



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULO DE TARSO DE MELLO AYRES PUTINATTI

**POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR DA
INTERLEUCINA 7 (rs6897932): ASSOCIAÇÃO COM
MARCADORES PROGNÓSTICOS NA LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA INFANTOJUVENIL**

Londrina

2023

PAULO DE TARSO DE MELLO AYRES PUTINATTI

**POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR DA
INTERLEUCINA-7 (rs6897932): ASSOCIAÇÃO COM
MARCADORES PROGNÓSTICOS NA LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA INFANTOJUVENIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Marla Karine Amarante

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira

Londrina

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Putinatti, Paulo de Tarso de Mello Ayres.

Polimorfismo genético do receptor da interleucina-7 (rs6897932): Associação com marcadores prognósticos na leucemia linfóide aguda infantojuvenil / Paulo de Tarso de Mello Ayres Putinatti. - Londrina, 2023.
64 f. : il.

Orientador: Marla Karine Amarante. Coorientador: Carlos Eduardo Coral de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Variantes genéticas - Tese. 2. IL-7r - Tese. 3. Citocinas - Tese. I. Amarante, Marla Karine. II. Oliveira, Carlos Eduardo Coral de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 61

PAULO DE TARSO DE MELLO AYRES PUTINATTI

**POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR DA
INTERLEUCINA-7 (rs6897932): ASSOCIAÇÃO COM
MARCADORES PROGNÓSTICOS NA LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA INFANTOJUVENIL**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marla K Amarante
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Nathalia de Sousa Pereira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcell Allyson B. Lozovoy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de Junho de 2023.

PUTINATTI, Paulo de Tarso de Mello Ayres. **Polimorfismo genético do receptor da interleucina-7 (rs6897932):** associação com marcadores prognósticos na leucemia linfóide aguda infantojuvenil. 64 páginas. Dissertação de Mestrado do Programa de Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma desordem maligna que se origina de um único precursor hematopoiético acometido para a linhagem de células B, T ou NK. Embora as variações genéticas nas leucemias ocorram em grande parte por mutações somáticas, as alterações na linhagem germinativa podem contribuir para a predisposição dessa neoplasia hematológica. A interleucina 7 (IL-7) é uma citocina pleiotrópica e atua como uma das principais citocinas homeostáticas com importante papel na manutenção de células linfóides. A função da IL-7 é mediada pelo receptor de interleucina 7 (IL-7r). A desregulação do eixo IL-7/IL-7r implica em alterações de sinalização celular que, na biologia do câncer e podem contribuir para a progressão tumoral. Descobertas de modificações do gene *IL7RA*, como o polimorfismo rs6897932, têm sido relacionadas com o aumento da susceptibilidade ao câncer. Na biologia do câncer, este polimorfismo tem sido relacionado com as alterações nos mecanismos das vias de transdução de sinal e consequente aumento da expressão dos níveis de IL-7 ou do IL-7r no processo leucêmico. Portanto, a proposta do presente trabalho foi investigar o polimorfismo genético *IL7RA* na patogênese da leucemia linfóide aguda (LLA) infanto-juvenil. O polimorfismo foi avaliado através da técnica de PCR-RFLP em 133 pacientes com LLA e comparado a amostras do projeto ALFA do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH). Foram realizadas análises de associação do tipo caso-controle usando o teste de qui-quadrado com intervalo de confiança (IC) de 95%. Também foram realizadas correlações entre genótipo e características clínicas, utilizando o coeficiente de Tau-b. Em nosso estudo foi verificado que os parâmetros clínicos em pacientes com LLA apresentaram correlações significativas. O polimorfismo no gene *IL7RA* demonstrou-se como um possível fator de proteção para pacientes com LLA, visto que a presença do alelo CT está relacionada com tendência a melhor prognóstico quando comparado entre pacientes de baixo e alto

risco ($p=0,07$). Houve correlação positiva entre a classificação da LLA e o risco de recaída (Tau= 0,242; $p=0,005$), e correlação negativa entre risco de recaída e desfecho de morte (Tau=-0,214; $p=0,014$) e entre recaída e desfecho de morte (Tau=-0,242; $p=0,004$). Mais estudos são necessários, mas pode-se inferir que o polimorfismo no gene *IL7RA* seja um provável marcador prognóstico e de risco para a LLA.

Palavras-chave: IL-7; IL-7ra, variantes genéticas; citocinas.

PUTINATTI, Paulo de Tarso de Mello Ayres. **Genetic polymorphism of interleukin-7 receptor (rs6897932):** association with susceptibility and prognostic markers in Brazilian childhood acute lymphoid leukemia. 64 pages. Master's Degree Dissertation of the Clinical and Laboratory Pathophysiology Program - State University of Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disorder originating from a single affected hematopoietic precursor for the B or T cell lineage. Although genetic variations in leukemias occur largely through somatic mutations, the germ-line alterations may contribute to this hematologic neoplasm's predisposition. Interleukin 7 (IL-7) is a pleiotropic cytokine that acts as one of the main homeostatic cytokines with an important role in maintaining lymphoid cells. IL-7 function is mediated by the interleukin 7 receptor (IL-7r). Its receptor consists of two glycosylated chains anchored in the membrane by a single helical transmembrane domain, alpha chain or CD127, and a common gamma chain (γ c) or CD132. Deregulation of the IL-7/IL-7r axis implies changes in cell signaling that, in cancer biology, contribute to tumor progression. The discovery of modifications in the *IL7RA* gene, such as the rs6897932 polymorphism, has been linked to increased susceptibility to cancer. In cancer biology, this polymorphism has been related to changes in the mechanisms of signal transduction pathways and consequent increases in the expression of IL-7 or IL-7r levels in the leukemic process. Therefore, the present work aimed to investigate the genetic polymorphism of the *IL7RA* gene in the pathogenesis of childhood acute ALL. PCR-RFLP evaluated polymorphism in DNA samples from 133 patients with ALL and compared them to the samples of the NIH ALFA project. Case-control association analyses were performed using the chi-square test with a 95% confidence interval (CI). Correlations between genotype and clinical characteristics were also performed using the Tau-b coefficient. In our study, it was verified that the clinical parameters in patients with ALL present significant correlations. The polymorphism in the *IL7RA* gene proved to be a possible protective factor for patients with ALL, since the presence of the CT allele is related to a tendency towards a better prognosis when compared between low-

and high-risk patients ($p= 0.07$). There was a positive correlation between the ALL classification and the risk of relapse (Tau= 0.242; $p=0.005$), and a negative correlation between the risk of relapse and the outcome of death (Tau=-0.214; $p=0.014$) and between relapse and the outcome of death (Tau=-0.242; $p=0.004$). More studies are needed, but it can be inferred that the polymorphism in the *IL7RA* gene is a probable prognostic and risk marker for ALL.

Keywords: IL-7; IL-7ra,; genetic variant; cytokines.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Via de sinalização do receptor da Interleucina 7 (IL-7r).....	19
Figura 2 – Genotipagem do polimorfismo no gene <i>IL7RA</i>	26

Lista de tabelas

Tabela 1 – Análise de risco da LLA segundo o GBTL.....	17
---	----

Lista de abreviaturas

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
AKT	Proteinoquinase B
AR	Alto risco
Bad	Proteína Apoptótica Bad
Bax	Proteína Apoptótica Bax
Bcl-2	Proteína Anti-apoptótica Bcl-2
Bcl-xL	Proteína Anti-apoptótica Bcl-xL
BR	Baixo risco
CD127 ou IL-7 α	Cluster de Diferenciação 127 ou Cadeia Alfa do Receptor de Interleucina 7
CD132 ou IL-7 γ	Cluster de Diferenciação 132 ou Cadeia Gama do Receptor de Interleucina 7
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNM 2	Dinamina 2
EUA	Estados Unidos da América
FOXP3	Fator de Transcrição Forkhead Box P3
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância
HCL	Hospital do Câncer de Londrina
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de Confiança
IL-7	Interleucina 7
IL-7r	Receptor da Interleucina 7

<i>IL7RA</i>	Gene Codificador da Cadeia Alfa do Receptor de Interleucina 7
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK 1	Janus Kinase 1
JAK 3	Janus Kinase 3
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoide Aguda de Linhagem B
LLA-T	Leucemia Linfoide Aguda de Linhagem T
Mcl-1	Proteína anti-apoptótica Mcl-1
mTOR	Alvo da Rifampicina em Mamíferos
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
pg	Picograma
PI3K	Fosfatil-Inosil-3-Quinase
SH2B3	Adaptador da proteína SH2B 3
SNC	Sistema Nervoso Central
SNPs	Polimorfismos de Base Única
STAT5	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 5
Tregs	Células T Regulatórias
TSLPR	Receptor de Linfopoetina de Estroma Tímico
μL	Microlitro

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	6
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1 Leucemia linfóide aguda (LLA).....	14
1.1.1 Manifestações clínicas	15
1.1.2 Diagnósticos das leucemias e classificação de risco segundo o GBTLI.....	16
1.1.3 A interleucina 7 e seu receptor	18
1.2 Polimorfismo genético	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 Seleção e caracterização das amostras.....	24
3.2 Diagnóstico e classificação da LLA.....	25
3.3 Extração de DNA genômico	25
3.4 Análise do polimorfismo genético <i>IL7ra</i>	25
3.5 Análise estatística.....	26
4 ARTIGO	28
5 CONCLUSÃO	45
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8 ANEXOS	56
8.1 Anexo A: Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina.....	57
8.2 Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	62

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O câncer permanece como um dos maiores desafios de saúde a ser pesquisado, compreendido e combatido atualmente. Para o ano de 2020, a ocorrência mundial foi de 19,3 milhões de novos casos de câncer e 10 milhões de mortes causadas pela doença (SUNG, H. et al., 2021). Já no Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), para o triênio de 2023-2025, aponta a ocorrência de cerca de 704 mil novos casos de câncer para cada ano (INCA, 2023). Para este mesmo triênio, estima-se 7.390 casos de câncer em crianças e adolescentes (INCA, 2023). Apesar da taxa de incidência para todos os tipos de cânceres combinados ser até duas vezes maior em países desenvolvidos, comparado a países menos desenvolvidos, a taxa de mortalidade é de apenas 8 a 15% maior em países mais ricos. Essa discrepância é devido à diferença do tipo de câncer incidente e a menor disponibilidade de tratamento adequado nas regiões mais carentes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

A patogênese do câncer ocorre em um complexo contexto de interações entre as células malignas, o estroma circundante e o sistema imune do organismo. Nessas interações, o envolvimento de células, citocinas, quimiocinas e todos os outros componentes, podem atuar tanto no combate quanto no favorecimento da iniciação, progressão, invasão e, finalmente, metástase das células transformadas. Adicionalmente, em todo este processo, ocorre a influência de fatores genéticos e fenotípicos de células que participam no início e no estabelecimento de células malignas (YAQUB; AANDAHL, 2009).

Os cânceres pediátricos são diferentes daqueles que ocorrem em adultos, sendo associados às alterações no DNA que podem ocorrer no início da vida e, até mesmo, antes do nascimento e não estão fortemente ligados a fatores de riscos ambientais ou ao estilo de vida. Seguindo este pressuposto, as leucemias são o tipo de câncer pediátrico mais frequentemente diagnosticado, seguido por tumor do sistema nervoso central, neuroblastoma e tumor de Wilms (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

As leucemias são um grupo heterogêneo de doenças hematológicas que diferem significativamente quanto às características morfológicas, imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares. Estas características específicas refletem no espectro de

alterações biológicas envolvidas na transformação maligna e/ou na variação dos níveis da hierarquia hematopoiética onde estes eventos ocorrem (GUENOVA; BALATZENKO, 2013).

1.1 Leucemia linfóide aguda (LLA)

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma desordem maligna que se origina de um único precursor hematopoiético acometido para a linhagem de células B, T ou *natural killer* (NK). A aquisição de uma série de alterações genéticas em genes envolvidos com a diferenciação de linfócitos interrompe os processos de maturação, levando ao bloqueio da diferenciação e à proliferação da célula transformada (GRAUX, 2011; PUI et al., 2011).

Nos Estados Unidos da América (EUA), para o ano de 2023, a Sociedade Americana do Câncer estimou cerca de 59.610 novos casos (14,1 casos/100.000 habitantes) de LLA e 23.710 óbitos (6 óbitos/100.000 habitantes) entre homens e mulheres de todas as idades (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023). Contudo, cerca de 60% dos casos ocorrem em indivíduos abaixo dos 20 anos de idade, sendo crianças a maioria acometida pela LLA (PUI et al., 2008; HUNGER et al., 2012). Os registros da incidência do câncer em 16 cidades de diferentes regiões brasileiras, demonstraram uma estimativa média de 24,8 casos por milhão de habitantes e pico de incidência aos 3 anos de idade, para ambos os sexos (DESOUZA et al., 2011).

As leucemias e os outros tipos de neoplasias compartilham uma mesma característica biológica: a clonalidade. As alterações moleculares requeridas para o desenvolvimento do câncer constituem um fenômeno raro, considerando o vasto número de células-alvo suscetíveis a esta condição e os mecanismos imunológicos próprios do organismo para evitar esta proliferação de células alteradas. Normalmente, uma única alteração genética raramente é suficiente para o desenvolvimento do tumor maligno (GALLEGOS-ARREOLA et al., 2013). Deste modo, o grande desafio tem sido identificar elementos de exposição, como infecções e inflamações, e variantes genéticas herdadas relevantes, de modo a decifrar como e quando estes fatores contribuem para a história natural da LLA (GREAVES; WIEMELS, 2003).

A fisiopatologia da LLA envolve mecanismos complexos, em que alterações

genéticas e fatores ambientais podem estar relacionados. Entretanto, pontos-chave na fisiopatologia da LLA é sua origem monoclonal, a proliferação celular descontrolada por estimulação dos receptores para fatores de crescimento, a ausência de resposta aos sinais inibitórios e a longevidade celular condicionada pela diminuição da apoptose (GALLEGOS- ARREOLA et al., 2013).

Existe heterogeneidade na apresentação das leucemias, principalmente em relação à morfologia celular, taxa de proliferação, alterações genéticas e, como resultado, resposta ao tratamento. Os mecanismos moleculares que compreendem a heterogeneidade da neoplasia maligna, são aspectos importantes no estudo da biologia do câncer (VISVADER, 2011). Embora as alterações genéticas nas leucemias ocorram em grande parte por mutações somáticas, as alterações na linhagem germinativa podem contribuir para a predisposição ao câncer espontâneo ou familiar (hereditário) (CROCE, 2008).

As anormalidades cromossômicas numéricas, bem como rearranjos estruturais, (translocações) ocorrem na LLA. Como por exemplo, podemos citar as anormalidades citogenéticas importantes em precursores de células B estão associadas com LLA de pior prognóstico, incluindo translocação (9;22), conhecido como cromossomo Filadélfia, com frequência diretamente proporcional com a idade do paciente (RIX et al., 2013); a translocação (4;11), relacionada ao gene da leucemia de linhagem mista (MLL), comum na infância e que também está associada a leucemia mieloide (ARMSTRONG et al., 2002; ARMSTRONG et al., 2003) e a hipodiploidia (NACHMAN et al., 2007).

1.1.1 Manifestações clínicas

A maioria das manifestações clínicas em pacientes leucêmicos deve-se ao acometimento da medula óssea. Como a medula óssea é o órgão responsável pela hematopoiese, na LLA, as células leucêmicas comprometem a proliferação e maturação celular normal. As consequências deste comprometimento desencadeiam sinais e sintomas como anemia (palidez, letargia), trombocitopenia (hematomas, petéquias, sangramento da mucosa) e leucopenia (febre, infecção). Existe uma tríade clássica de sinais e sintoma (febre, letargia e petéquias) que auxilia os médicos a suspeitarem de LLA, mas está presente em apenas 23% dos casos (BRIX;

ROSTHOJ, 2014; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

Além destes sinais, o envolvimento de locais extramedulares leva à hepatoesplenomegalia e linfadenopatia em 20% dos pacientes (ALVARNAS et al., 2015). O comprometimento do sistema nervoso central (SNC) é apresentado em 8 a 10% dos pacientes quando há detecção de blastos no líquido cefalorraquidiano (LCR) (PUI; HOWARD, 2008; SIRVENT et al., 2011; JABBOUR et al., 2015).

1.1.2 Diagnósticos das leucemias e classificação de risco segundo o GBTLI

O diagnóstico de um paciente com leucemia é realizado a partir da análise detalhada quanto ao número e morfologia das células do sangue periférico. Inicialmente, a análise quantitativa com a contagem absoluta e relativa dos eritrócitos, dos leucócitos e das plaquetas, revela informações importantes acerca das condições da hematopoese. Entretanto, a caracterização dos leucócitos em uma extensão do sangue periférico, o esfregaço sanguíneo, e o contexto clínico do paciente são indispensáveis no diagnóstico inicial adequado (MCPHERSON; PINCUS, 2011).

Os avanços recentes nas técnicas de diagnóstico das leucemias promoveram um incremento significativo na sobrevida dos pacientes, principalmente em relação à LLA e aos linfomas linfoblásticos, através da intensificação das modalidades terapêuticas existentes, o transplante de medula óssea e o escalonamento da dose das drogas quimioterápicas (SCHRAPPE, 2002; REDDY; PERKINS, 2004).

Dessa forma, além do leucograma, a análise da medula por imunofenotipagem tornou-se uma ferramenta essencial no diagnóstico e na classificação das leucemias, permitindo a distinção da origem e dos estágios de diferenciação das células leucêmicas, provendo um ponto de referência para o tratamento clínico (QIU et al., 2009). Ainda, as análises do perfil de expressão gênica têm permitido a identificação de novos subtipos leucêmicos, como a LLA de precursores de células T jovens (MULLIGHAN et al., 2007; COUSTAN-SMITH et al., 2009; MULLIGHAN et al., 2009).

No contexto clínico, a contagem elevada de leucócitos e a idade no diagnóstico são considerados indicadores confiáveis de prognóstico em pacientes leucêmicos tratados com quimioterapia convencional (PULLEN et al., 1999; PUI; EVANS, 2006).

No Brasil, o Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância(GBTLI),

atualizado em 2009, estratifica os pacientes em dois grandes grupos de risco, baixo risco (BR) e alto risco (AR), e leva em consideração os parâmetros hematológicos como a leucometria ao diagnóstico e no 7º dia de tratamento, linhagens celulares como a presença de blastos no sangue periférico e a resposta terapêutica, que pode ser verificada, por exemplo, pela contagem de células leucêmicas na medula (Tabela 1).

Esse protocolo também ressalta que pacientes classificados como BR podem ser reclassificados se durante o tratamento apresentarem características do AR (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

Tabela 1. Classificação de risco da LLA segundo o GBTLI.

	Baixo Risco(BR)	Alto Risco(AR)
Idade	≥1 ano a <9 anos	<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

SNC: Sistema Nervoso Central. **BR:** Baixo risco. **AR:** Alto risco.

Fonte: Adaptado de BRANDALISE et al., 2016; CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010.

1.1.3 A interleucina 7 e seu receptor

A interleucina 7 (IL-7) desempenha um papel crucial no fortalecimento do sistema imunológico após o transplante de medula óssea ou a realização de quimioterapia (Mackall; Fry; Gress, 2011). Isso a torna uma citocina de grande importância na manutenção das células linfoides, já que os agentes quimioterápicos induzem a linfopenia, afetando a contagem e o repertório desses tipos celulares (Mackall et al., 1997).

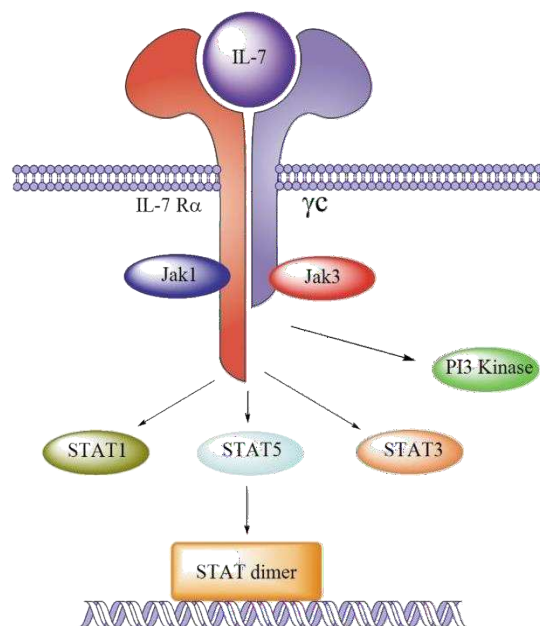
Embora IL-7/receptor de interleucina 7 (IL-7r) exerçam funções fisiológicas no contexto imunológico, esse complexo tem sido objeto de estudos em doenças inflamatórias (Gracey et al., 2016), doenças autoimunes (Lee et al., 2012) e até mesmo em certos tipos de câncer, como a LLA-B e LLA-T. Na LLA-T, mais de 70% dos indivíduos desse subtipo apresentam blastos positivos para IL-7r, com uma correlação específica com cadeia α (IL-7 α) (Karawajew et al., 2000; Maude et al., 2015).

A IL-7 foi inicialmente descrita como um fator de desenvolvimento das células B e, mais recentemente, tem sido reconhecida como uma das principais citocinas homeostáticas, desempenhando um papel essencial na sobrevivência de várias populações de células T maduras, incluindo as células T reguladoras (Tregs) (Carrette et al., 2012; Mazzucchelli et al., 2012). A IL-7 é considerada uma citocina pleiotrópica, ou seja, não se liga exclusivamente a um único receptor, (Ma; Koka; Burkett, 2006) que, em conjunto com o IL-7r, ativa as proteínas *Janus* quinase 1 e 3 (JAK1 e JAK3, respectivamente), resultando na fosforilação e transdução de sinal de moléculas como transdutor de sinal e ativador de transcrição 5 (STAT5) e fosfatil-inosil-3-quinase (PI3K) (Jiang et al., 2005).

A função da IL-7 é mediada pelo seu receptor de membrana, conhecido como IL-7r. A deleção deste receptor em seres humanos foi identificada como uma causa primária de imunodeficiência severa combinada (Bazdar; Kalinowska; Sieg, 2009). O receptor IL-7r (Figura 1) é composto por duas cadeias glicosiladas ancoradas na membrana, sendo uma a cadeia alfa (IL-7 α ou CD127) (Goodwin et al., 1989) e a outra a cadeia gama comum (γ c ou CD132) (Noguchi, 1993; Kondo et al., 1994). A cadeia α é compartilhada pelo receptor da linfopoiétina do estroma (TSLPR), enquanto a cadeia γ c é compartilhada pelos receptores da interleucinas 2, 4, 9, 15 e 21 (respectivamente, IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21, e se associa com as quinases JAK1 e JAK3, respectivamente (Pandey et al., 2000; Park et al., 2000).

A sinalização fisiológica da IL-7 depende da formação do complexo heterodimérico entre as subunidades CD127 e CD132, ativando as quinases JAK1 e JAK3 e resultando na fosforilação de resíduos de tirosina da subunidade IL-7 α . Isso permite a ligação de moléculas efetoras, como a PI3K e STAT5 (McElroy et al., 2012). A fosforilação de STAT5 pelas quinases JAKs promove sua translocação para o núcleo, onde induz a transcrição de genes relacionados à sobrevivência e proliferação celular (Figura 1) (Mazzucchelli; Durum, 2007; McElroy et al., 2012).

Figura 1: Via de sinalização do receptor da Interleucina 7 (IL-7r)



JAK: Janus kinase; **PI3K:** fosfatidil-inositol 3-quinase; **IL-7:** interleucina 7; **STAT:** transdutor de sinal e ativador de transcrição

Fonte: LIN, J., et al., 2017

A sinalização IL-7r através das vias PI3K/ proteinoquinase B (Akt) e JAK/STAT está envolvida na sobrevivência das células pró-B. No entanto, é conhecido que a deficiência de IL-7r ou JAK3 está associada a níveis elevados de proteína apoptótica Bax (Bax) (Lu; Chaudhury; Osmond, 1999; Wen et al., 2001).

Por outro lado, a disfunção do eixo IL-7/IL-7r tem sido implicada em doenças autoimunes, como diabetes e esclerose múltipla (Lee et al., 2012; Mazzucchelli; Riva; Durum, 2012; Monti; Bonifacio, 2014). Além disso, a sinalização mediada por IL-7/IL-7r também desempenha um papel potencial em neoplasias linfoides, como a leucemia

linfoblástica aguda (Sasson et al., 2010).

A IL-7 e o IL-7r também têm sido associados ao crescimento de células tumorais. No entanto, os mecanismos exatos pelos quais o eixo IL-7/IL-7r contribui para a progressão do câncer ainda não estão completamente esclarecidos, uma vez que têm sido pouco explorados na literatura. É importante ressaltar que efeitos indiretos no sistema imunológico, células no microambiente tumoral ou até mesmo nas próprias células podem abrir caminho para futuros estudos sobre essa molécula crucial.

A sinalização mediada pelo eixo IL-7/IL-7r pode desempenhar um papel pró-tumorigênico em cânceres sólidos, como mama, pulmão, melanoma e cólon (Al-Rawi; Mansel; Jiang, 2003), além de malignidades linfoides, como o linfoma de Hodgkin e a leucemia linfocítica crônica (Brown et al., 2003; Cattaruzza et al., 2009; Sasson et al., 2010).

Foi observado que mutações no gene do receptor de IL-7 (*IL7RA*) podem alterar a conformação do receptor, levando à sua homodimerização. Isso pode resultar na ativação de JAK1 associado à região citoplasmática de IL-7 α , tornando desnecessária a ligação de IL-7 para iniciar a sinalização (Zenatti et al., 2011).

Estudos em modelos de camundongos investigando o tratamento com IL-7 após quimioterapia ou transplante de medula óssea demonstraram um aumento e recuperação das células B e T, com um aumento na frequência de linfócitos virgens com função normal (Komschlies et al., 1994; Morrissey et al., 1991).

Mutações no *IL7RA* desencadeiam não apenas a ativação da via JAK/STAT5, mas também da via PI3K/Akt/alvo da rifampicina em mamíferos (mTOR) em células de pacientes com leucemia linfoblástica aguda de linhagem T (Shochat et al., 2011; Zenatti et al., 2011). A IL-7 e seu receptor desempenham um papel importante no desenvolvimento de células B, promovendo a sobrevivência celular ao regular a localização e interação entre moléculas antiapoptóticas, como Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1, e fatores pró-apoptóticos, como Bax e Bad.

Células de pacientes com LLA-T apresentam uma expressão aumentada de IL-7 α , contribuindo para a proliferação das células leucêmicas induzida pela IL-7 (Barata et al., 2001; Silva et al., 2011). Esse aumento na proliferação pode ser resultado de mutações somáticas em *IL7RA*. Além disso, Shochat et al. (2011) observaram que mutações em *IL7RA* levam à ativação constitutiva do receptor, promovendo transformação celular *in vitro* e formação tumoral *in vivo*. A maioria das mutações

encontradas em leucemias é adquirida e ocorre em uma célula progenitora linfoide, enquanto apenas 1 a 5% das leucemias apresentam mutações genéticas hereditárias (Seewald, 2012).

Estudos experimentais também sugeriram que a IL-7 contribui para o desenvolvimento de leucemia *in vivo* (Rich et al., 1993; Abraham et al., 2005). Além disso, foram identificados alguns mecanismos que levam à ativação da transcrição do gene *IL7RA*, incluindo modificações na transdução de sinal do eixo IL-7/IL-7r, como os oncogenes *NOTCH1* (González-García et al., 2009), *ZEB2* (Goossens et al., 2015) e mutações na proteína chamada Dinamina 2 (DNM2), que interfere na via JAK-STAT desse complexo (Sharma et al., 2019).

A elevada expressão do gene *IL7RA* tem sido correlacionada com comprometimento do sistema nervoso central e recorrência em pacientes pediátricos com LLA-B (ALSADEQ et al., 2018). A relação entre IL-7 e LLA-B também está associada a proteínas ou fatores de transcrição que interferem na via de sinalização JAK-STAT, como o supressor tumoral Ikaros e gene adaptador da proteína SH2B 3 (*SH2B3*), contribuindo para a leucemogênese das células B (NAKAYAMA et al., 2009; HEIZMANN et al., 2013; CHENG et al., 2016).

1.2 Polimorfismo genético

Dentro de uma espécie, os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (*loci*) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se a variação é encontrada em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

Algumas variações ocorrem em sequências codificadoras, o que leva à produção de proteínas defeituosas. Deste modo, em alguns casos o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer (LODISH et al., 2002).

As variantes de genes relacionados com o sistema imunológico apresentam variabilidades que conferem diferenças nas respostas imunológicas inata e adaptativa. Nos últimos anos, muitos polimorfismos têm sido reportados indicando importância nas consequências funcionais para a estrutura e a expressão de moléculas do sistema imune (KUBISTOVA et al. 2009).

Estudos envolvidos na busca de marcadores relacionados com a

susceptibilidade à doença ou na resposta à quimioterapia vêm sendo cada vez mais evidentes no contexto da LLA (LU et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Por exemplo, a investigação de polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) em genes candidatos apontam que o risco de leucemias, incluindo a LLA, pode ser atribuído a SNPs que afetam o metabolismo de xenobióticos, reparo de DNA e, até mesmo, o funcionamento normal do sistema imunológico (SCHIFFMAN, 2015).

Um polimorfismo no gene *IL7RA*, denominado rs6897932, é conhecido por uma substituição do alelo C pelo alelo T no códon 244 (éxon 6), resultando em uma mudança de treonina para isoleucina na cadeia de aminoácidos. Essa alteração afeta o equilíbrio entre IL-7 α ligado à membrana e IL-7 α solúvel, levando ao aumento da síntese de IL-7 α ligado à membrana no alelo T (GREGORY et al., 2007). Essa variação na forma solúvel e ligada à membrana do receptor afeta a intensidade do sinal de IL-7 e, conseqüentemente, sua meia-vida (LUNDSTROM et al., 2013).

Esse polimorfismo tem sido associado a um fator de risco em várias doenças que envolvem autoimunidade ou uma resposta imunológica e inflamatória excessiva, como lúpus eritematoso (WANG et al., 2014), diabetes mellitus tipo 1 (SANTIAGO et al., 2008) e artrite reumatoide (O'DOHERTY et al., 2009).

SHAMIN et al. (2013) conduziram um estudo para investigar a associação entre o prognóstico de pacientes com malignidades hematológicas submetidos a transplante de células hematopoiéticas. Os resultados deste estudo revelaram que os pacientes que receberam células de doadores portadores do alelo polimórfico T (rs6897932) apresentaram um maior risco de recidiva. Esses achados sugerem um possível papel deste polimorfismo na regulação das células hematopoiéticas.

É importante ressaltar que as alterações nos mecanismos de transdução de sinal, que levam ao aumento da expressão de IL-7 ou do IL-7r no contexto leucêmico ou em outras doenças, podem ser desencadeadas por alterações moleculares ou por fatores regulatórios relacionados a essa citocina. Portanto, estudos que investiguem as alterações genéticas podem fornecer insights importantes para a compreensão das modificações nas vias de transdução de sinal e ajudar a elucidar a patogênese da LLA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

1. Investigar o polimorfismo rs6897932 do gene *IL7RA* na progressão da LLA infantojuvenil.

2.2 Objetivos específicos

1. Analisar a o polimorfismo 6897932 do gene *IL7RA* em pacientes com LLA de diferentes subtipos e em crianças livres de neoplasia, em um estudo de associação do tipo caso-controle.
2. Avaliar a associação genotípica entre os grupos de LLA geral, LLA-B e LLA-T.
3. Avaliar a correlação dos genótipos da variante rs6897932 com dados clínico-patológicos.

3 METODOLOGIA

3.1 Seleção e caracterização das amostras

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). Somente foram utilizadas amostras de pacientes autorizados por seus responsáveis, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O grupo caso ou LLA geral foi composto por 133 pacientes atendidos e diagnosticados no Hospital do Câncer de Londrina (HCL). Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos por meio da consulta autorizada de seus respectivos prontuários no banco de dados do HCL.

O grupo controle foi proveniente de um banco público de dados genéticos, denominado ALFA (do inglês *Allele Frequency Aggregator*), desenvolvido e mantido pela Biblioteca Nacional de Medicina (do inglês *National Library of Medicine*), um órgão associado ao Centro Nacional de Informações em Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information*) dos Estados Unidos da América. Através deste banco, as frequências alélicas da variante rs6897932 foram obtidas de uma amostra da população Latino-Americana 2 (Accession: SAMN10492700; ID: 10492700), composta por 9404 indivíduos latino-americanos de ascendência predominantemente europeia e nativo americana, sem indicação de faixa etária ou sexo.

O ALFA agrega informações geradas a partir de análise de variantes genéticas em estudos irrestritos e aprovados de genoma amplo no banco de acesso público dbSNP, promovendo a classificação de variações genéticas de nucleotídeos, mantendo informações da sequência na região genética da variante, as condições utilizadas para desenvolver o experimento, as descrições das populações que contém a variante, e as informações da frequência por população e por genótipos individuais. (L. Phan 2020).

Os genótipos do grupo controle foram determinados por sequenciamento de nova geração. O ALFA é responsável pela curadoria e garante acesso aberto aos dados para facilitar descobertas e interpretações de variantes comuns e raras com

impactos biológicos ou causadores de doenças (L. Phan 2020).

Como o banco de dados apresenta a frequência alélica, a frequência do genótipo CC foi determinada pelo quadrado da frequência do alelo C. A frequência do genótipo CT foi determinada pela multiplicação de 2 vezes a frequência do alelo C vezes a frequência do alelo T. E a frequência do genótipo TT foi determinada pelo quadrado da frequência do alelo T.

3.2 Diagnóstico e classificação da LLA

O diagnóstico da LLA foi realizado por meio de exames hematológicos, mielograma, imunofenotipagem e análise citogenética realizada por bioquímicos, hematologistas, oncopediatras e patologistas do HCL. Após a confirmação, foram classificados pelo hematologista responsável, de acordo com os critérios do (GBTLI) - LLA/2009.

3.3 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir dos leucócitos do sangue periférico através do kit *Biopur Mini Spin Plus* (Biometrix diagnóstica, Curitiba, PR, Brasil)), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop ND-2000c (*Thermo Scientific*, EUA) a 260nm.

3.4 Análise do polimorfismo genético *IL7ra*

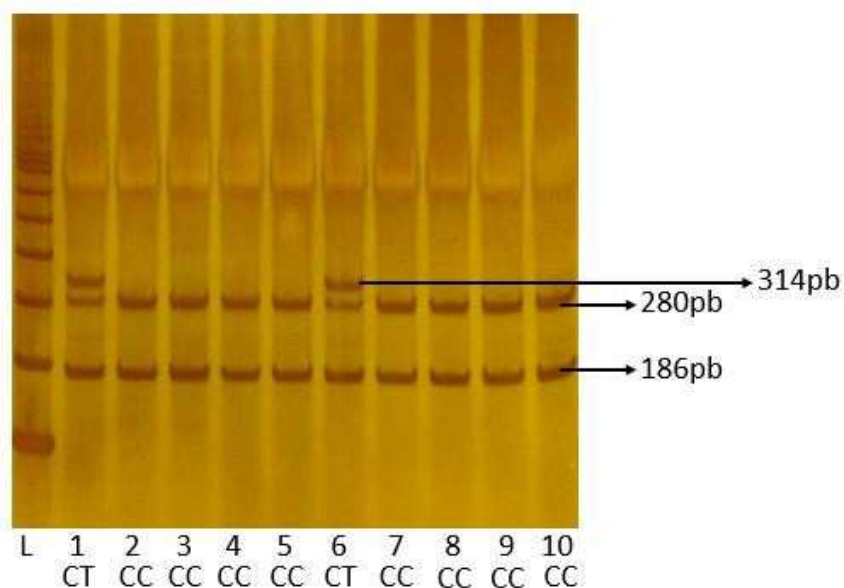
Para avaliação do polimorfismo no gene *IL7RA*, foi utilizado aproximadamente 100ng de DNA para a reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP), utilizando *primers* (*forward*: 5' CAC CCA AGT CAA TGC CTT TT 3' e *reverse*: 5' TTA CTT TGG GGA CAG CGT TT 3'), como descrito por ČIERNY et al. (2015).

As reações de amplificação foram realizadas com cerca de 0,1mM de dNTP,

0,2 μ M de cada iniciador, 1,5mM de MgCl₂, 1X *Buffer* PCR, 1,25U de Taq polimerase para um volume final de reação de 25 μ L. De modo geral, uma etapa de desnaturação foi constituída por 10 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final de 5 minutos a 72°C. Todos os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) e corados com nitrato de prata (AgNO₃).

Em seguida, o produto de PCR (500 pb) foi submetido a uma restrição enzimática com a enzima *Bccl* (*New England BioLabs*, Ipswich, MA, EUA), conforme instruções do fabricante. Os genótipos deste polimorfismo foram caracterizados como CC (280pb, 186pb, 34pb, homozigoto selvagem), CT (314pb, 280pb, 186pb, 34pb, heterozigoto) e TT (314pb, 186pb, variante) (Figura 2).

Figura 2: Genotipagem do polimorfismo no gene *IL7RA*



L: marcador. **1-10:** pacientes da amostra **pb:** pares de bases. **CT:** genótipo heterozigoto CT. **CC:** genótipo homozigoto CC

Fonte: Próprio autor

3.5 Análise estatística

As frequências genotípicas dos pacientes com LLA foram comparadas no estudo de associação com resultados de frequências do banco de dados público

dbSNP através do Projeto ALFA, da Biblioteca Nacional de Medicina, do Centro Nacional de Informações em Biotecnologia, do inglês National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Os genótipos foram testados para possíveis desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) utilizando um software online (Bińkowski e Miks, 2018). O teste de qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para verificar a distribuição dos genótipos.

As análises de associação do tipo caso-controle foram realizadas usando o teste de qui-quadrado com intervalo de confiança (IC) de 95%. Do polimorfismo estudado, foram testados modelos genotípicos dominante (CT e TT vs CC) e recessivo (TT vs CC e CT).

Teste de correlação Tau-b de Kendall foi empregado nas análises para evidenciar possíveis interações entre variáveis clínicas e os genótipos da variante rs6897932 do *IL7RA*.

Para as análises estatísticas foram utilizados os softwares SPSS® Statistics 20 (IBM®, Armonk, Nova York, EUA) e GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os testes foram bicaudais e o nível de significância adotado foi de 5%.

4 ARTIGO

***IL7RA* rs6897932 variant implications and recurrence/relapse correlations in childhood acute lymphoid leukemia: a case-control association study**

Abstract

Background: Acute lymphoid leukemia is a malignant hematological neoplasia that affects B or T lymphocytes. As an important cause of cancer in children, considerable efforts have been made to establish a relationship between genetic variances and ALL susceptibility. In this, genes associated with interleukin 7 (IL7) and its cognate receptor IL7R are under inquiry since this homeostatic cytokine plays a mainstream role in promoting B cell development and T cell proliferation. Thus, it is reasonable that genetic variants affecting *IL7* or *IL7R* genes could have critical implications. Methods: A case-control study of the rs6897932 variant of the *IL7RA* gene was conducted, including 133 patients with ALL from south Brazil. DNA was extracted and purified from peripheral blood leukocytes, then submitted to PCR RFLP reactions to evaluate genotypes. Genotypic distributions were compared to control samples from the NIH ALFA project. In addition, correlations between clinical parameters and genotypes of rs6897932 were evaluated. Results: A hundred thirteen patients presented B-cell leukemia, and 20 were diagnosed with T-cell disease. A high risk of recurrence initial classification was observed in 70,8% of B-ALL, with 66,4% of survivors. Genotype distributions were consistent with Hardy-Weinberd's law ($p > 0.05$), and frequencies did not differ from patients with ALL and controls ($p > 0.05$). The *IL7RA* rs6897932 was not associated with recurrence risk in these patients, although a tendency has been seen in B-cell ALL considering the heterozygous genotype CT ($p = 0.07$). Patients with T-ALL were positively correlated with an increased risk of relapse. Noteworthy, the absence of relapse was correlated with an increased death rate among patients. Conclusion: Gene variants implicated in ALL susceptibility are commonly evaluated and may vary depending on the genetic background. We showed that genotypic frequencies of rs6897932 from the *IL7RA* gene were roughly equally split between patients with ALL and controls. Future research is needed to better understand the *IL7RA* functional genetic variants in ALL susceptibility and knowledge of other related pathways that

effectively alter disease prognosis.

Keywords: IL-7r, polymorphism

Introduction

Acute lymphoblastic leukemia is a malignant neoplasia of lymphoid cells, blocked at an early stage of differentiation, that can invade the bone marrow, blood, and extramedullary sites (1). The male-to-female ratio is about 2:1, and this disease is more frequently reported in children, commonly aged 1–4 years (2).

Altered lymphocyte proliferation may occur by several loss or gain pathways involved in cell maintenance and/or differentiation steps (3). In this regard, growth factor and cytokine-mediated routes are constantly affected in leukemic cells, considering both ligand and receptor modifications (4-9).

Interleukin 7 (IL7) and its cognate receptor IL7R play essential roles in the homeostatic functioning of lymphopoiesis, regulating thymic T cell proliferation (10, 11) and B cell development in bone marrow environment (12). Once they are implicated in the immune status of various cells, recently, it was evidenced a bidirectional function in neoplasia (13). Although the expression of IL7R showed a positive prognostic effect in lung adenocarcinoma (14), in T-ALL, it can promote leukemic transformation, cell survival, and proliferation (15, 16).

IL7R is a heterodimeric receptor, consisting of the IL-7R α chain (CD127), codified by *IL7RA* gene, and a common γ chain (CD132, IL-2R γ) (13). While this one is shared with several other cytokines, the α chain can occur both membrane-bound in immune cells (IL7R α) or be secreted as a soluble protein (sIL7R α), displaying different biological functions (17, 18).

A functional genetic variant of *IL7RA*, named rs6897932, causes an amino acid change at position 244 (isoleucine to threonine), influencing the balance of the two isoforms (membrane-bound and soluble) of the receptor and fostering underlying IL7R malfunctions (19-21). Thus, a case-control study was developed to determine the implications of rs6897932 *IL7RA* in ALL susceptibility and examine possible functional consequences in clinical profile.

Methods

Study subjects

This study was approved by Human Ethics Committee from the State University of Londrina and by the institutional review board of Londrina Cancer Hospital (LCH). A

total of 133 cases with ALL were included from LCH. The demographic characteristics of all participants are displayed in Table 1. ALL progression, including objective progression and relapse from complete remission, and death due to any cause were determined for 10 years follow-up. Written informed consent was obtained for each participant from their parents or directly from those up to 18 years old.

Polymorphism genotyping

For genotyping, the genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by the Biopur Mini Spin Plus (Biometrix Diagnóstica, Curitiba, PR, Brasil). The DNA samples were quantified using Nanodrop Spectrophotometer and diluted to 100 ng/ μ L.

Genotyping for the SNP was carried out using forward (5' CAC CCA AGT CAA TGC CTT TT 3') and reverse (5' TTA CTT TGG GGA CAG CGT TT 3') primers, previously described by Čierny, Hányšová (22). Amplification reactions were developed using 0.2mM primers, 0.1mM dNTP, 1.2mM MgCl₂, 1X PCR buffer, and 1U Taq DNA polymerase, in 25uL final volume. Thermal cycling conditions were adjusted to 95°C for 10 minutes, 35 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1min, and 72°C for 1min, with a 5min final extension at 72°C. PCR products were analyzed using 10% acrylamide gel electrophoresis and silver nitrate coloring (AgNO₃). Products were then submitted to enzyme restriction with *Bcc* I (New England BioLabs, Ipswich, MA, EUA). Genotypes were identified as wild-type CC when 280, 186, and 314 base pair fragments, CT when 314, 280, 186, and 314bp, and TT when 314 and 186bp were detected. Twenty percent of the samples were chosen randomly and re-genotyped with 100% concordance.

The control group was obtained from a public genetic database called ALFA (Allele Frequency Aggregator), developed, and maintained by the National Library of Medicine, associated with the National Center for Biotechnology Information. ALFA is responsible for curating and ensuring open access to data to facilitate discovering and interpreting common and rare variants with biological or disease-causing impacts (23).

The allele frequencies of the rs6897932 variant were obtained from a sample of the Latin American population 2 (Accession: SAMN10492700; ID: 10492700), composed of 9,404 Latin American individuals of predominantly European and Native American descent, without indication of age group or sex. Control group genotypes were determined by next-generation sequencing (GWAS), obtained from multiple

validated sources and unrestricted access to genetic information.

The frequency of genotype CC was determined by squaring the allele frequency C. The frequency of genotype CT was determined by multiplying 2 times the frequency of C times the frequency of T. The frequency of TT was determined by squaring T.

Statistical analyses

Qualitative data were represented as frequency and percentage, and quantitative data as mean \pm standard deviation. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were evaluated by the goodness-of-fit χ^2 test using an online calculator (24). χ^2 test was used to assess the differences in demographic characteristics and the frequency distributions of genotypes between patients with ALL and controls.

Differences in genotype and allele distributions between groups were determined by Chi-square (χ^2) and Fisher's exact tests. Binary logistic regression was used to obtain odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) in case-control association studies. Dominant and recessive genetic models were tested for possible associations with ALL susceptibility and prognosis.

Kendall's Tau correlation tests were applied to test the correlation between genotypes and clinical features. The Tau-b coefficient was adopted for contingency analyzes of categorical or binary variables (2x2, 3x3 square matrices). Statistical analyzes were performed using SPSS® Statistics 20 (IBM®, Armonk, New York, USA) and GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) software. The tests were two-tailed, and the significance level adopted was 5%.

Results

In this case-control study, 133 patients with ALL were included as the case group, with 113 patients diagnosed with B-derived ALL (B-ALL) and 20 patients with T-derived ALL (T-ALL). Clinical parameters of general ALL and classified patients are described in Table 1.

Table 1: Distribution of clinical parameters of ALL patients.

Parameters	General ALL	B-ALL	T-ALL
Age			
Median (IQ)	6.0 (9.0)	6.0 (9.0)	10.0 (6.0)
Mean (SD)	7.8 (5.4)	7.5 (5.4)	9.8 (5.1)
≥ 1 and < 9 [n (%)]	80 (60.2)	71 (62.8)	9 (45.0)
< 1 and ≥ 9 [n (%)]	53 (39.8)	42 (37.2)	11 (55.0)
Sex			
Female [n (%)]	66 (49.6)	56 (49.6)	10 (50.0)
Male [n (%)]	67 (50.4)	57 (50.4)	10 (50.0)
Risk of relapse initial classification			
Low risk (LR) [n (%)]	33 (24.8)	33 (29.2)	0 (0.0)
High risk (HR) [n (%)]	100 (75.2)	80 (70.8)	20 (100.0)
Relapse			
Positive [n (%)]	31 (23.3)	27 (23.9)	4 (20.0)
Negative [n (%)]	102 (76.7)	86 (76.1)	16 (80.0)
Outcome			
Death [n (%)]	48 (36.1)	38 (33.6)	10 (50.0)
Survival [n (%)]	85 (63.9)	75 (66.4)	10 (50.0)

IQ: interquartil interval, SD: standard deviation.

Genotypic distribution is consistent with Hardy-Weinberg's law at a significance level of 0.05 (control $\chi^2= 0.0003$, $p=0.99$; ALL $\chi^2= 0.33$, $p=0.85$), demonstrating that the observed genotype frequencies match the expected frequencies and that no outside forces are affecting the allele frequencies in this sample.

Table 2 shows genotypic and allelic frequencies of *IL7RA* variants between case and control groups. For both control and ALL groups, CC genotype frequency was superior to CT and TT, respectively.

Table 2: Genotypic and allelic frequencies of rs6897932 of *IL7RA* gene variant.

	Control ^a [n (%)]	ALL [n(%)]		
		General ALL	B-ALL	T-ALL
Genotypes				
CC	6091 (64.77)	81 (60.90)	69 (61.06)	12 (60.0)
CT	2955 (31.42)	47 (35.34)	39 (34.51)	8 (40.0)
TT	358 (3.81)	5 (3.76)	5 (4.42)	0 (0.0)
Alleles				
C	15137 (80.48)	209 (78.57)	177 (78.32)	32 (80.0)
T	3671 (19.52)	57 (21.43)	49 (21.68)	8 (20.0)

^aData obtained from ALFA database relative to Latin American 2 sample.

Table 3 shows a case-control association study to evaluate general ALL and B-ALL groups with *IL7RA* variant. This study did not observe a significant difference in genotype distribution comparing controls and ALL groups ($p>0.05$).

Table 3: Case-control association study comparing general ALL and B-ALL groups with controls.

	Model	OR	95% CI	p^a
General ALL	CT	1.20	0.83-1.72	0.34
	TT	1.05	0.45-2.51	0.81
	Dominant	1.18	0.83-1.66	0.36
	Recessive	0.99	0.43-2.30	0.99
B-ALL	CT	1.66	0.79-1.72	0.47
	TT	1.23	0.53-2.99	0.61
	Dominant	1.17	0.80-1.72	0.43
	Recessive	1.17	0.51-2.75	0.62

OR: Odds Ratio, CI: Confidence interval. ^a Fisher's exact test.

Association analysis was conducted to evidence a possible role of rs6897932

IL7RA genotypes in risk of relapse classification (Table 4). There was a tendency for a protective effect of CT genotype in the B-ALL group ($p=0.07$). There were no significant associations for dominant and recessive genetic models in risk of relapse, in general ALL, nor B-ALL groups ($p>0.05$).

Table 4: Association analysis between rs6897932 *IL7RA* variant and risk of relapse initial classification

		Model	OR	95% CI	p^a
General ALL	HR x LR	CT	0.48	0.22-1.05	0.09
		TT	0.98	0.14-12.73	0.99
		Dominant	0.51	0.24-1.17	0.10
		Recessive	1.33	0.21-16.78	0.99
B-ALL	HR x LR	CT	0.43	0.18-1.01	0.07 [£]
		TT	1.21	0.17-15.61	0.99
		Dominant	0.48	0.21-1.07	0.09
		Recessive	1.68	0.26-21.19	0.99

OR: Odds Ratio, CI: confidence interval, LR: low risk, HR: high risk. [£]Tendency of association. ^aFisher's exact test.

To evaluate possible correlations between clinical variables and genotypes of rs6897932, data were analyzed using the Kendall Tau-B correlation test. A weak and positive correlation was found between ALL classification and risk of relapse classification (Tau= 0.242; $p=0.005$). A weak and negative correlation was found between the risk of relapse and death outcome (Tau= -0.214; $p=0.014$) and the presence of relapse and death outcome (Tau= -0.252; $p= 0.004$). These results indicate that risk of relapse was higher in patients with T-ALL, death outcome was lower in patients with higher relapse risk, and relapse presence was lower in patients with death outcome.

Correlation analysis between other variants did not reveal significant results, even in the evaluations of genotypes considering the dominant genetic model (CT+TT vs CC) ($p>0.05$).

Discussion

In ALL prognosis can be influenced by clinical variables, which play a significant role in determining treatment outcomes and long-term survival rates. In fact, age at diagnosis, white blood cell count, cytogenetic abnormalities, response to initial treatment, presence of minimal residual disease, and specific genetic mutations will enable assessing the risk level and tailor appropriate treatment strategies for patients with ALL (25-27).

Noteworthy, clinical parameters in patients with ALL showed significant correlations in the present study. For instance, increased death rate was correlated with the absence of relapse in patients with leukemia. It is important to note that mortality rates are influenced by risk level, genetic mutations and ethnic/region disparities (28-32).

A rationale may indicate that the patient did not respond well to treatment, or it was not aggressive enough to eliminate the leukemic cells (33-35). In some cases, the absence of relapse may be a sign that the ALL has become resistant to treatment and is no longer responding to it (36). As a result, the patient may be at a higher risk of death from the disease or its complications.

In addition, for children with ALL, the non-relapse related mortality (NRM) is critical to be determined, once the difficulty in distinguishing deaths due to treatment and disease prior to achievement or remission (37). Also, clinical parameters at diagnosis and presence of comorbidities may impact death risk in some patients (38). In our study we were not able to identify differences in death rate between treatment phases and clinical parameters at presentation. This may represent a limitation to be overcome in future prospective studies.

Furthermore, the higher risk of relapse in T-ALL can be attributed to the genetic complexity of the disease, the aggressive and resistant nature of the T-derived leukemic cells, and the potential immune escape that can allow these cells to persist (39-42). In this particular, prognosis factors for higher relapse in T-ALL are related to age, central nervous system (CNS) involvement, initial white blood cell count higher than 100.000 leukocytes, increased cytogenetic abnormalities, and CD1a- negativity, among others (43-45). In fact, it is known that most T-ALL disease recurrences will occur within 2 years of diagnosis (46, 47).

On the other hand, it is not typical for death outcomes to be lower in ALL patients with higher relapse risk. A higher risk of relapse is generally associated with a poorer prognosis and a higher risk of death (48, 49). A relapse can occur when the initial

treatment fails to eliminate all the leukemic cells or when secondary ALL develops resistance to the initial treatment (50).

There may be some rare or exceptional cases where the leukemia relapse does not lead to a worse outcome, such as if the relapse is detected early and treated aggressively (39-41). However, as an atypical scenario, the general expectation is that a higher risk of relapse is associated with a poorer prognosis and a higher risk of death (51, 52). Relapsed ALL remains a significant contributor to cancer-related mortality across all age groups (53-55).

Targeting the functions of *IL7RA* is proposed to represent an important therapeutic target for managing hematological neoplasias, such as ALL (56-58). This study investigated the association of *IL7RA* gene polymorphism with the susceptibility to ALL among a Brazilian sample. These results indicate that rs6897932 of *IL7RA* gene do not seem to increase the risk of ALL. We also found that no increase in the risk of ALL was observed under any model of inheritance, and there were no statistically significant associations between any genotypes and clinical characteristics.

In refractory patients with ALL, Rozovski, Li (59) did not find any mutation in exon 6 of *IL7RA* in an adult sample. Similarly, the functional polymorphism rs6398972 studied here is a variant located in the alternatively spliced exon 6 of the *IL7RA* gene, which were associated with the expression level of the soluble or membrane-bound receptor forms (22).

Conversely, in an attempt to determine a prognostic significance of *IL7RA* gene variants, Shamim, Spellman (60) conducted a study on north american recipient/donor pairs and unrelated matched donors of hematopoietic stem cells and found a significant association between rs6897932 variant and frequency of relapse in univariate and multivariate analysis. However, this study included different hematological malignancies, and ALL represented approximately 13% of cases. Also, they did not estimate the risk of each type of hematological malignancy separately.

Here, genotypes of rs6897932 *IL7RA* variant were not associated with prognostic nor susceptibility. The inconsistency between our study and the mentioned study may be due to the genetic heterogeneity of hematological malignancies, resulting in different leukemogenesis mechanisms. In addition, differences in genotype frequencies can be expected according to the genetic background of the studied population. In our study, samples were obtained from a southern Brazilian population of Londrina Cancer Hospital.

Considering ethnic disparities, an association study was performed considering other control populations, with different ancestries as African, American, Asian and European (Supplementary table 1). In this, these results evidenced that genetic background may influence results of association studies.

The results of this previous study concerning the association of *IL7RA* polymorphism and other types of leukemia among different populations were inconsistent with the result of the current study. It was already described that some *IL7RA* mutations lead to IL7R gain of function, leading to T-ALL (Zenatti, 2011). In murine models, *il7ra* mutants were associated with early T cell precursors of ALL (Treanor, 2014). More recently, it was described that mutation in *IL7RA* can initiate ALL-B (Almeida, 2021).

Some limitations need to be considered when interpreting our results. One of them is the study power – although a sample size of 80 patients with ALL would be needed to have statistical significance with over 80% power, it is difficult to set up the influence of the genetic variant, mainly considering the rare homozygous genotype.

A second limitation is that we only included one gene variant of *IL7RA* in these case control association study. It is possible that other *IL7RA* functional variants may impact gene expression, as well as haplotype structures that may impair *IL7RA* structure and function.

A major issue is the lack of individual patient data. There have been missing data related to clinical parameters during ALL diagnosis of many patients. This can be attributed of renovations that were carried out in the hospital, and the medical records management process was modified during patient follow-up, resulting in the loss of some initial clinical information as immunophenotyping, white blood cell count at diagnosis, and others. Consequently, we were only able to examine some risk factors at a patient level.

Overall, these results indicate that *IL7RA* rs6897932 did not alter the susceptibility or prognosis of ALL in this population. Although significant correlations evidenced that, a higher risk of relapse is associated with a poorer prognosis in T-ALL, but a lower risk of death in overall patients. However, this finding will need to be confirmed in a large cohort of patients with ALL.

References

1. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. 2020;395(10230):1146-62.
2. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2023;73(1):17-48.
3. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.
4. Bitar M, Boldt A, Freitag MT, Gruhn B, Köhl U, Sack U. Evaluating STAT5 Phosphorylation as a Mean to Assess T Cell Proliferation. *Front Immunol*. 2019;10:722.
5. Camacho V, Kuznetsova V, Welner RS. Inflammatory Cytokines Shape an Altered Immune Response During Myeloid Malignancies. *Frontiers in Immunology*. 2021;12.
6. Camacho V, McClearn V, Patel S, Welner RS. Regulation of normal and leukemic stem cells through cytokine signaling and the microenvironment. *International journal of hematology*. 2017;105(5):566-77.
7. Smith KA. Commentary: The Interleukin-2 T Cell System: A New Cell Growth Model. *Front Immunol*. 2015;6:414.
8. Smith KA, Griffin JD. Following the cytokine signaling pathway to leukemogenesis: a chronology. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(11):3564-73.
9. Van Etten RA. Aberrant cytokine signaling in leukemia. *Oncogene*. 2007;26(47):6738-49.
10. Chen D, Tang T-X, Deng H, Yang X-P, Tang Z-H. Interleukin-7 Biology and Its Effects on Immune Cells: Mediator of Generation, Differentiation, Survival, and Homeostasis. *Frontiers in Immunology*. 2021;12.
11. Plumb AW, Sheikh A, Carlow DA, Patton DT, Ziltener HJ, Abraham N. Interleukin-7 in the transition of bone marrow progenitors to the thymus. *Immunology and Cell Biology*. 2017;95(10):916-24.
12. Parrish YK, Baez I, Milford T-A, Benitez A, Galloway N, Rogerio JW, et al. IL-7 Dependence in Human B Lymphopoiesis Increases during Progression of Ontogeny from Cord Blood to Bone Marrow¹. *The Journal of Immunology*. 2009;182(7):4255-66.
13. Wang C, Kong L, Kim S, Lee S, Oh S, Jo S, et al. The role of IL-7 and IL-7R in cancer pathophysiology and immunotherapy. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(18):10412.

14. Wang X, Chang S, Wang T, Wu R, Huang Z, Sun J, et al. IL7R Is Correlated With Immune Cell Infiltration in the Tumor Microenvironment of Lung Adenocarcinoma. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13.
15. Barata JT, Keenan TD, Silva A, Nadler LM, Boussiotis VA, Cardoso AA. Common gamma chain-signaling cytokines promote proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2004;89(12):1459-67.
16. Silva A, Gírio A, Cebola I, Santos CI, Antunes F, Barata JT. Intracellular reactive oxygen species are essential for PI3K/Akt/mTOR-dependent IL-7-mediated viability of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia*. 2011;25(6):960-7.
17. Fernandez-Botran R, Sun X, Crespo FA. Soluble cytokine receptors in biological therapy. *Expert opinion on biological therapy*. 2002;2(6):585-605.
18. Lee B, Hong C. The role of soluble common gamma chain in autoimmune disease. *ACB*. 2015;48(1):10-5.
19. Ampuero S, Bahamonde G, Tempio F, Garmendia ML, Ruiz M, Pizarro R, et al. IL-7/IL7R axis dysfunction in adults with severe community-acquired pneumonia (CAP): a cross-sectional study. *Scientific reports*. 2022;12(1):13145.
20. Lundtoft C, Seyfarth J, Jacobsen M. IL7RA genetic variants differentially affect IL-7R α expression and alternative splicing: a role in autoimmune and infectious diseases? *Genes & Immunity*. 2020;21(2):83-90.
21. Mazzucchelli RI, Riva A, Durum SK. The human IL-7 receptor gene: deletions, polymorphisms and mutations. *Semin Immunol*. 2012;24(3):225-30.
22. Čierny D, Hányšová S, Michalik J, Kantorová E, Kurča E, Škereňová M, et al. Genetic variants in interleukin 7 receptor α chain (IL-7Ra) are associated with multiple sclerosis risk and disability progression in Central European Slovak population. *Journal of neuroimmunology*. 2015;282:80-4.
23. Phan L, Jin, Y., Zhang, H., Qiang, W., Shekhtman, E., Shao, D., Revoe, D., Villamarin, R., Ivanchenko, E., Kimura, Z. Y. Wang, L. Hao, N. Sharopova, M. Bihan, A. Sturcke, M. Lee, N. Popova, W. Wu, C. Bastiani, M. Ward, J. B. Holmes, V. Lyoshin, K. Kaur, E. Moyer, M. Feolo, and B. L. Kattman. "ALFA: Allele Frequency Aggregator". U.S. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information, 2020 10 Mar. 2020. Report No.
24. Bińkowski J MS. Gene-Calc: Hardy Weinberg equilibrium 2018 [cited 2023 january 29]. Available from: <https://genecalc.pl/hardy-weinberg-page>.
25. Liu K, Chu J, Dai Y, Jiang A, Yang L, Xie Z, et al. Long-term follow-up of acute

lymphoblastic leukemia in young children treated by the SCMC-ALL-2009 protocol. *Leukemia & lymphoma*. 2020;61(12):2850-8.

26. Testi AM, Attarbaschi A, Valsecchi MG, Möricke A, Cario G, Niggli F, et al. Outcome of adolescent patients with acute lymphoblastic leukaemia aged 10-14 years as compared with those aged 15-17 years: Long-term results of 1094 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2019;122:61-71.

27. Wang Y, Xue YJ, Jia YP, Zuo YX, Lu AD, Zhang LP. Outcomes of Adolescent Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: Long-term Follow-up of 335 Patients. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2021;21(8):e658-e65.

28. Abrahão R, Lichtensztajn DY, Ribeiro RC, Marina NM, Keogh RH, Marcos-Gragera R, et al. Racial/ethnic and socioeconomic disparities in survival among children with acute lymphoblastic leukemia in California, 1988–2011: A population-based observational study. *Pediatric blood & cancer*. 2015;62(10):1819-25.

29. Cardoso de Carvalho D, Pereira Colares Leitão L, Mello Junior FAR, Vieira Wanderley A, Souza TPd, Borges Andrade de Sá R, et al. Association between the TPMT*3C (rs1142345) Polymorphism and the Risk of Death in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children from the Brazilian Amazon Region. *Genes*. 2020;11(10):1132.

30. Lim JYS, Bhatia S, Robison LL, Yang JJ. Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2014;120(7):955-62.

31. Shoag JM, Barredo JC, Lossos IS, Pinheiro PS. Acute lymphoblastic leukemia mortality in Hispanic Americans. *Leukemia & lymphoma*. 2020;61(11):2674-81.

32. Yang JJ, Cheng C, Devidas M, Cao X, Fan Y, Campana D, et al. Ancestry and pharmacogenomics of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*. 2011;43(3):237-41.

33. Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology*. 2011;29(5):532-43.

34. Brown PA, Shah B, Advani A, Aoun P, Boyer MW, Burke PW, et al. Acute lymphoblastic leukemia, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2021;19(9):1079-109.

35. Juliusson G, Hough R. *Leukemia*.

36. Hoelzer D, Bassan R, Dombret H, Fielding A, Ribera JM, Buske C. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for

- diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2016;27:v69-v82.
37. Blanco E, Beyene J, Maloney AM, Almeida R, Ethier M-C, Winick N, et al. Non-relapse mortality in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Leukemia & lymphoma*. 2012;53(5):878-85.
 38. Björk-Eriksson T, Boström M, Bryngelsson IL, Lähteenmäki PM, Jarfelt M, Kalm M, et al. Mortality Among Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia in Sweden From 1988 to 2017. *JAMA network open*. 2022;5(11):e2243857.
 39. Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2016;16(8):494-507.
 40. Karrman K, Johansson B. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2017;56(2):89-116.
 41. Teachey DT, Hunger SP, Loh ML. Optimizing therapy in the modern age: differences in length of maintenance therapy in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2021;137(2):168-77.
 42. Pocock R, Farah N, Richardson SE, Mansour MR. Current and emerging therapeutic approaches for T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 2021;194(1):28-43.
 43. Beldjord K, Chevret S, Asnafi V, Huguet F, Boulland ML, Leguay T, et al. Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;123(24):3739-49.
 44. Marks DI, Paietta EM, Moorman AV, Richards SM, Buck G, DeWald G, et al. T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;114(25):5136-45.
 45. McMahon CM, Luger SM. Relapsed T Cell ALL: Current Approaches and New Directions. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2019;14(2):83-93.
 46. Raetz EA, Teachey DT. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2016;2016(1):580-8.
 47. Reismüller B, Attarbaschi A, Peters C, Dworzak MN, Pötschger U, Urban C, et al. Long-term outcome of initially homogeneously treated and relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia in Austria—a population-based report of the Austrian Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Study Group. *British journal of haematology*.

2009;144(4):559-70.

48. Inaba H, Pui C-H. Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical medicine*. 2021;10(9):1926.
49. Pierro J, Hogan LE, Bhatla T, Carroll WL. New targeted therapies for relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert review of anticancer therapy*. 2017;17(8):725-36.
50. Lejman M, Kuśmierczuk K, Bednarz K, Ostapińska K, Zawitkowska J. Targeted Therapy in the Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia—Therapy and Toxicity Mechanisms. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(18):9827.
51. Dai Q, Zhang G, Yang H, Wang Y, Ye L, Peng L, et al. Clinical features and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia with low peripheral blood blast cell count at diagnosis. *Medicine*. 2021;100(4).
52. Jaime-Pérez JC, García-Arellano G, Herrera-Garza JL, Marfil-Rivera LJ, Gómez-Almaguer D. Revisiting the complete blood count and clinical findings at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: 10-year experience at a single center. *Hematology, transfusion and cell therapy*. 2019;41:57-61.
53. Bhatla T, Jones CL, Meyer JA, Vitanza NA, Raetz EA, Carroll WL. The biology of relapsed acute lymphoblastic leukemia: opportunities for therapeutic interventions. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2014;36(6):413-8.
54. Goto H. Childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: Biology and recent treatment progress. *Pediatrics International*. 2015;57(6):1059-66.
55. Li B, Brady SW, Ma X, Shen S, Zhang Y, Li Y, et al. Therapy-induced mutations drive the genomic landscape of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2020;135(1):41-55.
56. Cramer SD, Aplan PD, Durum SK. Therapeutic targeting of IL-7R α signaling pathways in ALL treatment. *Blood*. 2016;128(4):473-8.
57. Oliveira ML, Akkapeddi P, Ribeiro D, Melão A, Barata JT. IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An update. *Adv Biol Regul*. 2019;71:88-96.
58. Savino AM, Izraeli S. Interleukin-7 signaling as a therapeutic target in acute lymphoblastic leukemia. *Expert Review of Hematology*. 2017;10(3):183-5.
59. Rozovski U, Li P, Harris D, Ohanian M, Kantarjian H, Estrov Z. Interleukin-7 receptor- α gene mutations are not detected in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer medicine*. 2014;3(3):550-4.

60. Shamim Z, Spellman S, Haagenson M, Wang T, Lee SJ, Ryder LP, et al. Polymorphism in the interleukin-7 receptor-alpha and outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation with matched unrelated donor. *Scandinavian journal of immunology*. 2013;78(2):214-20.
61. Zenatti, P., Ribeiro, D., Li, W. *et al.* Oncogenic *IL7R* gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2011;43(10):932-941.
62. Louise M. Treanor, Sheng Zhou, Laura Janke, Michelle L. Churchman, Zhijun Ma, Taihe Lu, Shann-Ching Chen, Charles G. Mullighan, Brian P. Sorrentino; Interleukin-7 receptor mutants initiate early T cell precursor leukemia in murine thymocyte progenitors with multipotent potential. *J Exp Med* 7 April 2014;211(4):701-713.
63. Thomas, K.R., Allenspach, E.J., Camp, N.D. *et al.* Activated interleukin-7 receptor signaling drives B-cell acute lymphoblastic leukemia in mice. *Leukemia*. 2022;36:42-57.

Supplementary Table S1: Case-control association study comparing general ALL with different ancestry controls.

Ancestry	Model	OR	95% CI	p^a
African	CT	2.32	1.61 – 3.33	<0.0001
	TT	3.95	1.58 – 9.88	0.01
	Dominant	2.41	1.70 – 3.43	<0.0001
	Recessive	3.12	1.26 – 7.74	0.01
American	CT	1.33	0.92 – 1.90	0.13
	TT	1.29	0.52 – 3.18	0.59
	Dominant	1.32	0.93 – 1.87	0.12
	Recessive	1.17	0.48 – 2.87	0.73
Asiatic	CT	1.41	0.98 – 2.03	0.07
	TT	1.46	0.58 – 3.67	0.40
	Dominant	1.42	0.99 – 1.25	0.06
	Recessive	1.17	0.48 – 2.87	0.62
European	CT	0.83	0.57 – 1.18	0.32
	TT	0.50	0.20 – 1.24	0.17
	Dominant	0.78	0.55 – 1.10	0.16
	Recessive	0.54	0.22 – 1.32	0.22

OR: Odds Ratio, CI: Confidence interval. ^a Fisher's exact test. Statistical differences are shown in bold.

5 CONCLUSÃO

- O polimorfismo no gene *IL7RA* demonstrou-se como um possível fator de proteção para pacientes com LLA, visto que a presença do alelo CT está relacionada com tendência a melhor prognóstico quando comparado pacientes de baixo e alto risco.
- Embora mais estudos sejam necessários, pode-se inferir que o polimorfismo no gene *IL7RA* seja um provável marcador prognóstico e de risco para a LLA, pois pacientes com o polimorfismo foram correlacionados com maior recaída, mas com menor risco de óbito.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho diferem da literatura, pois avaliamos polimorfismos genéticos em vez de mutações. Embora exista um estudo que tenha avaliado alguns polimorfismos como fatores de risco para LLA, não incluiu a variante rs6897932 (CHANG et al., 2010). Acreditamos que essa seja a razão pela qual os parâmetros clínicos dos pacientes com LLA apresentaram correlações significativas em nosso estudo, mesmo com o uso de apenas uma variante.

Um dos pontos positivos do nosso estudo foi incluir pacientes acompanhados durante todo o seu seguimento, o que possibilitou uma avaliação precisa do desfecho de cada um deles (cura ou óbito), além das recaídas durante o tratamento. Outro aspecto positivo é o tamanho da nossa amostra de pacientes, o que reforça os achados estatísticos.

Chama a atenção o índice de mortalidade dos pacientes estudados, que foi de 36,1%, similar à média nacional de 36%, mas superior à média na região sul do Brasil, a qual, de acordo com dados do INCA, está em 25%. Ao compararmos com a mortalidade de pacientes nos Estados Unidos da América, que é de aproximadamente 15%, observa-se uma grande discrepância em relação à nossa população. Não foi possível avaliar neste estudo se essa diferença está relacionada ao protocolo de tratamento utilizado, ao tempo de início do tratamento ou ao tempo até o diagnóstico.

O presente estudo pode contribuir para que, no futuro, terapias direcionadas

sejam estudadas e para que o genótipo do paciente seja utilizado como um indicador para determinar o prognóstico e o risco de recidivas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, N., et al. Haploinsufficiency identifies STAT5 as a modifier of IL-7-induced lymphomas. **Oncogene**, v. 24, n. 33, p. 5252-5257, 2005.

AL-RAWI, M. A. A. et al. Aberrant expression of interleukin-7 (IL-7) and its signalling complex in human breast cancer. **Eur J Cancer**. v. 40, n. 4, p. 494-502, 2004.

AL-RAWI, M. A. A.; MANSEL, R. E.; JIANG, W. G. Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 receptor (IL-7R) signaling complex in human solid tumors. **Histology and Histopathology**. v. 18, p. 911-923, 2003.

ALSADEQ, A. et al. IL7R is associated with CNS infiltration and relapse in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 132, n. 15, p. 1614-1617, 2018.

ALVARNAS, J. C. et al. Acute lymphoblastic leukemia, version 2.2015: Clinical practice guidelines in oncology. **Journal of The National Comprehensive Cancer Network**. v. 2, p. 1240 - 1279, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures**. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2021/cancer-facts-and-figures-2021.pdf>. Atlanta, 2021. Acesso em: de set. 2021.

ARMSTRONG, S. A., et al. Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. **Cancer Cell**, v. 3, n. 2, p. 173-83, 2003.

ARMSTRONG, S. A., et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. **Nat Genet**, v. 30, n. 1, p. 41-7, 2002.

BALASUBRAMANIAN S.P.; COX A., BROWN N.J.; REED M.W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **Eur J Surg Oncol**. v. 30, n. 6, p. 593-601, 2004.

BARATA, J. T. et al. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). **Blood**. v. 98, n. 5, p. 1524-1531, 2001.

BAZDAR, D. A.; KALINOWSKA, M.; SIEG, S. F. Interleukin-7 Receptor Signaling Is Deficient in CD4+ T Cells from HIV-Infected Persons and Is Inversely Associated with Aging. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 199, n. 1, p. 1019-1028, 2009.

Benešova, Y.; Vašků, A.; Bienertova-Vašků, J. Association of interleukin 6, interleukin 7 receptor alpha, and interleukin 12B gene polymorphisms with multiple sclerosis. **Acta Neurologica Belgica** v. 118, p. 493-50, 2018.

Bińkowski J., Miks S., (2018, September). Gene-Calc [Computer software]. Available from: www.gene-calc.pl.

BRANDALISE, S. R. et al. Shorter Maintenance Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The Experience of the Prospective, Randomized Brazilian GBTLI ALL-93 Protocol. **Frontiers in Pediatrics**, v. 4, 2016.

BRIX, N. et al. Arthritis as presenting manifestation of acute lymphoblastic leukaemia in children. **Arch Dis Child**, v. 100, n. 9, p. 821-5, 2015.

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

BROWN, V. I. et al. Rapamycin is active against B-precursor leukemia *in vitro* and *in vivo*, an effect that is modulated by IL-7-mediated signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 100, p. 12123-8, 2003.

CARRETE, F.; SURH, C. D. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. **Semin Immunol**. v. 24, n. 3, p. 209-17, 2012.

CATTARUZZA, L. et al. Functional coexpression of Interleukin (IL)-7 and its receptor (IL-7R) on Hodgkin and Reed-Sternberg cells: Involvement of IL-7 in tumor cell growth and microenvironmental interactions of Hodgkin's lymphoma. **Int J Cancer**. v. 125, n. 5, p. 1092-101, 2009.

CAZÉ, M. O.; BUENO, D.; SANTOS, M. E. F. Estudo Referencial de um Protocolo Quimioterápico para Leucemia Linfocítica Aguda Infantil. **Revista HCPA**. v. 30, n. 1, p. 5-12, 2010.

CHENG, Y. et al. LNK/SH2B3 regulates IL-7 receptor signaling in normal and malignant B- progenitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 4, p. 1267-1281, 2016.

CIERNY, D. et al. Genetic variants in interleukin 7 receptor α chain (IL-7Ra) are associated with multiple sclerosis risk and disability progression in Central European Slovak population. **Journal of Neuroimmunology**. v. 282, p. 80-84, 2015.

CONTER, V. 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.

COUSTAN-SMITH, E., et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet Oncol.** v. 10, n. 2, p. 147-56, 2009.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **N Engl J Med.** v. 358, n. 5, p. 502-11, 2008.

DE SOUZA REIS, R., et al. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatr. Blood Cancer.** v. 56, p. 58-64, 2011.

GALLEGOS-ARREOLA, M. P. et al. Pathophysiology of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia**, 2013.

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

GONZÁLEZ-GARCÍA, S. et al. CSL–MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage–specific IL-7R α gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 4, p. 779-791, 2009.

GOODWIN, R., G., et al. Human interleukin 7: Molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 86, n. 1, p. 302-6, 1989.

GOOSSENS, S. et al. ZEB2 drives immature T-cell lymphoblastic leukaemia development via enhanced tumor-initiating potential and IL-7 receptor signaling. **Nature Communications**, v.6, n. 1, 2015.

GRACEY, E. et al. IL-7 primes IL-17 in mucosal-associated invariant T (MAIT) cells, which contribute to the Th17-axis in ankylosing spondylitis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 12, p. 2124-2132, 2016.

GRAUX, C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. **Transfus Apher Sci.** v. 44, n. 2, p. 183-9, 2011.

GREAVES, M. F.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639-49, 2003.

GREGORY S.G. et al. Interleukin-7 receptor α chain (IL-7R) show allelic and functional association with multiple sclerosis. **Nature Genetics**, v. 39, n. 9, p. 1083 – 1091, 2007.

GUENOVA, M.; BALATZENKO, G. **Leukemia** [Internet]. London: IntechOpen; 2013 [cited 2022 Apr 10]. 254 p. Available from: <https://www.intechopen.com/books/3260> doi: 10.5772/45914

HALTON, J. 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**, v. 24, n. 7, p. 1326-34, 2009.

HEIZMANN, B.; KASTNER, P.; CHAN, S. Ikaros is absolutely required for pre-B cell differentiation by attenuating IL-7 signals. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 13, p. 2823-2832, 2013.

HUNGER, S. P. et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 14, p. 1663-9, 2012.

INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. Rio de Janeiro 2019.

JABBOUR, E. et al. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 121, n. 15, p. 2517-28, 2015.

JIANG, Q. et al. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. **Cytokine Growth Factor Rev**. v. 16, p. 513-33, 2005.

KARAWAJEW, L. et al. Inhibition of *in vitro* spontaneous apoptosis by IL-7 correlates with bcl-2 up-regulation, cortical/mature immunophenotype, and better early cyto-reduction of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 96, n. 1, p. 297-306, 2000.

KOH, K. 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.

KOMSCHLIES, K. L. et al. Administration of recombinant human IL-7 to mice alters the composition of B-lineage cells and T cell subsets, enhances T cell function, and induces regression of established metastases. **J Immunol**. v. 152, n. 12, p. 5776-84, 1994.

KONDO, M. et al. Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes. **Science**, v. 263, n. 5152, p. 1453-1454, 1994.

KUBISTOVA, Z., MRAZEK, F., PETREK, M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. **Biomedical Papers**, v. 153, n. 2, p. 93- 102, 2009.

LEE, L. F. et al. Anti-IL-7 receptor- α reverses established type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by modulating effector T-cell function. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 109,

n. 31, p. 12674 - 12679, 2012.

LEE, L. F., et al. Anti-IL-7 receptor- reverses established type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by modulating effector T-cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. 12674-12679, 2012.

LIN, J., et al. The role of IL-7 in Immunity and Cancer. **Anticancer Research**. v. 37, n. 3, p. 963-967, 2017.

LODISH, H., et al. Análise genética em biologia molecular. In: Nader HB, editor. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: **Revinter**. p.255-93, 2002.

LU, J., et al. Genetic polymorphisms of CYP1A1 and risk of leukemia: a meta-analysis. **Onco Targets and therapy**, v. 8, p. 2883-94, 2015.

LU, L.; CHAUDHURY, P.; OSMOND, D. G. Regulation of cell survival during B lymphopoiesis: apoptosis and Bcl-2/Bax content of precursor B cells in bone marrow of mice with altered expression of IL-7 and recombina-se-activating gene-2. **J Immunol**. v. 162, n. 4, p. 1931-40, 1999.

LUNDSTROM, W. et al. Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v 110, n. 19, E1761-70, 2013.

MA, A.; KOKA, R.; BURKETT, P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. **Annu Rev Immunol**. v. 24, p. 657-79, 2006.

MACKALL, C. L. et al. Distinctions between CD8⁺ and CD4⁺ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. **Blood**. v. 89, n. 10, p. 3700-7, 1997.

MACKALL, C. L.; FRY, T. J.; GRESS, R. E. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. **Nat Rev Immunol**. v. 11, n. 5, p. 330 – 42, 2011.

MAUDE, S. L., et al. Efficacy of JAK/STAT pathway inhibition in murine xenograft models of early T-cell precursor (ETP) acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 125, n. 11, p. 1759-1767, 2015.

MAZZUCHELLI, R. I.; RIVA, A.; DURUM, S. K. The Human IL-7 Receptor Gene: Deletions, Polymorphisms and Mutations. **Semin Immunol**. v. 24, n. 3, p. 225-230, 2012.

MAZZUCHELLI, R.; DURUM, S. K. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. **Nat Rev Immunol**. v. 7, n. 2, p. 144-54, 2007.

MCELROY, C. A. et al. Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 109, n. 7, p. 2503-8, 2012.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. **Elsevier Health Sciences**, 2011. ISBN: 9780323673204

MONTI, P.; BONIFACIO, E. Curr Diab Rep. Interleukin-7 and type 1 diabetes. v. 14, n. 9, 2014.

MORRISSEY, P. J. et al. Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. **J Immunol**. v. 146, n. 5, p. 1547-52, 1991.

MULLIGHAN, C. G., et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**. v. 446, n. 7137, p. 758-64, 2007.

MULLIGHAN, C. G., et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 106, n. 23, p. 9414-8, 2009.

NACHMAN, J. B., et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1112-5, 2007.

NAKAYAMA, J., et al. BLNK suppresses pre-B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1483-1492, 2009.

NASLAVSKY, M. S. et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Hum. Mutat**. v. 38, p. 751-763, 2017.

NOGUCHI, M. Interleukin-2 receptor γ chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. **Cell**, v. 73, n. 1, p. 147-157, 1993.

O'DOHERTY, C., et al. Association of DHODH haplotype variants and response to leflunomide treatment in rheumatoid arthritis. **PHARMACOGENOMICS**. v. 13, n. 12, p. 1427-34, 2012.

PANDEY, A. et al. Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. **Nature Immunology**, v. 1, n. 1, p. 59-64, 2000.

PARK, L. S., et al. Cloning of the Murine Thymic Stromal Lymphopoietin (Tslp) Receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 5, p. 659-670, 2000.

PHAN, L. et al. "ALFA: Allele Frequency Aggregator." National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 10 Mar. 2020, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/.

PUI, C. H., et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 551-65, 2011.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**. v. 354, n. 2, p. 166-78, 2006.

PUI, C. H.; HOWARD, S. C. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. **Lancet Oncol**, v. 9, n. 3, p. 257-68, 2008.

PULLEN, J., et al. Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B- precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. **Leukemia**. v. 13, n. 11, p. 1696-707, 1999.

QIU, Y., et al. Analysis of immunophenotypes of acute lymphoblastic leukemia by three color flow cytometry. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**. v. 17, n. 2, p. 442-4, 2009.

QU, H. et al. IL-7/IL-7 receptor axis stimulates prostate cancer cell invasion and migration via AKT/NF- κ B pathway. **Int. Immunopharmacol**. v. 40, p. 203-210, 2016.

REDDY, K. S.; PERKINS, S. L. Advances in the diagnostic approach to childhood lymphoblastic malignant neoplasms. **Am J Clin Pathol**. 122 Suppl, S3-18, 2004.

RICH, B. E., et al. Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 2, p. 305-316, 1993.

RIES, L. G. et al. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995, **National Cancer Institute**, SEER Program. NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD, 1999.

RIX, U., et al. Target-Disease Network Model of Second-Generation BCR-ABL Inhibitor Action in Ph+ ALL. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77155, 2013.

SANTIAGO, J. L. Study of the association between the CAPSL-IL7R locus and type 1 diabetes. **Springer**. v. 51, p. 1653-1658, 2008.

SASSON, S. C. et al. IL-7 receptor is expressed on adult pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia and other B-cell derived neoplasms and correlates with expression of proliferation and survival markers. **Cytokine**. v. 50, n. 1, p. 58-68, 2010.

SATO, E., et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high

CD8+/regulatoryT cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proc Natl Acad Sci U SA**, v. 102, n. 51, p. 18538-43, 2005.

SCHIFFMAN, J. D. Applying Molecular Epidemiology in Pediatric Leukemia. **Journal of Investigative Medicine**, v. 63, n. 6, p. 355-60 2015.

SCHRAPPE, M., BEIER, R., BÜRGER, B. New treatment strategies in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol**. v. 15, n. 4, p. 729- 40, 2002.

SEEWALD, L. et al. Acute leukemias in children with Down syndrome. **Mol Genet Metab**. v. 107, 0. 25-30, 2012.

SEN, E. S.; MOPPETT, J. P.; RAMANAN, A. V. Are you missing leukaemia? **Arch Dis Child**, v. 100, n. 9, p. 811-2, 2015.

SHAMIN, K., et al. Managing Iron Deficiency Anemia of CKD With IV Iron. **US Pharm**. v. 8, n.38, p. 22-26, 2013.

SHARMA, N. D., et al. Epigenetic silencing ofSOCS5potentiatesJAK- STATsignaling and progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Science**, 2019.

SHOCHAT, C. et al. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 208, n. 5, p. 901-908, 2011.

SILVA, A. et al. Intracellular reactive oxygen species are essential for PI3K/Akt/mTOR-dependent IL-7-mediated viability of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia**. v. 25, n. 6, p. 960-7, 2011.

SIRVENT, N. 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**. v. 47, n. 2, p. 239-47, 2011.

STELIAROVA-FOUCHER, E. et al. International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. **Lancet Oncol**. v. 18, n. 6, p. 719-731, 2017.

SUN, D. P. et al. Investigating Factors Associated with Thymic Regeneration after Chemotherapy in Patients with Lymphoma. **Front. Immunol**. v. 7, p. 1-9, 2016.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence andmortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

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

UJIIE, H. et al. The tumoral and stromal immune microenvironment in malignant pleural mesothelioma: a comprehensive analysis reveals prognostic immune markers. **Oncolmmunology**. v. 3, e1009285, 2015.

VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**. v. 469, n. 7330, p. 314-22, 2011.
Vitiello, G. A. F., et al. Interleukin 7 receptor alpha Thr244Ile genetic polymorphism is associated with susceptibility and prognostic markers in breast cancer subgroups. **Elsevier**. v. 103, p. 121-126, 2017.

WANG, D., et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study. **Arthritis Research & Therapy**. 16:R79, 2014.

WEN, R. et al. Jak3 selectively regulates Bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. **Mol Cell Biol**. v. 21, n. 2, p. 678-89, 2001.

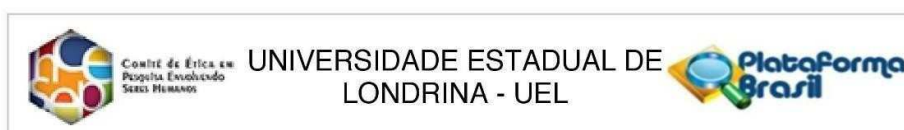
YAQUB, S.; AANDAHL, E. M. Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis. **Crit Rev Oncog**, v. 15, n. 1-2, p. 43-63, 2009.

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

ZHANG, Y. et al. Association of Interleukin-10 -3575T>A and -1082A>G polymorphisms with non-Hodgkin lymphoma susceptibility: a comprehensive review and meta-analysis. **Molecular Genetics and Genomics**. v. 290, n. 6, p. 2063-2073 2015.

8 ANEXOS

8.1 Anexo A: Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Implicações Prognósticas e Terapêuticas de Marcadores Genéticos e Imunológicos no Câncer

Pesquisador: Maria Angelica Ehara Watanabe

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 6

CAAE: 73557317.0.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de PG em Patologia Experimental

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.638.782

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo vinculado ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental/Uel. Segundo a pesquisadora o câncer ocorre decorrente da proliferação descontrolada das células devido a vários fatores, sejam eles ambientais ou genéticos, que podem culminar com invasão tecidual próxima ao tumor primário ou até mesmo o desenvolvimento de metástases. Trata-se de uma doença complexa, heterogênea, e sua evolução é dependente da interação tumor-hospedeiro. O conhecimento sobre os diferentes tipos de tumores tem sido muito explorado mas o grande desafio da oncologia tem sido o entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem estes tumores malignos. Dentro deste contexto, os aspectos imunológicos, moleculares e epigenéticos, das citocinas e dos receptores de quimiocinas e receptores de citocinas, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização foram os temas escolhidos para serem abordados neste projeto, uma vez que todos estes parâmetros podem ter relevância clínica e também constituírem alvos promissores que no futuro podem ser valiosos na avaliação do prognóstico e no delineamento terapêutico. A pesquisa será realizada no Laboratório de Polimorfismos DNA e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas da Uel. Serão selecionadas um total de 1150 amostras provenientes do Hospital de Câncer de Londrina: - 300 Amostras de tecido normal e tumoral de pacientes

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Comitê de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.638.782

diagnosticadas com câncer de mama, câncer de laringe, câncer colorretal, meduloblastoma, neuroblastoma e tumor adrenocortical. A realização do ensaio de imuno-histoquímica. Essas análises serão realizadas no Laboratório de Polimorfismos DNA e Imunologia da

UEL. - 200 Amostras de tecido tumoral e saudável a fresco, de pacientes diagnosticados com cancer de mama, laringe e colorretal, provenientes de cirurgia para excisão do tumor do mesmo hospital para extração de DNA, RNA e sobrenadante. - 300 Amostras de sangue de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, câncer de laringe e câncer colorretal e tumores pediátricos, que serão coletadas para obtenção de DNA, RNA e plasma para estudos de polimorfismos genéticos, expressão gênica e proteica. - 50 Amostras de medula de pacientes pediátricos diagnosticados com leucemias agudas (linfóide e mielóide) para extração de RNA e plasma. - 300 Amostras de sangue periférico e/ou saliva de controles saudáveis, sem histórico de neoplasia, para extração de DNA, RNA e plasma. Serão realizados análise de PCR-RFLP para estudo das variantes alélicas polimórficas, análise de imunohistoquímica, análise da expressão gênica por PCR quantitativo, análise da Expressão Proteica por ELISA. Os participantes da pesquisa serão convidados a participar do estudo durante o atendimento clínico no Serviço de Oncologia do Hospital do Câncer de Londrina. No grupo caso serão incluídas todos os pacientes que tiverem diagnóstico para câncer de mama, câncer laringe e câncer colorretal e tumores pediátricos. E no grupo controle serão incluídos indivíduos saudáveis sem histórico de neoplasias, doenças autoimunes e infecções. Serão excluídos pacientes com doenças infecciosas ou autoimunes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a presença dos polimorfismos genéticos, expressão gênica e expressão proteica do fator de transcrição FOXP3, das citocinas TGFB1, IL10, IL12A, IL35 IL1B, TNFa e INFg, das quimiocinas CXCL12 e CCL5, das proteínas SMAD, IGF1, CTLA4, dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRII, TRIII, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQOI, GSTT1 e GSTM1, no tecido tumoral e normal, e no sangue periférico dos pacientes com câncer de mama, laringe e colorretal e nos tumores pediátricos.

Objetivos Secundários:

• Detectar a presença dos polimorfismos genéticos do FOXP3, TGF, IL10, IL12A, IL35 IL1B, TNFa e INF gama, das quimiocinas CXCL12 e CCL5 dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRII, TRIII, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQOI, GSTT1 e GSTM1 nos DNAs extraídos do câncer de mama, câncer

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA ENVOLVENDO
SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.638.782

de cólon, tumores de laringe e câncer colorretal e para os tumores pediátricos (tumor de Wilms, meduloblastoma, neuroblastoma, leucemias agudas, linfomas e tumor adrenocortical).

- Avaliar a expressão gênica dos genes acima citados por PCR quantitativo.
- Realizar imunohistoquímica para FOXP3, TGFb1, IL10, IL12A, IL35, IL1B, CXCL12, CCL5, SMAD, CXCR4, CCR5, p53 nos tecidos tumoral e saudável fixados em formalina tamponada e embebido em parafina, para avaliar a expressão proteica.
- Avaliar a expressão proteica por ELISA dos genes CXCL12, TGF-, FOXP3, CCL5 e INF gama.
- Avaliar a influência dos polimorfismos genéticos na expressão gênica e proteica desses genes.
- Comparar a frequência alélica dos polimorfismos dos genes supracitados e compará-los com os dados clinicopatológicos dos pacientes com os diferentes tipos de câncer

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora o risco que os participantes da pesquisa podem ter neste projeto é quanto ao desconforto na hora da coleta de sangue periférico, porém a coleta será efetuada por profissional habilitado seguindo-se todas as normas de biossegurança, e caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos coletores responsáveis. O estudo não trará benefícios diretos aos participantes, mas pretende-se obter marcadores que possam fornecer subsídios adicionais de auxílio prognóstico e delineamento terapêutico de pacientes com câncer de mama, cancer laringe e cancer colorretal e tumores pediátricos. Espera-se também obter uma integração maior entre as instituições colaboradoras, Universidade Estadual de Londrina e Hospital do Câncer de Londrina. O envolvimento de pesquisadores colaboradores permitirá a formação de profissionais qualificados para atuarem nas áreas de Imunologia e Genética do câncer, disseminando o conhecimento. Pretende-se contribuir com um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos com a patogênese das doenças acima referidas e futuramente com a melhoria na qualidade de vida dos pacientes, através da inclusão de marcadores que, de alguma forma, possam ser aplicados futuramente na prática clínica

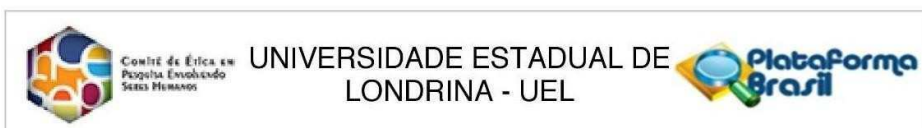
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou folha de rosto devidamente assinada pelo Coordenador do Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, cronograma adequado e orçamento detalhado. Apresentou 04 modelos de TCLE adequados em forma de convite (adultos e crianças caso e adulto

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR **Município:** LONDRINA **CEP:** 86.057-970
Telefone: (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.638.782

e crianças controle saudáveis). Apresentou ainda termo de autorização do hospital e declaração de 02 bioquímicas responsáveis pelas coletas das amostras.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

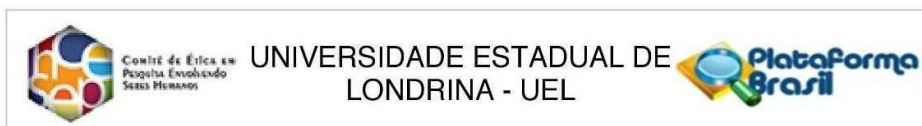
Trata-se de emenda de projeto já aprovado. Justificativa da Emenda: Inclusão de metodologia: Será realizado questionário aos pacientes e participantes saudáveis do projeto intitulado "Implicações Prognósticas e Terapêuticas de Marcadores Genéticos e Imunológicos Câncer". O TCLE foi readequado com a inclusão do questionário.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_111024_2_E4.pdf	25/04/2018 10:46:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_TCLE_controles_saudaveis_crianças.pdf	25/04/2018 10:45:28	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	3_TCLE_crianças.pdf	25/04/2018 10:44:43	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4_TCLE_pacientes_adultos.pdf	25/04/2018 10:43:35	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	1_TCLE_controles_saudaveis_adultos.pdf	25/04/2018 10:42:37	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	adendo_anamnese.doc	09/04/2018 14:04:18	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	anamnese.doc	09/04/2018 14:00:50	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	adendo_APOBEC.pdf	08/03/2018 22:07:23	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	Emenda.docx	29/11/2017 16:03:16	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	24/07/2017 16:01:36	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR **Município:** LONDRINA **CEP:** 86.057-970
Telefone: (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.638.782

Cronograma	9_cronograma.pdf	18/07/2017 15:57:53	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	8_Projeto_Cancer_2017.pdf	18/07/2017 15:30:16	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	6_Declaracao_HCL.pdf	18/07/2017 15:29:55	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	7_Termo_responsabilidade_coleta.pdf	18/07/2017 15:24:58	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	5_Termo_de_Confidencialidade_e_Sigil o.pdf	18/07/2017 15:22:23	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 07 de Maio de 2018

**Assinado por:
Rosana Lopes
(Coordenador)**

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR **Município:** LONDRINA **CEP:** 86.057-970
Telefone: (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br

8.2 Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



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, comotambém 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

Consentimento livre esclarecido e informado:

Eu, ____, RG ____,

declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecido pelo 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):