes, from homeostasis to induction of quiescence and self-renewal of hematopoietic stem cells (HSCs) (Kim and Letterio 2003, Blank and Karlsson 2015). Although TGF β 1 generally acts as a negative regulator of hematopoiesis, this cytokine may exhibit dual effects. Specifically, low concentrations of TGF β 1 can stimulate proliferation of myeloid-lineage cells but it can inhibit proliferation of lymphoid-lineage cells (Challen, Boles et al. 2010).

In this study, polymorphisms located on different regions of *TGFBI* gene, two on the promoter region and two on the signal peptide sequence, all of which were shown to influence gene expression or protein secretion of this cytokine. Recently, the study of the polymorphisms located in the promoter region, in ALL, were described by our group (Sakaguchi, Amarante et al. 2020). In the present work, we research *TGFBI* gene polymorphisms and haplotype structures. There are no association studies investigating *TGFBI* genetic variants in childhood ALL Brazilian population and relating risk stratification.

In relation to G74C polymorphism, G allele carriers showed an increased serum concentration of TGF β 1 production when compared with CC homozygotes (Awad, El-Gamel et al. 1998). Regarding C29T polymorphism, it is positioned in the hydrophobic core portion

of signal peptide region, which has a change from amino acids proline (encoded by C allele) to leucine (encoded by T) at position 10 (Cambien, Ricard et al. 1996) and bioinformatics analyses, revealed that this change modifies the conformation and affinity of the TGF β 1 signal peptide sequence to translocation complexes in endoplasmic reticulum membrane (Susianti, Handono et al. 2014). This evidence was consistent with *in vitro* transfection experiment showing that C allele obtained 2.8-fold higher TGF β 1 production than T allele (Dunning, Ellis et al. 2003). Furthermore, other evidences found that individuals with CC genotype had high serum concentration of TGF β 1 in comparison with CT and TT genotypes (Awad, El-Gamel et al. 1998, Yokota, Ichihara et al. 2000, Taubenschuss, Marton et al. 2013).

The genotype frequencies for each polymorphism from our neoplasia-free group were compared with that from a Brazilian cohort of elderly healthy individuals from Sao Paulo's city, located on the Southeastern region of Brazil (<http://abraom.ib.usp.br/>) (Naslavsky, Scliar et al. 2020) and with previous publications (Vitiello, Guembarovski et al. 2018). No significant difference was observed between other Brazilians populations and our neoplasia-free children population, confirming that genotype frequencies from our study are consistent with the Brazilian population.

In this present study, our neoplasia-free children group showed significant difference in *TGFBI* haplotype distribution from some populations available in the 1000 Genomes Project Data, such as African, Ad-Mixed, East Asian and European populations but it did not differ significantly with South Asian populations. These findings were consistent with previous study involving breast cancer (BC) research, showing that Brazilian control group differed significantly from all populations in this data set (Vitiello et al, 2018), suggesting that genetic constitution of the Brazilian population is different compared to other populations around the world.

In relation to *TGFBI* signal peptide polymorphisms, the present study evidenced a protective association for CT genotype from C29T SNP in general ALL, while T allele in recessive model has shown a significant risk association in general and B-ALL. Consistently, previous research demonstrated that C29T TT genotype presented a risk association on myelodysplastic syndrome (MDS) with refractory anemia subtypes (Balog, Borbenyi et al. 2005). In contrast with our result, Pehlivan, Okan et al. (2011) found protective association of TT genotype over the ITP. Furthermore, CT genotype indicated an increased susceptibility for diffuse large B-cell lymphoma (the most common type of NHL), bringing conflicting results (Marangon, Colli et al. 2019). Other previous studies related to ALL and other hematological

diseases did not detect association for C29T polymorphism (Dai, Gast et al. 2009, Pehlivan, Sahin et al. 2014, Nursal, Pehlivan et al. 2016).

Regarding G74C polymorphism, we observed no association for ALL susceptibility. Otherwise, Nursal, Pehlivan et al. (2016) reported an increased risk association for GC genotype with AML in Turkish patients, and other group associated GG genotype with risk for non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) in female patients (Mazur, Bogunia-Kubik et al. 2006). Due to rarity of G74C variant (C allele), studies with larger cohort may be necessary to confirm any association for this SNP.

Recently, our research group observed low TGF β 1 cytokine plasma levels in ALL patients when compared to control group, and we observed the recovery of this cytokine during different therapeutic regimen (Sakaguchi, Amarante et al. 2020). Thus, next step was to analyze *TGFBI* haplotype structures in ALL subtypes. In the haplotype association analyses, no significant differences between neoplasia-free children and ALL subtypes. This finding was opposite with Brazilian BC study, in which low producer GCTG haplotype presented significantly protection against HER2+ BC, and high-producer GTCG haplotype conferred increased risk for the same BC subtype (Vitiello, Guembarovski et al. 2018). These observations may probably demonstrate that TGF β 1 cytokine behave in different manner in different diseases.

TGF β and Forkhead O (FOXO) signaling cooperate to guarantee the quiescence of hematopoietic stem cells. The activities of the FOXO transcription factors lead to the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (CDKN1C) gene that encodes the CDK inhibitor p57^{kip2}, which is essential to maintain the quiescence of HSC. TGF- β signaling in the bone marrow microenvironment induces the expression of p57^{kip2} in hematopoietic stem cells. As TGF- β signaling activates SMAD3 which can be associated with FOXO transcription factors to induce the production of p57^{kip2}, a functional axis that integrates TGF- β signaling through Smad3 and FOXO proteins can control quiescence and maintenance of HSC (Naka and Hirao 2017).

Another transcription factor well established is transcriptional intermediary factor 1 γ (TIF1 γ), which is able to regulate TGF β signaling, inhibiting the formation of the SMAD2/3/4 complex (He, Dorn et al. 2006). Although TIF1 γ is able to control hematopoiesis, dysregulation of this protein can promote tumor survival in B-lineage lymphoblasts in B-ALL (Wang, Kawaoka et al. 2015). Herein, these transcription factors may demonstrate interesting relation with TGF β and their variants that may be involved in ALL prognosis.

Few studies demonstrated the impact of *TGFBI* haplotype in hematological malignancies. No significant association was observed in ALL (Dai, Gast et al. 2009) and AML (Nursal, Pehlivan et al. 2016). Contrariwise, high-producer CG haplotype (C29T and G74C) conferred a protective factor against CML patients (Pehlivan, Sahin et al. 2014). These previous studies were consistent with our haplotype association analyses, observing no significant differences between neoplasia-free children and ALL subtypes.

Our study also indicated that GCCG and GCTG haplotype positively correlated with age and death, respectively, in general ALL, but GTTG showed negative correlation with death in this same subtype. High concentrations of TGF β induces cell quiescence in lymphoid-HSCs (Challen, Boles et al. 2010, Blank and Karlsson 2015), suggesting that *TGFBI* variants might be involved on the impairment of blastic leukemogenesis at the moment of ALL diagnosis which is indicative of poor prognosis.

Concerning about stratification protocols, we stratified ALL patients in two main risk groups, LR and HR. Additionally, it is emphasized that all T-ALL are classified as HR due to its' enhanced aggressiveness (GBTLI 2009). Although we observed no significant association between risk groups, our study subsequently evaluated the impact of *TGFBI* variants on the clinical presentation in risk-stratified ALL patients. The TGF β 1 high-producer genotype, G74C G allele negatively correlated with relapse in general and B-ALL. However, caution is warranted for conclusions regarding these variants, given that their rarity demands larger cohorts to investigate their effects.

For children with suspected hematological impairment through image findings or laboratory tests (Kato 2020), the administration of glucocorticoids is introduced in low doses before the treatment in Brazilian ALL patients. In the beginning of treatment protocol treatment, the ALL-diagnosed patients are directed to prophase treatment, in which are administrated doses of prednisolone with aim of decreasing leukemic blasts (GBTLI 2009). Previous studies reported that glucocorticoids like prednisolone and dexamethasone are considered highly effective treatments in ALL and prevent a few adverse effects during treatment (Inaba and Pui 2010, Hunger 2016). Thus, it indicated that *TGFBI* variants with combined chemotherapy might be modulating the TGF β production (Wen, Kohyama et al. 2002) and hematological microenvironment.

The chance for relapse in patients classified as HR is higher for the majority of protocol treatment (Inaba, Greaves et al. 2013, Pui, Yang et al. 2015, Kato and Manabe 2018). This scenario is indicative for poor prognosis in HR classification because leukemic blasts

hypothetically gain chemoresistance, impairing negative regulator function of TGF β 1 in bone marrow microenvironment.

Interestingly, our analyses showed that low-producer GCTG positively correlated with death in HR general ALL, whereas intermediate-producer GCCG haplotype observed significant positive correlation with relapse in both LR general ALL and LR B-ALL. Otherwise, GTTG haplotype negatively correlated with death in HR general ALL. These results demonstrate the importance of stratification of the Brazilian protocol treatment ALL. Additionally, it may indicate that TGF β 1 cytokine may be crucial for survival of these patients, serving like hematopoiesis maintenance.

Therefore, the present study demonstrated for the first time the impact of *TGFBI* haplotype structures over the clinical parameters preconized by Brazilian childhood ALL protocol treatment. There are few studies investigating the involvement of TGF β 1 in ALL, indicating the need for more studies to clarify the roles of this pleiotropic cytokine in this disease. Probably, the modulation of TGF β 1 product by genetic variants may impact on the effects of this cytokine in normal and neoplastic hematopoiesis and might interact with chemotherapeutic treatment, impacting patients response, prognosis and survival.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible and Londrina Cancer Hospital, Parana, Brazil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária do Paraná, Secretaria da Ciência, Superintendência de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (SETI), Conselho Estadual dos Direitos da Criança e do Adolescente (CEDCA), Secretaria da Justiça, Família e Trabalho do Governo do Paraná (SEJUF), and Pro-reitoria de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina (PROPPG-UEL).

Reference

- Abou-Ezzi, G., T. Supakorndej, J. Zhang, B. Anthony, J. Krambs, H. Celik, D. Karpova, C. S. Craft and D. C. Link (2019). "TGF-beta Signaling Plays an Essential Role in the Lineage Specification of Mesenchymal Stem/Progenitor Cells in Fetal Bone Marrow." Stem Cell Reports **13**(1): 48-60.
- Awad, M. R., A. El-Gamel, P. Hasleton, D. M. Turner, P. J. Sinnott and I. V. Hutchinson (1998). "Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation." Transplantation **66**(8): 1014-1020.
- Balog, A., Z. Borbenyi, Z. Gyulai, L. Molnar and Y. Mandi (2005). "Clinical importance of transforming growth factor-beta but not of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in patients with the myelodysplastic syndrome belonging to the refractory anemia subtype." Pathobiology **72**(3): 165-170.

- Barrett, J. C., B. Fry, J. Maller and M. J. Daly (2005). "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." *Bioinformatics* **21**(2): 263-265.
- Bataller, A., G. Montalban-Bravo, K. A. Soltysiak and G. Garcia-Manero (2019). "The role of TGFbeta in hematopoiesis and myeloid disorders." *Leukemia* **33**(5): 1076-1089.
- Blank, U. and S. Karlsson (2015). "TGF-beta signaling in the control of hematopoietic stem cells." *Blood* **125**(23): 3542-3550.
- Cambien, F., S. Ricard, A. Troesch, C. Mallet, L. Generenaz, A. Evans, D. Arveiler, G. Luc, J. B. Ruidavets and O. Poirier (1996). "Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study." *Hypertension* **28**(5): 881-887.
- Challen, G. A., N. C. Boles, S. M. Chambers and M. A. Goodell (2010). "Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1." *Cell Stem Cell* **6**(3): 265-278.
- Chen, W. and P. Ten Dijke (2016). "Immunoregulation by members of the TGFbeta superfamily." *Nat Rev Immunol* **16**(12): 723-740.
- Cotton, S. A., R. A. Gbadegesin, S. Williams, P. E. Brenchley and N. J. Webb (2002). "Role of TGF-beta1 in renal parenchymal scarring following childhood urinary tract infection." *Kidney Int* **61**(1): 61-67.
- Dai, L., A. Gast, A. Horska, M. Schrappe, C. R. Bartram, K. Hemminki, R. Kumar and J. L. Bermejo (2009). "A case-control study of childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms in the TGF-beta and receptor genes." *Pediatr Blood Cancer* **52**(7): 819-823.
- Dunning, A. M., P. D. Ellis, S. McBride, H. L. Kirschenlohr, C. S. Healey, P. R. Kemp, R. N. Luben, J. Chang-Claude, A. Mannermaa, V. Kataja, P. D. Pharoah, D. F. Easton, B. A. Ponder and J. C. Metcalfe (2003). "A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer." *Cancer Res* **63**(10): 2610-2615.
- Ford, A. M., C. Palmi, C. Bueno, D. Hong, P. Cardus, D. Knight, G. Cazzaniga, T. Enver and M. Greaves (2009). "The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF-beta pathway in early B lineage progenitor cells." *J Clin Invest* **119**(4): 826-836.
- Fortunel, N. O., A. Hatzfeld and J. A. Hatzfeld (2000). "Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis." *Blood* **96**(6): 2022-2036.
- GBTLI (2009). Grupo Brasileiro para o Tratamento de Leucemia Infantil. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Criança e do Adolescente.
- Grainger, D. J., K. Heathcote, M. Chiano, H. Snieder, P. R. Kemp, J. C. Metcalfe, N. D. Carter and T. D. Spector (1999). "Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1." *Hum Mol Genet* **8**(1): 93-97.
- He, W., D. C. Dorn, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. A. Moore and J. Massague (2006). "Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway." *Cell* **125**(5): 929-941.
- Healy, J., M. H. Roy-Gagnon and D. Sinnett (2009). "No evidence for association between TGFB1 promoter SNPs and the risk of childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia among French Canadians." *Haematologica* **94**(7): 1034-1035.
- Hunger, S. P. (2016). "Glucocorticoid selection for pediatric ALL." *Blood* **127**(17): 2049-2051.
- Inaba, H., M. Greaves and C. G. Mullighan (2013). "Acute lymphoblastic leukaemia." *Lancet* **381**(9881): 1943-1955.
- Inaba, H. and C. H. Pui (2010). "Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia." *Lancet Oncol* **11**(11): 1096-1106.
- Jakubowiak, A., C. Pouponnot, F. Berguido, R. Frank, S. Mao, J. Massague and S. D. Nimer (2000). "Inhibition of the transforming growth factor beta 1 signaling pathway by the AML1/ETO leukemia-associated fusion protein." *J Biol Chem* **275**(51): 40282-40287.

- Jin, Q., K. Hemminki, E. Grzybowska, R. Klaes, M. Soderberg, H. Zientek, J. Rogozinska-Szczepka, B. Utracka-Hutka, J. Pamula, W. Pekala and A. Forsti (2004). "Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming growth factor beta1 and its receptors in familial and unselected breast cancers." *Int J Cancer* **112**(1): 94-99.
- Kato, M. (2020). *Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia*, Springer Singapore.
- Kato, M. and A. Manabe (2018). "Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia." *Pediatr Int* **60**(1): 4-12.
- Kehdy, F. S., M. H. Gouveia, M. Machado, W. C. Magalhaes, A. R. Horimoto, B. L. Horta, R. G. Moreira, T. P. Leal, M. O. Scliar, G. B. Soares-Souza, F. Rodrigues-Soares, G. S. Araujo, R. Zamudio, H. P. Sant Anna, H. C. Santos, N. E. Duarte, R. L. Fiaccone, C. A. Figueiredo, T. M. Silva, G. N. Costa, S. Beleza, D. E. Berg, L. Cabrera, G. Debortoli, D. Duarte, S. Ghirotto, R. H. Gilman, V. F. Goncalves, A. R. Marrero, Y. C. Muniz, H. Weissensteiner, M. Yeager, L. C. Rodrigues, M. L. Barreto, M. F. Lima-Costa, A. C. Pereira, M. R. Rodrigues, E. Tarazona-Santos and E. P. C. Brazilian (2015). "Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(28): 8696-8701.
- Kim, S. J. and J. Letterio (2003). "Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis." *Leukemia* **17**(9): 1731-1737.
- Lee, G., L. R. Ellingsworth, S. Gillis, R. Wall and P. W. Kincade (1987). "Beta transforming growth factors are potential regulators of B lymphopoiesis." *J Exp Med* **166**(5): 1290-1299.
- Lins, T. C., R. G. Vieira, B. S. Abreu, D. Grattapaglia and R. W. Pereira (2010). "Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs." *Am J Hum Biol* **22**(2): 187-192.
- Machiela, M. J. and S. J. Chanock (2015). "LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants." *Bioinformatics* **31**(21): 3555-3557.
- Marangon, A. V., C. M. Colli, D. M. Cardozo, J. E. L. Visentainer, A. M. Sell, F. Guimaraes, S. B. D. Marques, S. R. Lieber, F. J. P. Aranha, R. Zulli, V. H. de Souza and C. A. de Souza (2019). "Impact of SNPs/Haplotypes of IL10 and IFNG on the Development of Diffuse Large B-Cell Lymphoma." *J Immunol Res* **2019**: 2137538.
- Martelossi Cebinelli, G. C., K. Paiva Trugilo, S. Badaro Garcia and K. Brajao de Oliveira (2016). "TGF-beta1 functional polymorphisms: a review." *Eur Cytokine Netw* **27**(4): 81-89.
- Mazur, G., K. Bogunia-Kubik, T. Wrobel, K. Kuliczowski and A. Lange (2006). "TGF-beta1 gene polymorphisms influence the course of the disease in non-Hodgkin's lymphoma patients." *Cytokine* **33**(3): 145-149.
- Naka, K. and A. Hirao (2017). "Regulation of Hematopoiesis and Hematological Disease by TGF-beta Family Signaling Molecules." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**(9).
- Naslavsky, M. S., M. O. Scliar, G. L. Yamamoto, J. Y. T. Wang, S. Zverinova, T. Karp, K. Nunes, J. R. M. Ceroni, D. L. de Carvalho, C. E. da Silva Simões, D. Bozoklian, R. Nonaka, N. d. S. B. Silva, A. da Silva Souza, H. de Souza Andrade, M. R. S. Passos, C. F. B. Castro, C. T. Mendes-Junior, R. L. V. Mercuri, T. L. A. Miller, J. L. Buzzo, F. O. Rego, N. M. Araújo, W. C. Magalhães, R. Célia Mingroni-Netto, V. Borda, H. Guio, M. L. Barreto, M. F. Lima-Costa, B. L. Horta, E. Tarazona-Santos, D. Meyer, P. A. F. Galante, V. Guryev, E. C. Castelli, Y. A. O. Duarte, M. R. Passos-Bueno and M. Zatz (2020). "Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil)." 2020.2009.2015.298026.
- Nursal, A. F., M. Pehlivan, H. H. Sahin and S. Pehlivan (2016). "The Associations of IL-6, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10, and TGF-beta1 Functional Variants with Acute Myeloid Leukemia in Turkish Patients." *Genet Test Mol Biomarkers* **20**(9): 544-551.

- Park, S. R., G. Y. Seo, A. J. Choi, J. Stavnezer and P. H. Kim (2005). "Analysis of transforming growth factor-beta1-induced Ig germ-line gamma2b transcription and its implication for IgA isotype switching." *Eur J Immunol* **35**(3): 946-956.
- Parra, F. C., R. C. Amado, J. R. Lambertucci, J. Rocha, C. M. Antunes and S. D. Pena (2003). "Color and genomic ancestry in Brazilians." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 177-182.
- Pehlivan, M., V. Okan, T. Sever, S. O. Balci, M. Yilmaz, T. Babacan and S. Pehlivan (2011). "Investigation of TNF-alpha, TGF-beta 1, IL-10, IL-6, IFN-gamma, MBL, GPIA, and IL1A gene polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura." *Platelets* **22**(8): 588-595.
- Pehlivan, M., H. H. Sahin, S. Pehlivan, K. Ozdilli, L. Kaynar, F. S. Oguz, T. Sever, M. Yilmaz, B. Eser, Y. D. Ogret, C. Kis, V. Okan, M. Cetin and M. Carin (2014). "Prognostic importance of single-nucleotide polymorphisms in IL-6, IL-10, TGF-beta1, IFN-gamma, and TNF-alpha genes in chronic phase chronic myeloid leukemia." *Genet Test Mol Biomarkers* **18**(6): 403-409.
- Pena, S. D. J., L. Bastos-Rodrigues, J. R. Pimenta and S. P. Bydlowski (2009). "DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians %J Brazilian Journal of Medical and Biological Research." **42**: 870-876.
- Pui, C. H., J. J. Yang, S. P. Hunger, R. Pieters, M. Schrappe, A. Biondi, A. Vora, A. Baruchel, L. B. Silverman, K. Schmiegelow, G. Escherich, K. Horibe, Y. C. Benoit, S. Izraeli, A. E. Yeoh, D. C. Liang, J. R. Downing, W. E. Evans, M. V. Relling and C. G. Mullighan (2015). "Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration." *J Clin Oncol* **33**(27): 2938-2948.
- Sakaguchi, A. Y., M. K. Amarante, C. E. C. Oliveira, C. H. Hiroki, F. C. Trigo and M. A. E. Watanabe (2020). "Transforming Growth Factor Beta 1: Possible Involvement with Acute Lymphoblastic Leukemia Prognosis in Pediatric Patients." *Clinical Oncology and Research* **3**(9): 6-6.
- Sanjabi, S., S. A. Oh and M. O. Li (2017). "Regulation of the Immune Response by TGF-beta: From Conception to Autoimmunity and Infection." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**(6).
- Soderberg, S. S., G. Karlsson and S. Karlsson (2009). "Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling." *Ann N Y Acad Sci* **1176**: 55-69.
- Souza, A. M., S. S. Resende, T. N. Sousa and C. F. A. Brito (2019). "A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population." *Genet Mol Biol* **42**(3): 495-508.
- Stephens, M. and P. Scheet (2005). "Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation." *Am J Hum Genet* **76**(3): 449-462.
- Stephens, M., N. J. Smith and P. Donnelly (2001). "A new statistical method for haplotype reconstruction from population data." *Am J Hum Genet* **68**(4): 978-989.
- Susianti, H., K. Handono, B. B. Purnomo, N. Widodo, A. Gunawan and H. Kalim (2014). "Changes to signal peptide and the level of transforming growth factor- beta1 due to T869C polymorphism of TGF beta1 associated with lupus renal fibrosis." *Springerplus* **3**: 514.
- Tang, J., B. L. Nuccie, I. Ritterman, J. L. Liesveld, C. N. Abboud and D. H. Ryan (1997). "TGF-beta down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors." *J Immunol* **159**(1): 117-125.
- Taubenschuss, E., E. Marton, M. Mogg, B. Frech, L. Ehart, D. Muin and M. Schreiber (2013). "The L10P polymorphism and serum levels of transforming growth factor beta1 in human breast cancer." *Int J Mol Sci* **14**(8): 15376-15385.
- Vannucchi, A. M., L. Bianchi, F. Paoletti, A. Pancrazzi, E. Torre, M. Nishikawa, M. Zingariello, A. Di Baldassarre, R. A. Rana, R. Lorenzini, E. Alfani, G. Migliaccio and A. R. Migliaccio (2005). "A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF-beta1 in the development of myelofibrosis." *Blood* **105**(9): 3493-3501.

- Vitiello, G. A. F., M. K. Amarante, J. M. M. Oda, B. K. B. Hirata, C. E. C. de Oliveira, C. Z. Campos, K. B. de Oliveira, R. L. Guembarovski and M. A. E. Watanabe (2020). "Transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) plasmatic levels in breast cancer and neoplasia-free women: Association with patients' characteristics and TGFB1 haplotypes." *Cytokine* **130**: 155079.
- Vitiello, G. A. F., R. L. Guembarovski, B. K. B. Hirata, M. K. Amarante, C. E. C. de Oliveira, K. B. de Oliveira, G. C. M. Cebinelli, A. L. Guembarovski, C. Z. Campos and M. A. E. Watanabe (2018). "Transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) polymorphisms and haplotype structures have dual roles in breast cancer pathogenesis." *J Cancer Res Clin Oncol* **144**(4): 645-655.
- Wang, E., S. Kawaoka, J. S. Roe, J. Shi, A. F. Hohmann, Y. Xu, A. S. Bhagwat, Y. Suzuki, J. B. Kinney and C. R. Vakoc (2015). "The transcriptional cofactor TRIM33 prevents apoptosis in B lymphoblastic leukemia by deactivating a single enhancer." *Elife* **4**: e06377.
- Wen, F. Q., T. Kohyama, C. M. Skold, Y. K. Zhu, X. Liu, D. J. Romberger, J. Stoner and S. I. Rennard (2002). "Glucocorticoids modulate TGF-beta production." *Inflammation* **26**(6): 279-290.
- Winkler, B., J. Taschik, I. Haubitz, M. Eyrich, P. G. Schlegel and V. Wiegering (2015). "TGFbeta and IL10 have an impact on risk group and prognosis in childhood ALL." *Pediatr Blood Cancer* **62**(1): 72-79.
- Wolfrain, L. A., T. M. Fernandez, M. Mamura, W. L. Fuller, R. Kumar, D. E. Cole, S. Byfield, A. Felici, K. C. Flanders, T. M. Walz, A. B. Roberts, P. D. Aplan, F. M. Balis and J. J. Letterio (2004). "Loss of Smad3 in acute T-cell lymphoblastic leukemia." *N Engl J Med* **351**(6): 552-559.
- Yokota, M., S. Ichihara, T. L. Lin, N. Nakashima and Y. Yamada (2000). "Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese." *Circulation* **101**(24): 2783-2787.
- Zauli, G., G. Visani, L. Catani, N. Vianelli, L. Gugliotta and S. Capitani (1993). "Reduced responsiveness of bone marrow megakaryocyte progenitors to platelet-derived transforming growth factor beta 1, produced in normal amount, in patients with essential thrombocythaemia." *Br J Haematol* **83**(1): 14-20.
- Zhou, L., C. McMahon, T. Bhagat, C. Alencar, Y. Yu, M. Fazzari, D. Sohal, C. Heuck, K. Gundabolu, C. Ng, Y. Mo, W. Shen, A. Wickrema, G. Kong, E. Friedman, L. Sokol, I. Mantzaris, A. Pellagatti, J. Boulwood, L. C. Plataniias, U. Steidl, L. Yan, J. M. Yingling, M. M. Lahn, A. List, M. Bitzer and A. Verma (2011). "Reduced SMAD7 leads to overactivation of TGF-beta signaling in MDS that can be reversed by a specific inhibitor of TGF-beta receptor I kinase." *Cancer Res* **71**(3): 955-963.
- Zhu, X., L. Wang, B. Zhang, J. Li, X. Dou and R. C. Zhao (2011). "TGF-beta1-induced PI3K/Akt/NF-kappaB/MMP9 signalling pathway is activated in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukaemia hemangioblasts." *J Biochem* **149**(4): 405-414.

Supplementary Information

Table S1. Linkage disequilibrium analyses of *TGFBI* polymorphisms.

Polymorphisms	D'	LOD	r ²
G-800A x C-509T	1.0	0.97	0.028
G-800A x C29T	1.0	2.04	0.034
G-800A x G74C	1.0	0.61	0.003
C-509T x C29T	0.73	31.0	0.443
C-509T x G74C	0.627	0.99	0.015
C29T x G74C	0.416	0.99	0.015

Table S2. Genotype distributions for ALL risk stratification.

Genotype	ALL subtypes and risk stratification [n (%)]			
	General ALL		B-ALL	
	Low Risk (n = 31)	High Risk (n = 90)	Low Risk (n = 31)	High Risk (n = 69)
G-800A				
GG	28 (90.3)	83 (92.2)	28 (90.3)	62 (89.9)
GA	3 (9.7)	7 (7.8)	3 (9.7)	7 (10.1)
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
C-509T				
CC	11 (35.5)	34 (37.8)	11 (35.5)	27 (39.1)
CT	12 (38.7)	46 (51.1)	12 (38.7)	34 (49.3)
TT	8 (25.8)	10 (11.1)	8 (25.8)	8 (11.6)
C29T				
CC	9 (29.0)	18 (20.0)	9 (29.0)	13 (18.9)
CT	10 (32.3)	31 (34.4)	10 (32.3)	23 (33.3)
TT	12 (38.7)	41 (45.6)	12 (38.7)	33 (47.8)
G74C				
GG	27 (87.1)	79 (87.8)	27 (87.1)	62 (89.9)
GC	4 (12.9)	10 (11.1)	4 (12.9)	7 (10.1)
CC	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	0 (0)

Table S3. Risk association between *TGFBI* genotypes and ALL subtypes risk of relapse.

Model	General ALL [OR (95%CI)]	B-ALL [OR (95%CI)]
	Low Risk vs High Risk	Low Risk vs High Risk
G-800A		
GA vs GG	0.79 (0.19–3.25)	1.05 (0.25–4.38)
Dominant	0.79 (0.19–3.25)	1.05 (0.25–4.38)
C-509T		
CT vs CC	1.24 (0.49–3.15)	1.15 (0.44–3.02)
TT vs CC	0.40 (0.13–1.28)	0.41 (0.12–1.36)
Dominant	0.91 (0.39–2.12)	0.86 (0.36–2.06)
Recessive	0.43 (0.15–1.25)	0.45 (0.15–1.38)
C29T		
CT vs CC	1.55 (0.53–4.53)	1.59 (0.52–4.92)
TT vs CC	1.71 (0.61–4.77)	1.90 (0.65–5.59)
Dominant	1.64 (0.64–4.16)	1.76 (0.66–4.71)
Recessive	1.33 (0.58–3.05)	1.45 (0.61–3.44)
G74C		
GC vs GG	0.85 (0.25–2.95)	0.76 (0.21–2.82)
Dominant	0.94 (0.28–3.20)	0.76 (0.21–2.82)

*p<0.05

OR and CI 95% were estimated by binary logistic regression controlled by age and sex.

Table S4. Haplotype distribution among ALL subtypes and risk stratification.

Haplotype structure#	Haplotype count [n (%)]			
	General ALL		B-ALL	
	Low Risk	High Risk	Low Risk	High Risk
GCCG	2 (3.23)	6 (3.33)	2 (3.23)	4 (2.90)
GCCC	2 (3.23)	8 (4.44)	2 (3.23)	4 (2.90)
GCTG	27 (43.55)	87 (48.33)	27 (43.55)	68 (49.28)
GCTC	1 (1.61)	5 (2.78)	1 (1.61)	4 (2.90)
GTCG	23 (37.09)	53 (29.45)	23 (37.09)	41 (29.71)
GTCC	0 (0)	1 (0.56)	0 (0)	1 (0.72)
GTTG	4 (6.45)	13 (7.22)	4 (6.45)	9 (6.52)
ACTG	3 (4.84)	7 (3.89)	3 (4.84)	7 (5.07)
Total	62	180	62	138

Table S5. Recessive and dominant models for haplotype structures based on risk stratification of ALL subtypes.

Model	ALL subtypes [OR (CI 95%)]	
	General ALL	B-ALL
	Low Risk vs High Risk	Low Risk vs High Risk
Recessive		
GCTG	0.99 (0.39–2.51)	1.09 (0.42–2.86)
GTCG	0.46 (0.15–1.43)	0.47 (0.14–1.54)
Dominant		
GCTG	1.56 (0.66–3.65)	0.80 (0.34–1.87)
GTCG	0.79 (0.35–1.79)	1.55 (0.64–3.77)

Table S6. Correlation between polymorphisms and clinicopathological parameters of ALL risk stratification.

Risk group of ALL subtypes	Models by SNP	Parameter [Tau (p-value)]
General ALL – High Risk	C-509T Dominant	Deaths -0.211 (0.046)*

*p<0.05

Table S7. Correlation between haplotype models and clinicopathological parameters of ALL risk stratification.

Risk group of ALL subtypes	Models by haplotype	Parameters [Tau (p-value)]	
		Relapse	Deaths
General ALL – Low Risk	Dominant		
	GCCG	0.358 (0.05)*	–
General ALL – High Risk	Recessive		
	GCTG	–	0.245 (0.021)*
	Dominant		
B-ALL – Low Risk	GTTG	–	-0.250 (0.018)*
	Dominant		
	GCCG	0.358 (0.05)*	–

*p<0.05

4.2 ARTIGO 2: INVOLVEMENT OF *TGFBR2* POLYMORPHISM IN CLINICAL PRESENTATION OF BRAZILIAN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematological neoplasia that affects the precursor cells of strains B, T and Natural Killer, with a higher incidence in the pediatric range. The receptor for transforming growth factor beta (TGF β R) appears to be involved in hematologic malignancies. A single nucleotide polymorphism (SNP) was identified on its promoter region (rs3087465, G-875A,) which this SNP seems to modify TGF β RII expression in cells and it has been investigated in several tumors. The aim of this present study was to evaluate the possible involvement of *TGFBR2* rs3087465 polymorphism in Brazilian childhood ALL, focusing on its susceptibility, clinicopathological parameters and risk stratification. The *TGFBR2* rs3087465 polymorphism evaluation was performed through polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Regarding genotypes distribution there was no statistically significant difference between ALL subgroups and neoplasia-free children. It was verified that rs3087465 was statistically associated with increased susceptibility for general ALL and B-ALL in recessive model (OR = 2.03; CI = 1.05–3.95; $p < 0.05$ and OR = 2.12; CI = 1.06–4.23; $p < 0.05$, respectively). Interestingly, it was observed significantly increased association for high risk (HR) for relapse in general ALL and B-ALL patients in recessive model (OR = 5.54; CI = 1.21–25.28; $p < 0.05$ and OR = 6.37; CI = 1.37–29.59; $p < 0.01$, respectively). It was also shown a significant increased association for the same group for relapse in B-ALL in AA homozygous genotype (OR = 6.30; CI = 1.26–31.60; $p < 0.05$). Furthermore, positive correlation between risk group and rs3087465 polymorphism in recessive model was observed in general ALL and B-ALL (Tau = 0.23; $p = 0.02$ and Tau = 0.27; $p = 0.009$, respectively), and the same finding was observed in additive model in B-ALL (Tau = 0.21; $p = 0.03$). Concerning about T-ALL, positive correlation was observed between relapse and rs3087465 in additive and dominant models (Tau = 0.40; $p = 0.03$ and Tau = 0.52, $p = 0.04$, respectively). In this work, it was verified that rs3087465 was statistically associated with increased susceptibility for general ALL and B-ALL and HR for relapse in recessive model. There was positive correlation between ALL relapse and rs3087465 in additive and dominant models. This polymorphism may be a strong candidate for a possible prognostic marker in ALL.

Keywords: ALL, TGF β R, genetic variants.

1 Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disease with uncontrolled proliferation of precursor lymphoid cells with ability to invade bone marrow, bloodstream and extramedullary sites. Although the peak of incidence occurs in children between 1 and 4 years old, ALL may affect both children and adults (Malard and Mohty 2020).

The basis of ALL treatment is chemotherapy, consisting of a combination of chemotherapeutic agents during the therapy (Cooper and Brown 2015, Wyatt and Bram 2019), which negatively affects host immune system, leading to opportunistic infections (Chandran, Morgan et al. 2012). Because of this reason, the involvement of immune system molecules such as TGF β signaling and tumor immunity becomes the target of comprehending immunomodulation in tumor microenvironment (Kerkar and Restifo 2012, Chen, Zhuang et al. 2015).

Transforming growth factor beta (TGF β) subfamily is composed by three TGF β isoforms, in which TGF β 1 is considered the most abundant and widely studied (Chen and Ten Dijke 2016). This subfamily acts since embryogenesis until adult life in either physiological or pathological conditions, such as cell differentiation, proliferation, apoptosis and immunological tolerance (Kubiczkova, Sedlarikova et al. 2012, Batlle and Massague 2019).

Activated TGF β is able to interact with proteoglycans available on the cell membrane (such as TGF β R3), promoting TGF β binding to the serine/threonine kinase receptor TGF β receptor 2 (TGF β R2 followed by TGF β receptor 1 (ALK5 or TGF β R1) and activating two pathways: classical (SMAD-mediated) and alternative (Rho GTPase, Ras-MAPK, PI3K/AKT/mTOR-mediated) (David and Massague 2018, Vander Ark, Cao et al. 2018). Additionally, these pathways are considered important regulators in hematopoietic compartment, controlling proliferation and differentiation of several cell types (myeloid and lymphoid lineages) (Blank and Karlsson 2015, Bataller, Montalban-Bravo et al. 2019).

TGF β signaling seems that have two sides of the same coin in carcinogenesis level, acting as tumor suppressor in less aggressive cancer due to epithelial to mesenchymal transition in alternative pathway and growth tumor stimulator and metastases inductor in high aggressive cancer (Tang, Vu et al. 2003, Yang, Pang et al. 2010, Colak and Ten Dijke 2017). However, the exact role of this signaling in ALL and in leukemogenesis context remains obscure, and it is unknown the contribution of TGF β receptors (TGF β R1 and TGF β R2) over the childhood cancer, including ALL.

TGFBR2 gene is mapped on chromosome (3p22 locus) and a single nucleotide polymorphism (SNP) was identified on its promoter region (rs3087465, G-875A) (Seijo, Song et al. 2001). This SNP seems to modify TGF β R2 expression in epithelial cells (Seijo, Song et al. 2001) and it has been investigated in several solid tumors, such as breast cancer (Jin, Hemminki et al. 2004, Vitiello, Amarante et al. 2019), gastric cancer (Jin, Wang et al. 2007, Xu, Zeng et al. 2011), esophageal squamous cell carcinoma (Jin, Deng et al. 2008), lung cancer (Ren, Yin et al. 2015) and prostate cancer (Teixeira, Gomes et al. 2013).

Few studies have explored the study of *TGFBR2* polymorphism in hematologic malignancies. A study performed by Li, Bench et al. (2001) investigated the possible effect of rs3087465 on polycythemia vera and did not find association with pathogenesis. Another study performed on ALL patients, revealed that this polymorphism was not statistically associated with susceptibility to the disease (Dai, Gast et al. 2009). Thus, the aim of this present study was to evaluate the possible involvement of *TGFBR2* rs3087465 polymorphism in Brazilian childhood ALL subtypes, focusing on its susceptibility, clinicopathological parameters and risk stratification.

2 Materials and Methods

2.1 Children sample characterization

The study protocol was reviewed and approved by Ethics Committee for Research Involving Human Subjects of the Londrina State University (CAAE N° 17123113.4.0000.5231). The free and informed consent form was signed by the parents of all children and adolescents, and we also obtained the consent of patients with the decision-making ability to participate in the project.

Briefly, 2 mL of peripheral blood was collected from 107 with ALL Londrina Cancer Hospital, at the same moment of the blood collection of routine examinations of the participants. ALL was classified according to the European Group for Immunophenotyping of Leukemias (EGIL) recommendations (Bene, Castoldi et al. 1995). Patients identified as having relapsed and critical data were selected (date of relapse, date of second remission if attained, date of subsequent relapse, survival status, date of last contact or death and cause of death).

ALL stratification and its risk of relapse were based on Brazilian Childhood Leukemia Treatment Group (GBTLI) (GBTLI 2009). This protocol was defined by GBTLI-LLA 99, updated on December 12, 2001 (Brandalise, Pinheiro et al. 2010). This protocol uses the

classification of the National Cancer Institute and the *in vivo* therapeutic response evaluated at the 7th, 14th, and 28th days of induction treatment with four drugs (dexamethasone, vincristine, daunorubicin and asparaginase) and defines patients as high and low risk (GBTLI-LLA 2000). In the low-risk (LR) group, patients older than or equal to 1 year and less than 9 years old are included, leucometry less than 50,000/mm³ at diagnosis and less than 5,000/mm³ at the 7th day of treatment, absence of peripheral blasts and low bone marrow (BM) involvement on the 14th day of treatment and BM with low count of leukemic cells at 28th of induction, if there is infiltration of blasts in the central nervous system at diagnosis, these should be absent on the examination of cerebrospinal fluid on the 14th day of treatment. For the high-risk (HR) group, it is considered age less than 1 year and greater than or equal to 9 years, leucometry greater than 50,000/mm³ at diagnosis and greater than or equal to 5,000/mm³ on the 7th day of treatment, presence of leukemic blasts in the peripheral blood or extensive involvement of BM on the 14th day, evidence of extra-medullary leukemic involvement at the end of induction (Cazé, Bueno et al. 2010).

Peripheral blood (2mL) was collected from 161 children for control group in University Hospital of Londrina State University. These children did not present history of cancer or inflammatory diseases (based on hematological, biochemical and immunological tests) at the time of blood collection.

The clinicopathological parameters for ALL patients, subtypes, age parameter was stratified into two groups (≥ 1 and < 9 ; < 1 and ≥ 9) and mean and median age were calculated for each ALL subtype in Table 1. In relation to risk group, T-ALL was not stratified because this subtype is classified as High Risk (HR) due to its aggressiveness.

In the current research project, all samples (ALL patients and neoplasia-free children) were obtained in the region of Londrina, located in southern Brazil (Parana State). Although Brazil presents high miscegenation in which would interfere in classification into ethnic groups and genetic markers (Pimenta, Zuccherato et al. 2006, Pena, Bastos-Rodrigues et al. 2009, Naslavsky, Scliar et al. 2020), this region shows a high degree of European inheritance (Caucasoid ethnicity) (Parra, Amado et al. 2003, Pena, Bastos-Rodrigues et al. 2009, Lins, Vieira et al. 2010, Kehdy, Gouveia et al. 2015).

2.2 Genomic DNA Isolation

Genomic DNA was extracted from whole blood using Biopur Mini Spin Plus Kit (Biometrix Diagnostica, Curitiba, Brazil), according to manufacturer's instructions. DNA

samples were quantified by NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) at wavelength of 260/280.

2.3 *TGFBR2* rs3087465 genotyping

The *TGFBR2* rs3087465 polymorphism evaluation was performed through polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis according to Zhang, Guo et al. (2011) with modifications.

Shortly, all samples of this study were amplified and subsequently, PCR amplicons were subjected to enzyme restriction according to Vitiello, Amarante et al. (2019) All fragments were visualized through electrophoresis in 10% polyacrylamide gels stained with silver nitrate (AgNO₃).

2.4 Statistical analyses

In this study, Chi-squared (χ^2) test was performed to verify differences in genotype and allele frequencies among groups. Odds Ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) were estimated in case-control study. The models of association tested were: genotypic (heterozygotes or variant homozygotes vs wild homozygotes), dominant (heterozygotes and variant homozygotes vs wild homozygotes), and recessive (variant homozygotes vs heterozygotes and wild homozygotes). Additionally, risk association was performed among *TGFBR2* polymorphism and ALL risk of relapse with the same test described above.

Then, the correlation analyses between *TGFBR2* polymorphism and clinicopathological parameters were calculated by Kendall's tau-b (square tables) and tau-c (rectangular table) rank correlations coefficient considering additive (genotypic) model (GG = 0; GA = 1; AA = 2), dominant model (GG = 0; GA or AA = 1) and recessive model (GG or GA = 0; AA = 1). All statistical analyses were performed in SPSS® Statistics software version 22 (IBM®, Armonk, New York City, NY, USA). The significance level adopted was 5%.

3 Results

Regarding correlation analyses, all clinicopathological parameters were categorized as described in Table 1.

Table 1. Distribution of ALL patients' clinicopathological parameters

Parameter	General ALL	B-ALL	T-ALL
Age (years)			
Median (IQ range)	6.0 (9)	5.5 (9)	10 (7)
Mean (SD)	7.6 (5.2)	7.1 (5.2)	9.9 (4.7)
≥ 1 and < 9 [n (%)]	66 (61.7)	58 (64.4)	8 (47.1)
< 1 and ≥ 9 [n (%)]	41 (38.3)	32 (35.6)	9 (52.9)
Sex [n (%)]			
Female	85 (53.1)	44 (48.9)	8 (47.1)
Male	75 (46.9)	46 (51.1)	9 (52.9)
Risk group [n (%)]			
Low Risk (LR)	31 (29.0)	31 (34.4)	0 (0)
High Risk (HR)	76 (71.0)	59 (65.6)	17 (100)
Relapse [n (%)]			
Positive	14 (86.9)	10 (11.1)	4 (23.5)
Negative	93 (13.1)	80 (88.9)	13 (76.5)
Deaths [n (%)]			
Yes	24 (22.4)	19 (21.1)	4 (23.5)
No (Survivors)	83 (77.6)	71 (78.9)	13 (76.5)

3.1 *TGFBR2* rs3087465 and ALL susceptibility

Table 2 shows allele and genotypes distribution for ALL subtypes and neoplasia-free children. No statistically significant differences were noted when comparing both allele and genotypes distribution between neoplasia-free children and ALL groups.

Table 2. Allelic and genotypic distribution of *TGFBR2* polymorphism among controls and ALL subgroups.

<i>TGFBR2</i> allele/genotype	Control (n = 161) [n (%)]	ALL subgroups [n (%)]		
		ALL general (n = 107)	B-ALL (n = 90)	T-ALL (n = 17)
Genotype frequency				
GG	60 (37.5)	41 (38.3)	33 (36.7)	8 (47.1)
GA	83 (51.9)	43 (40.2)	37 (41.1)	6 (35.3)
AA	17 (10.6)	23 (21.5)	20 (22.2)	3 (17.6)
p value ^a	–	0.89	0.90	0.44
Allele frequency				
G	117 (36.6)	125 (58.4)	103 (57.2)	22 (64.7)
A	203 (63.4)	89 (41.6)	77 (42.8)	12 (35.3)
p value ^a	–	0.24	0.17	0.88

^a Chi-squared (χ^2) test

Association test was performed between *TGFBR2* polymorphism and ALL susceptibility through case-control association studies (Table 3). We observed that G-875A was statistically associated with increased susceptibility for general ALL and B-ALL in recessive model (OR = 2.03; CI = 1.05–3.95; $p < 0.05$ and OR = 2.12; CI = 1.06–4.23; $p < 0.05$,

respectively) (Table 3). Moreover, a tendency was observed for general ALL and B-ALL in AA genotype model ($0.05 < p < 0.1$) (Table 3).

Table 3. Association analyses between *TGFBR2* polymorphism and ALL subgroups.

ALL Subgroup	Model	OR	95% CI	p-value ^a
General ALL	GA	0.76	0.44 – 1.30	0.34
	AA	1.98	0.94 – 4.16	0.091
	Dominant	0.97	0.58 – 1.60	0.90
	Recessive	2.03	1.05 – 3.95	0.04*
B-ALL	GA	0.81	0.46 – 1.44	0.56
	AA	2.14	0.99 – 4.64	0.07
	Dominant	1.04	0.61 – 1.77	1.00
	Recessive	2.12	1.06 – 4.23	0.045*
T-ALL	GA	0.54	0.18 – 1.64	0.40
	AA	1.32	0.32 – 5.54	0.71
	Dominant	0.68	0.25 – 1.84	0.45
	Recessive	1.59	0.42 – 6.05	0.45

^aOdds ratio (OR) and 95% confidence interval (95%CI) * $p < 0.05$

Dominant (heterozygotes and variant homozygotes vs wild homozygotes), and Recessive (variant homozygotes vs heterozygotes and wild homozygotes).

Next, we examined risk association test between *TGFBR2* polymorphism and ALL risk of relapse status (Table 4). T-ALL was not included in this analysis. Interestingly, it was positively associated with HR classification in recessive model considering general ALL and B-ALL (OR = 5.54; CI = 1.21–25.28; $p < 0.05$; OR = 6.37; CI = 1.37–29.59; $p < 0.01$, respectively) (Table 4). Furthermore, it was observed a positive association with HR in AA genotype model for B-ALL (OR = 6.30; CI = 1.26–31.60; $p < 0.05$). It was shown a tendency towards to a positive association for general group in this model ($0.05 < p < 0.1$) (Table 4).

Table 4. Association analysis between *TGFBR2* polymorphism and ALL risk of relapse status

ALL Subgroup	Risk group	Model	OR	95% CI	p value ^a
ALL general	LR vs HR	GA	0.78	0.32 – 1.93	0.65
		AA	4.88	0.99 – 23.97	0.06
		Dominant	1.24	0.53 – 2.90	0.67
		Recessive	5.54	1.21 – 25.28	0.02*
B-ALL	LR vs HR	GA	0.98	0.38 – 2.54	1.00
		AA	6.30	1.26 – 31.60	0.03*
		Dominant	1.61	0.66 – 3.91	0.36
		Recessive	6.37	1.37 – 29.59	0.008*

^aOdds ratio (OR) and 95% confidence interval (95%CI) * $p < 0.05$

Dominant (heterozygotes and variant homozygotes vs wild homozygotes), and Recessive (variant homozygotes vs heterozygotes and wild homozygotes).

3.2 *TGFBR2* rs3087465 correlation with ALL clinicopathological parameters

According to results, positive correlation between risk group and G-875A polymorphism in recessive model was observed in general ALL (Tau = 0.234; p = 0.02). Moreover, this polymorphism positively correlated with risk group in either additive or recessive model considering B-ALL (Tau = 0.214; p = 0.03 and Tau = 0.275; p = 0.009, respectively). Regarding T-ALL, positive correlation was observed between relapse and G-875A in additive and dominant models (Tau = 0.401; p = 0.03 and Tau = 0.523; p = 0.04, respectively) (Table 5).

Table 5. Correlation analyses between models for *TGFBR2* polymorphism and ALL clinicopathological parameters

ALL subgroup	Parameters	Models for <i>TGFBR2</i> [Tau (p-value)]		
		Additive	Dominant	Recessive
General ALL	Age	0.071 (0.49)	0.028 (0.77)	0.102 (0.29)
	Sex	-0.105 (0.31)	-0.089 (0.36)	-0.073 (0.45)
	Risk Group	0.140 (0.10)	0.048 (0.63)	0.234 (0.02)*
	Relapse	0.034 (0.65)	0.021 (0.83)	0.067 (0.49)
	Deaths	-0.027 (0.76)	-0.037 (0.70)	-0.009 (0.93)
B-ALL	Age	0.090 (0.41)	0.052 (0.62)	0.105 (0.32)
	Sex	-0.152 (0.17)	-0.120 (0.26)	-0.119 (0.26)
	Risk Group	0.214 (0.03)*	0.110 (0.30)	0.275 (0.009)*
	Relapse	-0.021 (0.80)	-0.089 (0.40)	0.066 (0.53)
	Deaths	0.028 (0.77)	0.010 (0.93)	0.051 (0.63)
T-ALL	Age	0.176 (0.42)	0.157 (0.47)	0.110 (0.61)
	Sex	0.097 (0.70)	0.056 (0.82)	0.127 (0.61)
	Risk Group	-	-	-
	Relapse	0.401 (0.03)*	0.523 (0.04)*	0.107 (0.67)
	Deaths	-0.111 (0.56)	-0.033 (0.90)	-0.257 (0.30)

*p < 0.05. Dominant (heterozygotes and variant homozygotes vs wild homozygotes), and Recessive (variant homozygotes vs heterozygotes and wild homozygotes).

4 Discussion

ALL is considered a malignant hematologic disease which affects mainly children, and some factors like immunologic molecules and genetic alterations may contribute to leukemogenesis (Malard and Mohty 2020), such as TGF β . Genetic and/or epigenetic alterations modify TGF β signaling which can act as a double-edged sword. The activation or suppression by these alterations can lead to deregulation and imbalance in signaling pathways, which may result in hematological diseases and/or malignancies (Naka and Hirao 2017). Studies have shown that deregulation of TGF β signaling leads to loss of negative regulation of hematopoiesis, leading to lymphoid disorders (Kim and Letterio 2003, Blank and Karlsson 2015, Bataller, Montalban-Bravo et al. 2019).

One of the reasons for triggering instability of TGF β signaling can be alterations found in several types of cancers, such as loss of expression or mutations (Levy and Hill 2006, Xu and Pasche 2007). In this context, the TGF β R2 could be a target for gene alteration like mutation or inactivation (Levy and Hill 2006, Ku, Park et al. 2007), including hematological malignancies (Kim and Letterio 2003, Wu, Su et al. 2017).

In the present study, we investigated the possible association of *TGFBR2* polymorphism rs3087465 with Brazilian childhood ALL subtypes and according to results, recessive model associated with general ALL and B-ALL susceptibility ($p = 0.04$ and $p = 0.045$, respectively). Dai, Gast et al. (2009) did not find significant association between this polymorphism and German childhood ALL subgroups. Moreover, some studies involving solid tumors presented opposite behavior, observing protective associations over several types of cancer (Huang, Zhong et al. 2014, Ren, Yin et al. 2015, Vitiello, Amarante et al. 2019). This may indicate that this polymorphism behaves differently depending on the type of cancer in question.

In relation to risk of relapse status, HR group had significantly increased risk association over the LR in rs3087465 recessive model considering general ALL and B-ALL ($p = 0.02$ and $p = 0.008$, respectively). Additionally, this group with significant increased risk association in rs3087465 AA genotype model was observed in B-ALL ($p = 0.03$), suggesting that general ALL and B-ALL patients with AA genotype may predict more chance to develop relapse.

Next, we compared the rs3087465 allele frequency from our control population to that of surrounding the world using data from 1000 Genomes project, available through the LDlink application (<https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=ldhap>) for genetic characterization (Machiela and Chanock 2015). Allelic frequencies differed with African and European populations, Mexican population and majority of East Asian and South Asian populations ($p < 0.05$). Variant allele A in our neoplasia-free children was lower than in majority of African populations ($p < 0.001$) but was higher than in Mexican ($p = 0.014$), all European ($p < 0,05$) and majority of East Asian ($p < 0.05$). It is important to emphasize that these observations demonstrate the genetic variation among other populations. The differences between the frequencies of polymorphisms occur due to the genetic and ethnic differences of each population.

When our neoplasia-free children group was compared with genotype frequencies to cohort elderly healthy subjects from the city of São Paulo, Brazil (available on the Online Archive of Brazilian Mutations –ABraOM: <http://abraom.ib.usp.br/>) (Naslavsky, Scliar et al. 2020), interestingly we did not find significant differences for rs3087465. In addition, our neoplasia-free children frequency of *TGFBR2* polymorphism was very similar with previous Brazilian breast cancer study (Vitiello, Amarante et al. 2019).

Recently, our group demonstrated that TGFβ1 plasma levels in ALL patients was lower than control group and chemotherapy effect seems to modulate the circulating TGFβ1 until achieving remission (Sakaguchi, Amarante et al. 2020), suggesting a good prognosis. Consistently, one study detected low *TGFB1* and *TGFBR2* gene expression in ALL patients (Aghaeenezhad, Mohammadi et al. 2018). On the other hand, high *TGFBR2* gene expression predicted a poor clinical prognosis in acute myeloid leukemia (AML) patients (Wu, Su et al. 2017).

The rs3087465 in recessive model correlated positively with risk group in either general ALL or B-ALL and positive correlation with risk group in additive model was observed only in B-ALL. These findings were consistent with risk association studies, whereas additive and dominant models correlated positively with relapse in T-ALL.

In childhood T-ALL, the loss of SMAD3 protein and p27^{kip1} cyclin-dependent kinase inhibitor further towards to T-cell leukemogenesis (Wolfrain, Fernandez et al. 2004) and extramedullary relapse (Nguyen, Devidas et al. 2008). This may suggest that *TGFBR2* polymorphism indicate a poor prognosis, dysregulating TGFβ signaling followed by hyperproliferation of T-leukemic cells.

Finally, we demonstrated for the first time the involvement of *TGFBR2* rs3087465 polymorphism in Brazilian childhood ALL and it also may indicate a strong candidate for possible susceptibility and prognosis marker in ALL.

Acknowledgements

We are especially grateful to all the children who contributed to this work. The authors acknowledge Fundação Araucária do Paraná, Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), Fundo Estadual para a Infância e Adolescência (FIA/PR), Secretaria da Família e Desenvolvimento Social (SEDS), Conselho Estadual dos Direitos da Criança e do Adolescente (CEDCA), Secretaria da Justiça, Família e Trabalho do Governo do Paraná (SEJUF) and Pró Reitoria de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina (PROPPG-UEL).

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Informed consent: Informed consent was obtained from all parents of individuals included in the control group of this study.

References

Aghaeenezhad, H., M. H. Mohammadi, G. Toogeh, S. Salari, M. R. Khosravi, F. Mezginezhad and M. Allahbakhshian-Farsani (2018). "The evaluation of the TGF-B1 and TBRII gene expression in patients with acute lymphoblastic leukemia." *World Family Medicine* **16**(2): 198-206.

- Bataller, A., G. Montalban-Bravo, K. A. Soltysiak and G. Garcia-Manero (2019). "The role of TGFbeta in hematopoiesis and myeloid disorders." *Leukemia* **33**(5): 1076-1089.
- Battle, E. and J. Massague (2019). "Transforming Growth Factor-beta Signaling in Immunity and Cancer." *Immunity* **50**(4): 924-940.
- Bene, M. C., G. Castoldi, W. Knapp, W. D. Ludwig, E. Matutes, A. Orfao and M. B. van't Veer (1995). "Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)." *Leukemia* **9**(10): 1783-1786.
- Blank, U. and S. Karlsson (2015). "TGF-beta signaling in the control of hematopoietic stem cells." *Blood* **125**(23): 3542-3550.
- Brandalise, S. R., V. R. Pinheiro, S. S. Aguiar, E. I. Matsuda, R. Otubo, J. A. Yunes, W. V. Pereira, E. G. Carvalho, L. M. Cristofani, M. S. Souza, M. L. Lee, J. A. Dobbin, M. S. Pombo-de-Oliveira, L. F. Lopes, K. N. Melnikoff, A. L. Brunetto, L. G. Tone, C. A. Scrideli, V. L. Morais and M. B. Viana (2010). "Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: randomized trial from the Brazilian Childhood Cooperative Group--protocol ALL-99." *J Clin Oncol* **28**(11): 1911-1918.
- Cazé, M. O., D. Bueno and M. E. F. Santos (2010). "Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil." *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre* **30**(1): 5-12.
- Chandran, R., H. Morgan and S. Spurgeon (2012). Infections in Leukemia. *Sepsis - An Ongoing and Significant Challenge*, IntechOpen.
- Chen, F., X. Zhuang, L. Lin, P. Yu, Y. Wang, Y. Shi, G. Hu and Y. Sun (2015). "New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities." *BMC Med* **13**: 45.
- Chen, W. and P. Ten Dijke (2016). "Immunoregulation by members of the TGFbeta superfamily." *Nat Rev Immunol* **16**(12): 723-740.
- Colak, S. and P. Ten Dijke (2017). "Targeting TGF-beta Signaling in Cancer." *Trends Cancer* **3**(1): 56-71.
- Cooper, S. L. and P. A. Brown (2015). "Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia." *Pediatr Clin North Am* **62**(1): 61-73.
- Dai, L., A. Gast, A. Horska, M. Schrappe, C. R. Bartram, K. Hemminki, R. Kumar and J. L. Bermejo (2009). "A case-control study of childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms in the TGF-beta and receptor genes." *Pediatr Blood Cancer* **52**(7): 819-823.
- David, C. J. and J. Massague (2018). "Contextual determinants of TGFbeta action in development, immunity and cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**(7): 419-435.
- GBTLI (2009). Grupo Brasileiro para o Tratamento de Leucemia Infantil. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Criança e do Adolescente.
- Huang, Y. S., Y. Zhong, L. Yu and L. Wang (2014). "Association between the TGFBR2 G-875A polymorphism and cancer risk: evidence from a meta-analysis." *Asian Pac J Cancer Prev* **15**(20): 8705-8708.
- Jin, G., Y. Deng, R. Miao, Z. Hu, Y. Zhou, Y. Tan, J. Wang, Z. Hua, W. Ding, L. Wang, W. Chen, J. Shen, X. Wang, Y. Xu and H. Shen (2008). "TGFB1 and TGFBR2 functional polymorphisms and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a case-control analysis in a Chinese population." *J Cancer Res Clin Oncol* **134**(3): 345-351.
- Jin, G., L. Wang, W. Chen, Z. Hu, Y. Zhou, Y. Tan, J. Wang, Z. Hua, W. Ding, J. Shen, Z. Zhang, X. Wang, Y. Xu and H. Shen (2007). "Variant alleles of TGFB1 and TGFBR2 are associated with a decreased risk of gastric cancer in a Chinese population." *Int J Cancer* **120**(6): 1330-1335.
- Jin, Q., K. Hemminki, E. Grzybowska, R. Klaes, M. Soderberg, H. Zientek, J. Rogozinska-Szczepka, B. Utracka-Hutka, J. Pamula, W. Pekala and A. Forsti (2004). "Polymorphisms and

- haplotype structures in genes for transforming growth factor beta1 and its receptors in familial and unselected breast cancers." *Int J Cancer* **112**(1): 94-99.
- Kehdy, F. S., M. H. Gouveia, M. Machado, W. C. Magalhaes, A. R. Horimoto, B. L. Horta, R. G. Moreira, T. P. Leal, M. O. Scliar, G. B. Soares-Souza, F. Rodrigues-Soares, G. S. Araujo, R. Zamudio, H. P. Sant Anna, H. C. Santos, N. E. Duarte, R. L. Fiaccone, C. A. Figueiredo, T. M. Silva, G. N. Costa, S. Beleza, D. E. Berg, L. Cabrera, G. Debortoli, D. Duarte, S. Ghirotto, R. H. Gilman, V. F. Goncalves, A. R. Marrero, Y. C. Muniz, H. Weissensteiner, M. Yeager, L. C. Rodrigues, M. L. Barreto, M. F. Lima-Costa, A. C. Pereira, M. R. Rodrigues, E. Tarazona-Santos and E. P. C. Brazilian (2015). "Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(28): 8696-8701.
- Kerkar, S. P. and N. P. Restifo (2012). "Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment." *Cancer Res* **72**(13): 3125-3130.
- Kim, S. J. and J. Letterio (2003). "Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis." *Leukemia* **17**(9): 1731-1737.
- Ku, J. L., S. H. Park, K. A. Yoon, Y. K. Shin, K. H. Kim, J. S. Choi, H. C. Kang, I. J. Kim, I. O. Han and J. G. Park (2007). "Genetic alterations of the TGF-beta signaling pathway in colorectal cancer cell lines: a novel mutation in Smad3 associated with the inactivation of TGF-beta-induced transcriptional activation." *Cancer Lett* **247**(2): 283-292.
- Kubiczkova, L., L. Sedlarikova, R. Hajek and S. Sevcikova (2012). "TGF-beta - an excellent servant but a bad master." *J Transl Med* **10**: 183.
- Levy, L. and C. S. Hill (2006). "Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer." *Cytokine Growth Factor Rev* **17**(1-2): 41-58.
- Li, J., A. J. Bench, B. J. Huntly and A. R. Green (2001). "Mutation and methylation analysis of the transforming growth factor beta receptor II gene in polycythaemia vera." *Br J Haematol* **115**(4): 872-880.
- Lins, T. C., R. G. Vieira, B. S. Abreu, D. Grattapaglia and R. W. Pereira (2010). "Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs." *Am J Hum Biol* **22**(2): 187-192.
- Machiela, M. J. and S. J. Chanock (2015). "LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants." *Bioinformatics* **31**(21): 3555-3557.
- Malard, F. and M. Mohty (2020). "Acute lymphoblastic leukaemia." *Lancet* **395**(10230): 1146-1162.
- Naka, K. and A. Hirao (2017). "Regulation of Hematopoiesis and Hematological Disease by TGF-beta Family Signaling Molecules." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**(9).
- Naslavsky, M. S., M. O. Scliar, G. L. Yamamoto, J. Y. T. Wang, S. Zverinova, T. Karp, K. Nunes, J. R. M. Ceroni, D. L. de Carvalho, C. E. da Silva Simões, D. Bozoklian, R. Nonaka, N. d. S. B. Silva, A. da Silva Souza, H. de Souza Andrade, M. R. S. Passos, C. F. B. Castro, C. T. Mendes-Junior, R. L. V. Mercuri, T. L. A. Miller, J. L. Buzzo, F. O. Rego, N. M. Araújo, W. C. Magalhães, R. Célia Mingroni-Netto, V. Borda, H. Guio, M. L. Barreto, M. F. Lima-Costa, B. L. Horta, E. Tarazona-Santos, D. Meyer, P. A. F. Galante, V. Guryev, E. C. Castelli, Y. A. O. Duarte, M. R. Passos-Bueno and M. Zatz (2020). "Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil)." 2020.2009.2015.298026.
- Nguyen, K., M. Devidas, S. C. Cheng, M. La, E. A. Raetz, W. L. Carroll, N. J. Winick, S. P. Hunger, P. S. Gaynon, M. L. Loh and G. Children's Oncology (2008). "Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study." *Leukemia* **22**(12): 2142-2150.
- Parra, F. C., R. C. Amado, J. R. Lambertucci, J. Rocha, C. M. Antunes and S. D. Pena (2003). "Color and genomic ancestry in Brazilians." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 177-182.

- Pena, S. D. J., L. Bastos-Rodrigues, J. R. Pimenta and S. P. Bydlowski (2009). "DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians %J Brazilian Journal of Medical and Biological Research." **42**: 870-876.
- Pimenta, J. R., L. W. Zuccherato, A. A. Debes, L. Maselli, R. P. Soares, R. S. Moura-Neto, J. Rocha, S. P. Bydlowski and S. D. Pena (2006). "Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites." Hum Hered **62**(4): 190-195.
- Ren, Y., Z. Yin, K. Li, Y. Wan, X. Li, W. Wu, P. Guan and B. Zhou (2015). "TGFbeta-1 and TGFBR2 polymorphisms, cooking oil fume exposure and risk of lung adenocarcinoma in Chinese nonsmoking females: a case control study." BMC Med Genet **16**: 22.
- Sakaguchi, A. Y., M. K. Amarante, C. E. C. Oliveira, C. H. Hiroki, F. C. Trigo and M. A. E. Watanabe (2020). "Transforming Growth Factor Beta 1: Possible Involvement with Acute Lymphoblastic Leukemia Prognosis in Pediatric Patients." Clinical Oncology and Research **3**(9): 6-6.
- Seijo, E. R., H. Song, M. A. Lynch, R. Jennings, X. Qong, E. Lazaridis, C. Muro-Cacho, C. M. Weghorst and T. Muñoz-Antonia (2001). "Identification of genetic alterations in the TGFbeta type II receptor gene promoter." Mutat Res **483**(1-2): 19-26.
- Tang, B., M. Vu, T. Booker, S. J. Santner, F. R. Miller, M. R. Anver and L. M. Wakefield (2003). "TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression." J Clin Invest **112**(7): 1116-1124.
- Teixeira, A. L., M. Gomes, A. Nogueira, A. S. Azevedo, J. Assis, F. Dias, J. I. Santos, F. Lobo, A. Morais, J. Mauricio and R. Medeiros (2013). "Improvement of a predictive model of castration-resistant prostate cancer: functional genetic variants in TGFbeta1 signaling pathway modulation." PLoS One **8**(8): e72419.
- Vander Ark, A., J. Cao and X. Li (2018). "TGF-beta receptors: In and beyond TGF-beta signaling." Cell Signal **52**: 112-120.
- Vitiello, G. A. F., M. K. Amarante, B. K. Banin-Hirata, C. Z. Campos, K. B. de Oliveira, R. Losi-Guembarovski and M. A. E. Watanabe (2019). "Transforming growth factor beta receptor II (TGFBR2) promoter region polymorphism in Brazilian breast cancer patients: association with susceptibility, clinicopathological features, and interaction with TGFB1 haplotypes." Breast Cancer Res Treat **178**(1): 207-219.
- Wolfrain, L. A., T. M. Fernandez, M. Mamura, W. L. Fuller, R. Kumar, D. E. Cole, S. Byfield, A. Felici, K. C. Flanders, T. M. Walz, A. B. Roberts, P. D. Aplan, F. M. Balis and J. J. Letterio (2004). "Loss of Smad3 in acute T-cell lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **351**(6): 552-559.
- Wu, Y., M. Su, S. Zhang, Y. Cheng, X. Y. Liao, B. Y. Lin and Y. Z. Chen (2017). "Abnormal expression of TGF-beta type II receptor isoforms contributes to acute myeloid leukemia." Oncotarget **8**(6): 10037-10049.
- Wyatt, K. D. and R. J. Bram (2019). "Immunotherapy in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia." Hum Immunol **80**(6): 400-408.
- Xu, L., Z. Zeng, B. Chen, X. Wu, J. Yu, L. Xue, L. Tian, Y. Wang, M. Chen, J. J. Sung and P. Hu (2011). "Association between the TGFB1 -509C/T and TGFBR2 -875A/G polymorphisms and gastric cancer: a case-control study." Oncol Lett **2**(2): 371-377.
- Xu, Y. and B. Pasche (2007). "TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer." Hum Mol Genet **16 Spec No 1**: R14-20.
- Yang, L., Y. Pang and H. L. Moses (2010). "TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression." Trends Immunol **31**(6): 220-227.
- Zhang, M., L. L. Guo, Z. Cheng, R. Y. Liu, Y. Lu, Q. Qian, Z. Lei and H. T. Zhang (2011). "A functional polymorphism of TGFBR2 is associated with risk of breast cancer with ER(+), PR(+), ER(+)/PR(+) and HER2(-) expression in women." Oncol Lett **2**(4): 653-658.

5 CONCLUSÃO

- Artigo 1:
 - ❖ Não encontramos diferença estatística tanto nas variantes genéticas do gene *TGFBI* (rs1800468 ou G-800A, rs1800469 ou C-509T, rs1800470 ou C29T e rs1800471 ou G74C) entre pacientes com LLA e crianças livres de neoplasia (grupo controle);
 - ❖ O polimorfismo C29T apresentou um efeito protetor em heterozigose nos subtipos LLA geral e LLA-B; e o alelo T do polimorfismo C29T no modelo recessivo associou com risco à suscetibilidade nos subtipos LLA geral e LLA-B;
 - ❖ Numa análise de associação de risco de recidiva, não obtivemos associação das variantes genéticas do gene *TGFBI* entre os grupos BR e AR dos subtipos LLA geral e LLA-B;
 - ❖ O polimorfismo G74C estava correlacionado negativamente com recaída para os subtipos LLA geral e LLA-B, enquanto que o haplótipo GTTG no modelo dominante correlacionou-se negativamente com óbito apenas para LLA geral;
 - ❖ Os haplótipos GCTG no modelo recessivo e GCCG no modelo dominante correlacionaram-se positivamente com óbito e idade, respectivamente, para LLA geral;
 - ❖ O polimorfismo C-509T no modelo dominante e o haplótipo GTTG no mesmo modelo apresentaram uma correlação negativa com óbito para o subtipo LLA geral do grupo AR;
 - ❖ O haplótipo GCCG no modelo dominante observou uma correlação positiva com recaída para LLA geral do grupo BR, enquanto que, o haplótipo GCTG no modelo recessivo correlacionou-se positivamente com óbito para LLA geral do grupo AR;
 - ❖ O haplótipo GCCG no modelo dominante correlacionou-se positivamente com recaída para LLA-B do grupo BR.

- Artigo 2:
 - ❖ Não houve diferença estatística nas frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo da região promotora do gene *TGFBR2* (rs3087465 ou G-875A) entre pacientes com LLA e crianças livres de neoplasia (grupo controle);

- ❖ Ao realizar o estudo de associação do tipo caso-controle, o polimorfismo G-875A observou uma associação significativa de risco à suscetibilidade nos subtipos LLA geral e LLA-B;
- ❖ O polimorfismo G-875A mostrou uma associação significativa de risco de recidiva do grupo AR tanto na LLA geral quanto na LLA-B;
- ❖ No estudo de correlação, o polimorfismo G-875A apresentou uma correlação positiva com grupo de risco de recaída nos subtipos LLA geral e LLA-B;
- ❖ O G-875A correlacionou-se positivamente com recaída para LLA-T, indicando um pior prognóstico e podendo dificultar no decorrer da quimioterapia.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo investigou o envolvimento dos polimorfismos genéticos do *TGFB1* e suas estruturas haplotípicas e *TGFBR2* na LLA infantojuvenil da população brasileira, e os resultados apontaram resultados conflitantes em comparação com estudos prévios, tanto em outras doenças hematológicas quanto em tumores sólidos.

Portanto, nosso trabalho evidenciou pela primeira vez a relevância das estruturas haplotípicas do gene *TGFB1* e do polimorfismo da região promotora do gene *TGFBR2* sobre os parâmetros clínicos dos pacientes com LLA infantojuvenil na população brasileira. Apesar da necessidade investigações adicionais envolvendo esta doença, a citocina TGF β 1 juntamente com o seu receptor (TGF β RII) podem servir como marcadores de prognóstico e de suscetibilidade na população infantojuvenil Brasileira.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da
Universidade Estadual de Londrina



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/Uel:	189/2013
CAAE:	17123113.4.0000.5231
Data da Relatoria:	30/09/2013
Pesquisador(a):	Maria Angelica Ehara Watanabe
Unidade/Órgão:	Programa de PG em Patologia Experimental

Prezado(a) Senhor(a):


O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:


"Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer."

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/Uel, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 30 de setembro de 2013.


Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina



ANEXO B



Universidade Estadual de Londrina

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Informações sobre a pesquisa:**

Você está sendo convidada (o) a participar, como voluntária (o), da pesquisa intitulada “**Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer**”, que tem por objetivo analisar determinados tipos de moléculas que podem influenciar na imunidade da paciente. Você será esclarecida (o) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

Procedimentos do Estudo:

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de 5mL de sangue periférico para análise das células e moléculas do sistema imunológico.

Confidencialidade da Pesquisa

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

A amostra de sangue obtidos será utilizada para obtenção de DNA e RNA para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof^a. Dr^a Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia Cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel / Fax: (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490.

Pesquisador Responsável _____

RG:: _____

Consentimento livre esclarecido e informado:

Eu, _____, RG _____, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecido pelo (ABDUL-HAMID) pesquisador (es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Concordo em participar voluntariamente desse estudo permitindo a coleta do sangue do meu filho (a), sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste projeto.

Londrina, ____ de _____, 20 ____.

Assinatura do responsável (ou representante legal): _____



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informações sobre a pesquisa:

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “**Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer**”, que tem por objetivo analisar determinados tipos de moléculas que podem influenciar na imunidade do indivíduo. Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

*** Sua participação será no grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos saudáveis livres de qualquer neoplasia.

Procedimentos do Estudo:

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de aproximadamente 5mL de sangue periférico para análise das células e moléculas do sistema imunológico.

Confidencialidade da Pesquisa

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

As amostras contendo as células serão utilizadas para obtenção de DNA e RNA para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof^a. Dr^a Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia Cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, telefone (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone (43) 3371-2490.

Pesquisador Responsável: _____ **RG:** _____

Consentimento livre esclarecido e informado:

Eu, _____, RG _____, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecido pelo(s) pesquisador(es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Concordo em permitir a participação voluntária nesse estudo, permitindo a coleta de sangue periférico do meu **filho(a)** sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste projeto.

Londrina, ____ de _____, 20 ____.

Assinatura do doador (ou responsável): _____