



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DIEGO LIMA PETENUCCI

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE *CXCL12*
E *CXCR4* E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE *CXCL12* NA
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA INFANTOJUVENIL**

DIEGO LIMA PETENUCI

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CXCL12
E CXCR4 E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CXCL12 NA
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA INFANTOJUVENIL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do Título de Mestre.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira.

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P447a Petenuci, Diego Lima.

A nálise dos polimorfismos genéticos de CXCL12 e CXCR4 e níveis plasmáticos de CXCL12 na leucemia linfóide aguda infantojuvenil / Diego Lima Petenuci. - Londrina, 2016.
67 f.: il.

Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe.

Coorientador: Carlos Eduardo Coral de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Leucemia linfóide - Teses. 2. Polimorfismo (Genética) - Teses. 3 Câncer - Aspectos genéticos - Teses. I. Watanabe, Maria Angelica Ehara. II. Oliveira, Carlos Eduardo Coral de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616-006.446

DIEGO LIMA PETENUCCI

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CXCL12 E CXCR4
E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CXCL12 NA LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA INFANTOJUVENIL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do Título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a Dr^a Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 04 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sentido de tudo o que faço e escolho. Meu mais profundo e eterno agradecimento. Que a gratidão mantenha meus olhos sempre abertos.

*Aos meus pais **Irineu Aparecido Petenuci** e **Maria Edinalva Lima Petenuci**; vocês são o meu apoio e o meu abrigo. Todas as conquistas da minha vida têm sabor e cheiro de casa, e em todas elas têm também suas mãos. Obrigado.*

*À minha esposa **Edilaine Baccarin Petenuci**, por dividir a vida comigo com tudo o que ela traz. Obrigado pelos sonhos partilhados, pelas palavras que me reanimaram, pelos abraços que me acolheram e pela presença que tornam o meu caminhar mais leve e muito mais feliz. Como tantos outros trabalhos, este também é parte de você.*

*Aos meus irmãos **Magda Cristina Lima Petenuci** e **Lincon Lima Petenuci**. A construção das melhores partes de mim foi erigida com vocês. Agradeço por toda a amizade, brincadeiras e conversas; vocês são preciosos para mim.*

*À minha orientadora, **Prof^a Dr^a Maria Angelica Ehara Watanabe**. Sou mais um a cruzar o seu caminho e a colher mais que conhecimentos. Obrigado por ultrapassar, também em mim, a fronteira que distância orientador e estudante e a tornar esta minha etapa mais saborosa. Vou te guardar sempre comigo.*

*Ao meu co-orientador **Dr^o Carlos Eduardo Coral de Oliveira**. Assim como o nosso amigo em comum, eu te admiro muito. O seu apoio e toda a sua ajuda foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Obrigado pelas discussões, crivos, conselhos e é claro, pela amizade.*

*Às professoras **Dr^a Marla Karine Amarante**, **Dr^a Roberta Losi Guembarovski** e **Dr^a Karen Brajão de Oliveira**. Agradeço por todo o comprometimento em melhorar este trabalho, pelas reflexões e pelas valiosas contribuições que me ensinam a ser um profissional melhor.*

*À nossa técnica, colaboradora e amiga **Vânia Darc de Castro**. Este trabalho também é seu. Obrigado por todo o suporte técnico e pela dedicação ao LEAP-DNA.*

*Aos amigos **Flávia Luísa e Glauco Akelington**, que me acompanharam de perto nesta jornada, desde as disciplinas até esta fase final. Sou grato por toda colaboração, pela parceria e pela presença.*

*Aos amigos e parceiros de laboratório: **Alberto Sakaguchi; Bruna Hirata; Carlos Hiroki; Carolina Batista; Cyntia Mayumi; Felipe Campos; Karen Suzuki; Mayara Tiemi; Nathalia Pereira; Patricia Midori e Thiago Fujita**, com os quais consumi a maior parte do tempo na construção deste e de outros trabalhos. Obrigado pela acolhida e pelas inúmeras formas de contribuição. A convivência com vocês foi maravilhosa e nos vincula a uma mesma família científica.*

*Ao médico onco-hematologista **Fausto Celso Trigo**, a **Dr^a Marla Karine Amarante** e a **Prof^a Dr^a Aparecida de Lourdes Perim**, agradeço imensamente pela colaboração com as amostras que possibilitaram a execução deste trabalho.*

Aos professores do programa de pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina por todo o conhecimento compartilhado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante todo o período de mestrado.

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

A principal missão do homem, na vida, é dar luz a si mesmo e tornar-se aquilo que ele é potencialmente.

Erich Fromm

PETENUCCI, Diego Lima. **Análise dos polimorfismos genéticos de CXCL12 e CXCR4 e níveis plasmáticos de CXCL12 na leucemia linfóide aguda infantojuvenil**. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma doença maligna originada a partir de uma série de alterações genéticas e/ou epigenéticas em um único precursor hematopoiético que adquire características de malignidade. No processo de desenvolvimento da doença, há um acúmulo inicial de leucócitos malignos na medula óssea com tendência de evasão para a corrente sanguínea e invasão para outros órgãos. Embora de etiologia desconhecida, acredita-se que a leucemogênese ocorre a partir de uma complexa rede de interações entre fatores ambientais e genéticos que favorecem as modificações celulares. Estudos de associação genética e suscetibilidade ao câncer, incluindo a LLA, têm avaliado polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes que regulam a hematopoiese e outros processos imunológicos importantes. A quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 desempenham uma função essencial no *homing* de células tronco hematopoiéticas e a ativação deste eixo serve de suporte para eventos malignos em células leucêmicas, além de desempenhar um importante papel na invasão extramedular em crianças com LLA. O gene que codifica a quimiocina CXCL12 apresenta um polimorfismo no segmento conservado da região 3'UTR (rs1801157) (G/A), o qual foi relacionado com o aumento de sua expressão, podendo facilitar a metástase e a mobilização de células leucêmicas. Da mesma forma, foi descrito no gene CXCR4 um polimorfismo de base única (C/T) no códon 138 (rs2228014) que vem sendo associado a diferentes neoplasias. Neste contexto, no presente estudo, investigouse a associação destes polimorfismos e os níveis plasmáticos de CXCL12, com a suscetibilidade da doença, risco de recidiva, fase clínica dos pacientes e risco de óbito. A análise dos polimorfismos foi realizada pelo método de reação em cadeia da polimerase seguido da avaliação do tamanho dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP), a partir de amostras de sangue periférico de 94 pacientes com LLA e 137 indivíduos livres de neoplasia; os níveis plasmáticos de CXCL12 foram determinados por ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) (grupo LLA n=62 e grupo controle n= 59). Não foram observadas associações entre os polimorfismos rs1801157 e rs2228014 com a suscetibilidade ou risco de recidiva da LLA; no entanto, foi observada uma forte associação do polimorfismo do CXCL12 com o risco de morte em pacientes com o genótipo AA comparado com os outros genótipos (p=0,014). Diferentemente, os níveis plasmáticos da quimiocina não demonstraram diferenças significativas entre pacientes com LLA e grupo controle, nem quanto ao risco de recidiva. No entanto, foi notado um significativo aumento de CXCL12 em pacientes (p=0,004) e controles (p=0,04) portadores do alelo A para o polimorfismo rs1801157. Este estudo sugere que o polimorfismo no gene CXCL12 pode alterar a sua expressão, e indica um possível envolvimento do polimorfismo do CXCL12 e o risco de morte em pacientes com LLA.

Palavras-chave: Leucemia Linfóide Aguda. CXCL12. CXCR4. Polimorfismo genético.

PETENUCCI, Diego Lima. **Analysis of genetic polymorphisms of *CXCL12* and *CXCR4* and plasmatic levels of *CXCL12* in childhood acute lymphoblastic leukemia**. 2016. 65 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disorder that originates from the accumulation of genetic and/or epigenetic alterations in one single hematopoietic precursor that acquire malignant characteristics. In disease development, there is an initial accumulation of malignant leukocytes in the bone marrow with evasion tendency into the bloodstream and invasion to other organs. Although etiology is unknown, it is believed that the leukemogenesis occurs from complex interactions between genetic and environmental factors. Genetic and susceptibility association study to cancer, including ALL, have evaluated single nucleotide polymorphisms in genes regulating hematopoiesis and other important immunological processes. The chemokine *CXCL12* and its receptor *CXCR4* play an important role in the homing of hematopoietic stem cells, and activation of this axis acts as a support for malignant events in leukemic cells, moreover it plays an important role in extramedullary invasion in pediatric ALL. *CXCL12* coding gene has a polymorphism in the 3'-untranslated region (rs1801157) (G/A) which has been suggested to involve an upregulation of *CXCL12* and can facilitate the mobilization and metastasis of leukemic cells. *CXCR4* has revealed single nucleotide polymorphisms (C/T) at codon 138 (rs2228014) that has been associated with different cancers. In this context, this study aimed to investigate the association of polymorphisms in *CXCL12* (rs1801157) and *CXCR4* (rs2228014) genes, and plasma levels of *CXCL12*, with susceptibility, risk of relapse treatment phase and risk of death. The polymorphism analyses was carried out by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method from peripheral blood samples of 94 patients with ALL and 137 individuals free of neoplasia; *CXCL12* plasma levels were quantified by enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) (ALL group n=62 and control group n=59). There were no associations between rs1801157 and rs2228014 with ALL susceptibility or risk of relapse; however, a strong association of *CXCL12* polymorphism with risk of death was observed in individuals with AA genotype compared to other genotypes (p=0.014). Chemokine plasma levels did not show significant differences between patients and control group and risk of relapse. Although no differences were observed for *CXCR4* polymorphism, a significant increase of *CXCL12* was noted in patients (p=0.004) and controls (p=0.04) carrying A allele for rs1801157 polymorphism. This study suggests that variations in *CXCL12* gene could change its expression, and it indicates a possible involvement of *CXCL12* polymorphism in the risk of death in ALL patients.

Keywords: Acute Lymphoid Leukemia. *CXCL12*. *CXCR4*. Genetic polymorphism.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sumário da classificação das leucemias segundo a revisão da OMS 2008	19
Tabela 2 - Classificação das Leucemias agudas/Linfomas linfoblástico B e T segundo a OMS.....	25
Tabela 3 - Classificação imunofenotípica das LLA segundo o EGIL	26
Tabela 4 - Classificação de risco de recidiva.....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABL	Proto-oncogene de Abelson
AMD3100	<i>1,1'-[1,4-Phenylenebis-(methylene)]-bis-(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) octahydrochloride</i> (Plerixafor)
BCR	Região de agrupamentos de pontos de quebra
CD	Grupamento de diferenciação
CXCL12	Ligante 12 da família de quimiocinas CXC
CXCR4	Receptor 4 para quimiocinas da família CXC
CXCR7	Receptor 7 para quimiocinas da família CXC
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGIL	Grupo europeu de classificação imunológica das leucemias
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EUA	Estados Unidos da América
ETV6	Gene variante <i>ets</i> 6
FAB	Grupo Fraco-américo-britânico
FGFR1	Receptor 1 para o fator de crescimento de fibroblastos
GBTLI	Grupo brasileiro de tratamento de leucemia na infância
IgH	Cadeia pesada da imunoglobulina
INCA	Instituto nacional do câncer
JAK	Janus-quinases
LA	Leucemia aguda
LLA	Leucemia linfoide aguda
LLA-B	Leucemia linfoide aguda de linhagem B
LLB	Leucemia linfoide de linhagem B
LLT	Leucemia linfoide de linhagem T
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
MPO	Mieloperoxidase
C-MYC	Proto-oncogene <i>Myc</i> celular
NK	Células matadora natural
OMS	Organização mundial da saúde
PBSF	Fator de estimulação de crescimento de células pré-B

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGFRA	Receptor tipo alfa para fator de crescimento derivado de plaqueta
PDGFRB	Receptor tipo beta para fator de crescimento derivado de plaqueta
<i>Ph</i>	Cromossomo Philadelphia
RFLP	Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
<i>RUNX1</i>	Fator de transcrição 1 relacionado com o Runt
SDF-1	Fator derivado do estroma da medula óssea
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
t	Translocação
TdT	Deoxinucleotidil-transferase terminal
TP53	Proteína tumoral 53
UTR	Região não traduzível
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Leucemias	15
1.2	Leucemia Linfoide Aguda	20
1.4	Fases do tratamento e classificação de risco da LLA	27
1.5	Quimiocinas e receptores de quimiocinas	28
1.5.1	Quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4	30
1.5.2	Participação da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 na LLA	32
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo geral	36
2.2	Objetivos específicos	36
3	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	37
4	CONCLUSÃO	51
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
6	ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças de maior incidência no mundo, o câncer permanece como um dos principais desafios da saúde. Em todo o mundo, para o ano de 2012, foram estimados 14,1 milhões de novos casos de câncer, 8,2 milhões de mortes e 32,6 milhões de pessoas vivendo com a doença. Apesar da incidência, para todos os tipos de cânceres combinados, ser até duas vezes maior em países desenvolvidos comparado aos países em desenvolvimento, a taxa de mortalidade é apenas 8 a 15% maior nos países mais ricos. Essa discrepância deve-se à diferença do tipo de câncer incidente e a menor disponibilidade de tratamento adequado nas regiões mais carentes (WHO, 2015a).

O termo “câncer” refere-se a doença em que células anormais desenvolvem um grau de autonomia e se dividem descontroladamente devido a perda de sinais regulatórios que controlam a divisão celular. Os avanços das pesquisas, nos últimos 50 anos, têm contribuído para o entendimento de como as células neoplásicas adquirem essa autonomia. Assim, sugere-se que o câncer é uma doença que envolve alterações no genoma celular, e essas alterações levam a produção de proteínas que comprometem o delicado balanço celular entre a divisão e a quiescência (HEJMADI, 2010) resultando no início e progressão da doença.

A patogênese do câncer ocorre num 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 imunológicos podem atuar tanto na eliminação quanto no favorecimento da iniciação, progressão, invasividade e finalmente metástase das células transformadas. Adicionalmente, em todo este processo, ocorre a influência dos perfis genéticos e fenotípicos de células que participam do início e do estabelecimento das células malignas (YAQUB e AANDAHL, 2009).

Em relação ao câncer pediátrico, a taxa global de incidência varia entre 50 a 200 casos por milhão de crianças. O termo “câncer pediátrico/infantil” é comumente usado para se referir a neoplasias malignas que acometem indivíduos antes dos 15 anos de idade (WHO, 2015b). Cânceres em crianças são comumente associados a alterações no DNA que podem ocorrer no início da vida e, até mesmo, no desenvolvimento intrauterino. De modo geral, essas neoplasias não estão fortemente ligadas a fatores de riscos ambientais ou ao estilo de vida. Assim, estes

que se desenvolvem com maior frequência em crianças são também diferentes daqueles mais comuns na idade adulta (ACS, 2015).

Neoplasias infantis são raras e correspondem a 0,5 a 4,6% de todos os cânceres (WHO, 2015b). Porém, similarmente ao que ocorre em países desenvolvidos, no Brasil, o câncer é responsável pela segunda causa de mortalidade proporcional na idade infanto-juvenil, e a primeira causa de morte relacionada à doença. Anualmente são estimados mais de 9.000 novos diagnósticos de câncer entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos no Brasil (INCA, 2008). Nesta faixa-etária, as leucemias são o tipo de câncer mais diagnosticado, em torno de 30%, seguido por tumores de cérebro e sistema nervoso central (SNC) (26%), neuroblastoma (6%), nefroblastoma (5%) e outros (ACS, 2015).

Segundo a Sociedade Americana de Câncer, a incidência geral de leucemia tem aumentado lentamente ao longo das últimas décadas. Entre os anos de 2007 a 2011, a incidência aumentou 1,6% por ano em homens e 0,6% por ano em mulheres. Entretanto, em contraste à incidência, a taxa de mortalidade decorrente de leucemia tem diminuído nas últimas décadas. Entre o mesmo período de 2007 a 2011, o número de óbitos diminuiu em torno de 1% ao ano, em ambos os sexos (ACS, 2015). No Brasil, as leucemias são o nono tipo de câncer mais diagnosticado na população geral; para o ano de 2016 o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 5.540 novos casos em homens e 4.530 em mulheres (INCA, 2015).

1.1 Leucemias

Em 1827 o médico francês Alfred Velpeau descreveu o caso de uma mulher de 63 anos de idade que veio a óbito ao desenvolver uma doença caracterizada por febre, fraqueza e um considerável quadro de inchaço abdominal. Na autópsia, Velpeau observou que a paciente apresentava aumento considerável do baço e o sangue possuía um aspecto semelhante à cola, o que foi associado a uma mistura de pus e sangue (KAMPEN, 2012). Passado dezoito anos, em 1845, o patologista John Hughes Bennett reportou a necropsia de um paciente de 28 anos que apresentou um quadro de aumento do baço e alteração na cor e na consistência do sangue; o pesquisador descreveu a condição patológica com o termo “leucocitemia” baseado no acúmulo de leucócitos visualizados em microscópio ótico, quando este

começava a ser empregado na rotina dos laboratórios de patologia (THOMAS, 2013).

Finalmente, no ano de 1847, o alemão Rudolf Virchow cunhou o nome “leukämie” (leucemia, do Grego “*leukos*”, branco e “*heima*”, sangue), ao observar a inversão da quantidade de glóbulos brancos e vermelhos em pacientes que apresentavam características semelhantes às descritas por Bennet (PILLER, 2001). Ainda nos primórdios dos relatos sobre a leucemia, em 1850, o médico Henry Fuller descreveu o interessante caso de uma menina de nove anos que possuía um quadro clínico de hemorragia frequente e esplenomegalia, além de um grande número de células claras e de tamanhos variados no sangue. Fuller reportou que do início dos sintomas até o óbito, passaram-se oito meses, sendo este o primeiro caso de leucemia relatado em criança (PILLER, 2001; THOMAS, 2013).

Com o passar dos anos o conhecimento sobre a doença, até então desconhecida, não parou de evoluir. Nikolaus Friedreich propôs a classificação entre a forma aguda e crônica em 1857. Passados onze anos, em 1868, Ernest Neumann descreveu a medula óssea como órgão de origem das células sanguíneas e afirmou, pela primeira vez em 1872, que a leucemia referia-se a uma doença da medula óssea. Baseado neste novo conceito, em 1876 Friedrich Mosler determinou a punção de medula óssea como o principal método de diagnóstico de leucemias *in vivo*. No fim do século XIX, o hematologista suíço Otto Naegeli diferenciou células presentes no sangue de pacientes que foram nomeadas como mieloblastos e linfoblastos, permitindo a classificação da leucemia entre as formas linfóide e mieloide. Finalmente, em 1913, a leucemia foi classificada em quatro tipos: leucemia linfóide crônica, leucemia linfóide aguda, leucemia mieloide crônica e leucemia mieloide aguda (THOMAS, 2013).

Muitos dos conceitos estabelecidos entre o século XIX e o início do século XX, são ainda aplicados para o diagnóstico e a classificação de indivíduos acometidos com leucemia, e estes foram somados aos novos conhecimentos advindos do desenvolvimento de tecnologias e da evolução científica. O avanço das ciências como a genética, a imunologia, a hematologia e tantas outras têm ampliado o entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos, ainda no início da leucemia, e têm permitido estabelecer associações mais claras entre as alterações que ocorrem a nível celular e a repercussão dessas alterações no quadro clínico do paciente.

Tendo em vista o histórico geral da evolução da compreensão das leucemias, atualmente elas são conceituadas como um conjunto de desordens neoplásicas que podem ser diferenciadas quanto a morfologia das células malignas, aos marcadores imunofenotípicos e as características citogenéticas e moleculares das células. Assim, as características de cada tipo de leucemia refletem as diferenças das alterações biológicas que estão envolvidas na transformação da célula saudável para a célula maligna (GUENOVA e BALATZENKO, 2013).

Apesar das características peculiares a cada tipo de leucemia, as diferentes apresentações da doença compartilham o conceito básico de que todas as células malignas são provenientes de um único progenitor comum que sofre recorrentes insultos genéticos e passa a se proliferar de forma aberrante (TEITELL e PANDOLFI, 2009). Assim, compreende-se que a patogênese da leucemia parte de uma combinação de alterações genéticas e/ou epigenéticas em células hematopoiéticas, que levam a alterações de vias bioquímicas e resultam num aumento da velocidade de divisão celular, resistência a apoptose e comprometimento do processo normal de diferenciação (INABA *et al.*, 2013; HUNGER e MULLIGHAN, 2015). No processo de desenvolvimento da doença, há um acúmulo inicial de leucócitos malignos na medula óssea com tendência de evasão para a corrente sanguínea. Este aumento de células alteradas causa insuficiência da medula óssea e desencadeia anemia, neutropenia e trombocitopenia. Além disso, as células neoplásicas podem ainda infiltrar-se em órgãos como fígado, baço, linfonodo, meninges, cérebro, pele ou testículos, prejudicando o prognóstico dos pacientes (HOFFBRAND e MOSS, 2013).

Para a maioria dos pacientes, os primeiros indicativos de neoplasia hematológica, como a leucemia, surgem a partir da apresentação de alguns sintomas como perda de peso inexplicável, fraqueza, fadiga crônica, hematomas, hepato e esplenomegalia e dor óssea. A partir dessas apresentações clínicas o diagnóstico do paciente passa pela análise numérica e morfológica das células do sangue periférico. Essa análise é capaz de identificar anormalidades em hemácias, leucócitos e plaquetas; além de alteração dos níveis de hemoglobina. Se verificadas anormalidades do sangue periférico, a punção e biópsia de medula óssea é usualmente o próximo procedimento (NCI, 2015).

A análise citoquímica utilizando-se de colorações como Mieloperoxidase, Sudan Black e Ácido periódico de Schiff, para a marcação de células da medula

óssea ou mesmo do sangue periférico, são úteis no diagnóstico das leucemias (INCA, 2001a), porém a caracterização imunofenotípica, determinada por citometria de fluxo, tornou-se essencial para o diagnóstico e classificação. Assim, é possível distinguir a origem e os diferentes estágios das células leucêmicas, e estabelecer uma melhor referência para o tratamento do paciente (AZIZ *et al.*, 2015). Adicionalmente, as análises citogenéticas e moleculares podem complementar as informações obtidas pelos outros métodos; essas análises permitem a identificação de alterações cromossômicas e genéticas de células malignas, o que contribui para o estabelecimento do diagnóstico e permite a avaliação de fatores prognósticos (QUIXABEIRA e SADDI, 2008).

Desde 1913, se mantém, atualmente, a ampla classificação das leucemias em quatro tipos com base na combinação de características definidas pelos termos “agudo”, “crônico”, “mieloide” e “linfoide”. Os termos “agudo” e “crônico” se referiam originalmente ao prazo relativo de sobrevivência dos pacientes quando ainda não havia disponibilidade de terapia eficaz e o óbito era o desfecho mais provável. Deste modo, as leucemias agudas eram compreendidas como aquelas de evolução acelerada e rápida piora do paciente; em contrapartida, as leucemias crônicas possuíam desenvolvimento mais lento e quando os sintomas surgiam, tendiam a ser mais brandos, agravando-se gradualmente (PUI e ONCIU, 2012). Evidentemente, essas características permanecem presentes nas doenças agudas e crônicas, porém com a melhora do tratamento, esses dois termos assumiram novos significados. Na atualidade a leucemia aguda caracteriza-se pela rápida proliferação de células tumorais e uma predominância de células imaturas, os blastos. Enquanto o termo “crônico” refere-se as desordens em que as células tumorais predominantes demonstram graus variados de diferenciação antes da fase blástica (PUI e ONCIU, 2012).

Além disso, os termos “mieloide” e “linfoide” são utilizados para caracterizar a qual linhagem pertence as células malignas envolvidas. As leucemias de células linfoides são também chamadas de linfocíticas ou linfoblásticas e podem acometer linfócitos B, linfócitos T e raramente células *natural killers* (NK). As leucemias mieloides ou mieloblásticas são aquelas em que há o acometimento de células de linhagem mieloide, como granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos), monócitos, mastócitos, hemácias e plaquetas (derivadas dos megacariócitos) (POPAT e ABRAHAM, 2011). A combinação das duas classificações permite

distinguir as leucemias nos quatro tipos mais frequentes que apresentam características particulares, porém outros critérios de diagnóstico e caracterização são utilizados atualmente e têm tornado a classificação das leucemias bem mais complexa.

Em 2008 a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma edição aprimorada da classificação das neoplasias hematopoiéticas com o objetivo de revisar informações científicas e clínicas a fim de refinar os critérios de diagnóstico e introduzir a inclusão de novas informações. Na tabela 1 encontra-se a descrição sumarizada da atual classificação das leucemias proposta pela OMS (VARDIMAN *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Sumário da classificação das leucemias segundo a revisão da OMS 2008

Leucemias Mieloides
<ul style="list-style-type: none"> • LMC, BCR-ABL1 positivo • LMC atípica, BCR-ABL1 negativo • Leucemia neutrofílica crônica • Leucemia eosinofílica crônica • Leucemia mielomonocítica crônica • Leucemia mielomonocítica juvenil • LMA com anormalidades genéticas recorrentes • LMA, não especificada • LMA com diferenciações (ex. mielomonocítica aguda e eritroide aguda) • Leucemia mieloide associada a Síndrome de Down • Leucemias agudas de linhagem ambígua
Leucemias Linfoides
<ul style="list-style-type: none"> • LLB • LLB com anormalidades genéticas recorrentes • LLT
Leucemias de linhagem ambígua
<ul style="list-style-type: none"> • LA indiferenciada • LA de fenótipo misto com translocações • LA de fenótipo misto, B/mieloide • LA de fenótipo misto, T/mieloide • Leucemias de células NK
Leucemias e outras neoplasias associadas com eosinofilia e anormalidades de <i>PDGFRA</i> ¹ , <i>PDGFRB</i> ² , ou <i>FGFR1</i> ³

Fonte: VARDIMAN *et al.* (2009)

LMC: Leucemia mieloide crônica, LMA: Leucemia mieloide aguda; LLB: Leucemia linfóide de linhagem B; LLT: Leucemia linfóide de linhagem T; LA: Leucemia aguda; *PDGFRA*: receptor A para o fator de crescimento derivado de plaquetas; *PDGFRB*: receptor B para o fator de crescimento derivado de plaquetas; *FGFR1*: receptor 1 para o fator de crescimento de fibroblastos.

1.2 Leucemia Linfoide Aguda

A leucemia linfoide aguda (LLA) é a malignidade mais comum entre crianças e adolescentes. Em torno de 30% de todas as neoplasias nesta faixa etária são leucemias e aproximadamente 76% dentre as leucemias diagnosticadas neste grupo corresponde a LLA (ACS, 2015). Na idade adulta a incidência das leucemias agudas cai para 20%, e tende a voltar a crescer após os 60 anos de idade (FARIAS e CASTRO, 2004).

A Sociedade Americana de Câncer estimou para o ano de 2015 a incidência de 6.250 novos casos de LLA entre homens e mulheres com previsão de 1.450 mortes em ambos os sexos nos EUA (ACS, 2015). No Brasil, a incidência de leucemia na infância entre 1997 a 2004 em 16 cidades representantes de todas as regiões brasileiras variou entre 24,8 a 76,8 casos por milhão de habitantes com pico de incidência aos 2 anos de idade em meninas e 3 anos em meninos (DE SOUZA REIS *et al.*, 2011).

O desenvolvimento da LLA ocorre a partir de uma série de eventos mutacionais que ocorrem durante o processo da hematopoiese (ROSE-INMAN e KUEHL, 2014). Alterações genéticas recorrentes impedem a diferenciação de precursores de linfócitos T e B direcionando a uma proliferação e sobrevivência celular aberrante. Como resultado, ocorre o acúmulo das células linfoides imaturas na medula óssea e, na maioria dos casos, também no sangue periférico (TEITELL e PANDOLFI, 2009).

Aproximadamente 80% de todos os diagnósticos da LLA são de células que expressam marcadores de superfície indicativos de precursor de linhagem B e apenas 1-2% são LLA com fenótipo típico de células B maduras. A LLA do tipo T corresponde a 15-20% dos casos e frequentemente se associa a características como idade avançada, maior frequência no sexo masculino, contagem de leucócitos elevada e doença extramedular. Para a maioria dessas características indica-se comumente uma abordagem terapêutica de maior intensidade (ESPARZA e SAKAMOTO, 2005).

A etiologia da LLA permanece desconhecida. Um conceito bem aceito é de que a leucemogênese ocorre a partir de uma complexa rede de interações entre fatores genéticos e ambientais (PUI e ONCIU, 2012). Assim, dentre os fatores ambientais, a radiação ionizante parece desempenhar um papel significativo na LLA

(BELSON *et al.*, 2007). De fato, foi identificada uma alta incidência da LLA em crianças que sobreviveram a explosão da bomba atômica lançada sobre as cidades de Hiroshima e Nagasaki durante a segunda guerra mundial. A taxa de leucemia entre sobreviventes que estavam dentro de um raio de um quilômetro da explosão da bomba foi vinte vezes maior que a taxa da população não atingida (MAHONEY *et al.*, 2004). Ademais, o efeito potencial da exposição à radiação ionizante em crianças pode também ocorrer durante o período gestacional (BELSON *et al.*, 2007). Embora dificilmente determinado, há um aumento de risco de leucemia em crianças, ainda dentro do útero, expostas a irradiação empregada na prática de diagnósticos, especialmente durante os primeiros três meses da gestação (WAKEFORD, 2009; BARTLEY *et al.*, 2010).

Outros fatores ambientais como exposição a hidrocarbonetos, especialmente benzeno, pesticidas, álcool, cigarro e drogas ilícitas durante a gestação têm sido estudados como possíveis fatores predisponentes à LLA em crianças, porém as associações permanecem incertas (BELSON *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2014). Em recente metanálise ZHOU *et al.* (2014) concluíram que mulheres gestantes expostas a solventes, tintas e derivados do petróleo durante a gravidez estão associadas a maior risco da LLA na criança, e a interrupção da exposição a esses agentes durante a gestação pode contribuir para a diminuição deste risco. Desta forma, entende-se que no início da gravidez a exposição materna a fatores potenciais causadores de leucemia podem aumentar a instabilidade genética no sistema hematopoiético durante o estágio fetal e, finalmente, resultar no desenvolvimento da leucemia infantil em seu descendente (HOWARD *et al.*, 2008).

Infecções são também apontadas como possíveis fatores de risco para LLA na infância. Embora não haja evidência de um único microrganismo ser o responsável pela transformação celular na LLA, é provável que uma ou mais infecções (viral ou bacteriana) promova uma resposta imune desregulada e favoreça o desenvolvimento da leucemia em indivíduos suscetíveis (INABA *et al.*, 2013). Outra hipótese presume que a falta de exposição às infecções na infância pode favorecer o desenvolvimento da LLA nos primeiros anos de vida. É possível que nestas crianças ocorra, posteriormente, uma resposta imune anormal frente às infecções comuns. Segundo este pressuposto, consideram-se crianças suscetíveis aquelas com baixa exposição a agentes infecciosos e que possuem um clone

persistente pré-leucêmico gerado no útero, além de possuir variável grau de suscetibilidade genética (GREAVES, 2006).

Os fatores genéticos apontados como predisponentes ao risco da LLA sustentam a ideia de que as primeiras alterações ocorrem na vida intrauterina. Dentre essas evidências, destacam-se o maior risco de desenvolvimento desta leucemia em indivíduos que possuem algumas anomalias cromossômicas constitucionais, especialmente a Síndrome de Down (BUITENKAMP *et al.*, 2014) e a concordância da doença em alguns pares de gêmeos idênticos portadores do gene de fusão *ETV6-RUNX1* (ALPAR *et al.*, 2015). Adicionalmente, alguns estudos retrospectivos analisaram manchas de sangue de neonatos que foram conservadas em papel de filtro (cartões de Guthrie) e identificaram presença de translocações no sangue de crianças que posteriormente desenvolveram LLA (GALE *et al.*, 1997; WIEMELS *et al.*, 1999).

Tendo em vista que a maioria das alterações cromossômicas e clones pré-leucêmicos surgem na vida intrauterina, durante a hematopoiese fetal, essas alterações ocorrem numa frequência maior que a incidência da LLA na população infantil, o que confirma a necessidade de eventos genéticos complementares e secundários após o nascimento. Uma consequência da necessidade de eventos secundários é a detecção da doença em diferentes idades, ou seja, existe uma variável latência pós-natal (1-15 anos) (GREAVES, 2005).

Uma infinidade de alterações genéticas somáticas ocorre na LLA. As alterações, em progenitores hematopoiéticos, incluem rearranjos cromossômicos que modificam a expressão do gene ou resultam na expressão de proteínas quiméricas, aneuploidias (alteração numérica dos cromossomos), deleções, inserções e outras mutações na sequência do DNA (GREAVES, 2002; HARRISON, 2009). Essas mutações podem ocasionar a desregulação do processo celular normal, como a via de regulação transcricional do desenvolvimento e diferenciação linfóide, a regulação do ciclo celular, a via da proteína supressora tumoral p53 e as vias de sinalização da proteína Ras, fosfatidil inositol 3-quinase e JAK-STAT (MA *et al.*, 2015).

Entre 25-30% das crianças com LLA-B, as células malignas apresentam alta hiperdiploidia (mais de 50 cromossomos) e de modo geral, esta alteração está associada a um bom prognóstico. Por outro lado, bem menos frequente que a hiperdiploidia, a hipodiploidia (menos de 44 cromossomos) ocorre em 2-3% das

crianças com LLA-B e esta se associa a um prognóstico ruim (NACHMAN *et al.*, 2007). Os mecanismos envolvidos na relação aneuploidia-prognóstico são desconhecidos, no entanto sabe-se que células com hiperdiploidia apresentam maior sensibilidade aos quimioterápicos, o que justificaria o melhor prognóstico (CARROLL, 2013).

As translocações podem ocorrer de dois modos. No primeiro, ocorre realocação dos proto-oncogenes para regiões regulatórias de genes transcritos ativamente causando a desregulação da produção de uma proteína; este tipo de alteração é observado na translocação do protooncogene *C-MYC* (t(8;14)), no qual este gene é rearranjado para o locus da cadeia pesada da imunoglobulina (IGH) no cromossomo 11q32, o que resulta na formação do rearranjo *MYC-IGH* e reflete na expressão desreguladas do gene *MYC* (FARIAS e CASTRO, 2004; HARRISON, 2009).

No segundo modo de translocação ocorre a justaposição de dois genes que codificam uma proteína quimérica com função diferente das proteínas normalmente derivadas. Dois importantes exemplos são a fusão gênica de *ETV6-RUNX1* e a t(9;22) que resulta na formação do cromossomo Filadelfia (Ph). *ETV6-RUNX*, resultante da translocação t(12;21), é a translocação mais comum em crianças com LLA e pode ser detectado em mais de 30% dos casos; esta alteração é uma das aberrações cromossômicas reconhecidas como indicativo de prognóstico favorável (RAHNEMOON *et al.*, 2013). Em contrapartida, a presença do cromossomo Ph na LLA pediátrica é rara e de mau prognóstico; em torno de 3-5% das crianças e 25-30% dos adultos com esta leucemia possuem clone maligno que expressa o cromossomo Ph (LEONI e BIONDI, 2015).

A identificação das alterações genéticas nos subtipos da LLA constituiu um marcante avanço para a compreensão e manejo da doença. Em torno de 20% das LLA-B é possível detectar alterações genéticas que resultam na atividade de sinalização de quinases, o que tem permitido especificar o tratamento dos pacientes com inibidores de tirosina-quinase. Quanto as LLA mais agressivas de linhagem T, o sequenciamento do genoma tem identificado novos alvos de mutações, incluindo tirosina-quinases, reguladores epigenéticos e reguladores hematopoiético, como o *ETV6-RUNX1* (MULLIGHAN, 2012).

As anormalidades cromossômicas são frequentemente associadas a painéis imunofenotípicos que adicionam informações quanto a presença de proteínas características de determinados tipos celulares e são considerados os mais importantes parâmetros para a classificação das leucemias. Associado às apresentações clínicas e, como já mencionado, as alterações citogenéticas, tornam possível a classificação mais detalhada do subtipo de LLA e permitem estratificar os pacientes em diferentes grupos de risco, afim de determinar o prognóstico e definir o tratamento mais adequado (FARIAS e CASTRO, 2004; MULLIGHAN, 2012).

Diferentes sistemas têm sido utilizados para classificar a LLA em subtipos. O grupo Franco-Américo-Britânico (FAB) (BENNETT *et al.*, 1976), a OMS (HARRIS *et al.*, 1999) e o Grupo Europeu de Classificação Imunológica das Leucemias (EGIL) (BENE *et al.*, 1995) são as três entidades internacionais que propõem modelos de subclassificação da LLA. Embora algum critério seja mais ou menos utilizado, até o momento, não há nenhum consenso que priorize um único padrão de classificação.

Descrita na década de 70, a classificação proposta pelo grupo FAB distingue a LLA apenas com base nos critérios morfológicos das células obtidas a partir da medula óssea e do sangue periférico. Deste modo, a LLA é classificada nos subtipos L1, L2 e L3 a partir de características blásticas, como o diâmetro celular, formato do núcleo, presença de nucléolo, volume citoplasmático, basofilia do citoplasma, variações de vacúolos citoplasmáticos e relação núcleo/citoplasma (FARIAS e CASTRO, 2004; ABDUL-HAMID, 2011).

O subtipo L1 caracteriza-se por apresentar células predominantemente pequenas e homogêneas, citoplasma escasso, ligeira basofilia e alta relação núcleo/citoplasma. No subtipo L2 as células blásticas apresentam-se grandes e heterogêneas, citoplasma moderadamente abundante, ligeira basofilia e cromatina nuclear frouxa com nucléolos visíveis. O subtipo L3 é diferenciado pela presença de células grandes e homogêneas, citoplasma com presença de vacúolos e intensa basofilia, o núcleo apresenta-se com cromatina frouxa e com nucléolo proeminente. (BENNETT *et al.*, 1976).

A frequência dos subtipos de LLA é variável na população adulta e infantil. O subtipo L1 apresenta maior frequência em crianças (76 – 89%) que em adultos (31 – 43%). O subtipo L2 ocorre predominantemente em adultos (49 – 60%) que em crianças (14 – 22%) e o subtipo L3 é frequentemente mais diagnosticado em

crianças, embora seja raramente detectado (BENNETT *et al.*, 1976; PLASSCHAERT *et al.*, 2004).

A classificação proposta pelo EGIL (tabela 2) estabelece o agrupamento das leucemias agudas apenas com base na imunofenotipagem (BENE *et al.*, 1995). A metodologia de análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo possibilita a identificação de antígenos de superfície, intracitoplasmáticos e nucleares utilizando-se de anticorpos monoclonais específicos, deste modo, é possível caracterizar a origem e o grau de diferenciação das células neoplásicas (ZAGO *et al.*, 2013).

Tabela 2 - Classificação imunofenotípica das LLA segundo o EGIL

Classificação	Imunofenótipo	Frequência	
LLA de linhagem B	(HLADR, CD19 ⁺ e/ou CD79a ⁺ e/ou CD22 ⁺ ,	Adultos	Crianças
BI (Pró-B)	TdT ⁺	11%	5-9%
BII (B comum)	TdT ⁺ , CD10 ⁺	49%	53-65%
BIII (pré-B)	TdT ⁺ , IgM ⁺ citoplasmático	12%	14-20%
BIV (B madura)	Ig(citoplasma ou superfície), TdT ⁻ e CD34 ⁻	2-4%	2-3%
LLA de linha T	CD3 ⁺ (citoplasma/superfície) CD34 ⁺ , CD3 ⁺	25%	11-16%
TI (Pró T)	CD7 ⁺		
TII (pré T)	CD2 ⁺ e/ou CD5 ⁺ e/ou CD8 ⁺		
TIII (T cortical ou tímica)	CD1a ⁺		
TIV (T madura)	CD3 ⁺ (superfície), CD1a(-)		

Fonte: Adaptado (ABDUL-HAMID, 2011; ZAGO *et al.*, 2013)

Segundo critérios do EGIL, para a caracterização das leucemias o limite mínimo de 20% deve ser referenciado para definir uma reação positiva de células blásticas para determinado anticorpo monoclonal, exceto mieloperoxidase (MPO), CD3, CD79a e enzima nuclear deoxinucleotidil transferase terminal (TdT), que são considerados positivos no nível de expressão de 10%. Por meio destes marcadores, tornou-se possível identificar que em torno de 75-80% dos casos de LLA em adultos são da linhagem de células B e 20-25% pertencem a linhagem T (CHIARETTI *et al.*, 2014). Em crianças, em torno de 80-85% das LLA são provenientes de células B, e entre 15-20% são de origem de células T (ACS, 2015).

Proposta nos anos noventa e atualizada em 2008, a classificação segundo a OMS estratifica as leucemias a partir de características que abrangem o estudo da

morfologia celular, da imunofenotipagem e dos detalhes citogenéticos e genéticos. As LLA são classificadas juntamente com os linfomas linfocíticos na categoria de neoplasias de linhagem B ou T, deste modo denomina-se leucemia/linfoma linfoblástico B ou T (VARDIMAN *et al.*, 2009), como demonstrado na tabela 3.

TABELA 3 - Classificação das leucemias agudas/linfomas linfoblástico B e T segundo a OMS

Leucemia/linfoma linfoblástico B

Leucemia/linfoma linfoblástico B, sem anormalidade genética especificada
 Leucemia/linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes
 Leucemia linfoblástico B com t(12;21)(p13;q22) *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*
 Leucemia/linfoma linfoblástico B /linfoma linfoblástico B com
 t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL 1*
 Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(11q23); rearranjo *MLL*
 Leucemia/linfoma com hiperdiploidia
 Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia
 Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(5;14)(q31;q32) *IL3-IGH*
 Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*

Leucemia/Linfoma Linfoblástico T

FONTE: VARDIMAN *et al.* (2009)

Na LLA do tipo B, a ocorrência de anormalidades genéticas está associada a particulares características clínicas, imunofenotípicas e de prognóstico; o que justifica categorizá-las em grupos distintos. Em contrapartida, na LLA do tipo T essas anormalidades não são claramente associadas a uma única característica biológica, portanto, a classificação segundo a OMS não subdivide as LLA-T conforme as características de alterações genéticas (VARDIMAN *et al.*, 2009).

As subclassificações da LLA permitem identificar o prognóstico mais preciso dos pacientes e delinear um esquema terapêutico direcionado para cada subtipo específico, definindo-se a intensidade e a duração do tratamento. A aplicação da terapia adaptada ao risco é apontada como a grande responsável para a melhora clínica dos pacientes e associada à melhora da abordagem dos cuidados de suporte tem resultado numa taxa de remissão completa de mais de 90% em crianças. Nos adultos essa evolução tem seguido a mesma tendência com uma sobrevida de cerca de 40% (USVASALO *et al.*, 2010; HOFFBRAND e MOSS, 2013).

1.4 Fases do tratamento e classificação de risco da LLA

De modo geral, o tratamento para LLA consiste em três fases, a fase de indução, intensificação (ou consolidação) e manutenção. A primeira fase tem como principal objetivo a indução da completa remissão e o restabelecimento da hematopoiese normal, assim, espera-se levar o paciente a um estado de remissão com menos de 5% de blastos na medula óssea, com hemograma normal e ausência de qualquer sinal ou sintoma da doença. O regime terapêutico inclui tipicamente glicocorticoide (prednisona), vincristina, L-asparaginase e Daunorrubicina. Quando esta fase é completada, os pacientes ainda apresentam graus variados de leucemia residual e alguns podem portar até 10 bilhões de células leucêmicas (PUI e CAMPANA, 2000; CAZÉ, M. O. *et al.*, 2010).

Os pacientes se tornam candidatos à terapia de intensificação quando é possível determinar o restabelecimento da hematopoiese normal. Nesta fase, administram-se altas doses de agentes quimioterápicos, muito próximas do limite de tolerância. Algumas drogas comumente usadas em crianças incluem metotrexato, L-asparaginase, ciclofosfamida e citarabina. O objetivo é diminuir o número de células tumorais a níveis muito baixos, ou eliminá-las (LICHTMAN *et al.*, 2011). A fase final do tratamento da LLA, perdura, em geral, por 2 anos e se baseia principalmente de doses diárias de mercaptopurina e doses semanais de metotrexato. Nesta fase de manutenção da quimioterapia adicional, o objetivo é eliminar resíduos de células leucêmicas que, apesar de não interferirem no desenvolvimento das células sanguíneas normais, têm o potencial de recidivar a doença (INABA *et al.*, 2013). A identificação dos pacientes com maiores chances de recidiva permite o fornecimento de cuidados adicionais e aumenta a chance de recuperação.

O Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância (GBTLI), atualizado em 2001 (INCA, 2001b), toma como base parâmetros hematológicos e a resposta terapêutica do paciente para classificar o risco de recidiva da LLA (Tabela 4). Deste modo, é possível estabelecer um protocolo de tratamento diferenciado para cada grupo de risco. Segundo o protocolo do GBTLI, os pacientes classificados como de baixo risco que vierem a apresentar requisitos para inclusão no grupo de alto risco devem ser reclassificados (CAZÉ, M. A. *et al.*, 2010).

Tabela 4 - Classificação de risco de recidiva

	Baixo Risco	Alto Risco
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 leucêmico

Fonte: (INCA, 2001b)

*Respondedores lentos ao tratamento; SNC: Sistema Nervoso Central

Em síntese, dada a complexidade da LLA, desde a patogênese até o estabelecimento do diagnóstico e tratamento, diversos fatores intrínsecos ao paciente podem exercer influências significativas no curso da doença. Como observado em outras malignidades, as quimiocinas têm um papel marcante na LLA e o estudo dessas proteínas podem trazer contribuições para o estabelecimento de novas abordagens de diagnóstico e de tratamento.

1.5 Quimiocinas e receptores de quimiocinas

As quimiocinas compõem uma família de citocinas, caracterizadas pela função de atuar como moléculas quimioatraentes. Essas moléculas são proteínas solúveis com peso molecular que varia de 8 a 12kD e são compostas de aproximadamente 70 a 80 aminoácidos. Os leucócitos e as células de tecidos são o local de síntese dessas citocinas, que ocorre tanto de modo constitutivo quanto sob estímulos de indução (BAZAN *et al.*, 1997; ALLEN *et al.*, 2007).

Os receptores de quimiocinas são expressos em todos os leucócitos de modo heterogêneo e estão divididos em dois grupos: receptores de quimiocinas acoplados à proteína G, que atuam na transdução de sinais por meio de proteínas

heterodiméricas (proteína G), e receptores de quimiocinas atípicos, que parecem remover as quimiocinas e contribuem para o controle da inflamação de modo independente da proteína G (GRIFFITH *et al.*, 2014; CORBISIER *et al.*, 2015).

Até o momento, são conhecidas cerca de 50 quimiocinas humanas, 20 receptores pertencentes à superfamília de receptores acoplados à proteína G e 5 receptores atípicos (GRIFFITH *et al.*, 2014; LIANG, 2015). Sabe-se que a maioria dos receptores é capaz de reconhecer mais de uma quimiocina e muitas quimiocinas podem se ligar a mais de um receptor (BAZAN *et al.*, 1997).

Quanto aos receptores acoplados à proteína G, a interação quimiocina-receptor ativa muitas vias de transdução de sinais intracelulares, dependendo da função e da subunidade das proteínas efetoras ativadas. A ativação dessas vias pode promover a transcrição de genes e a polarização e quimiotaxia das células (GUERREIRO *et al.*, 2011).

Por muitos anos, tem sido adotada uma nomenclatura sistemática de acordo com o arranjo dos resíduos de cisteína, próximo a região N terminal para denominar as quimiocinas e seus receptores. Assim, eles são divididos em quatro subclasses: C, CC, CXC e CX3C, onde C representa cisteína e X ou X3 referem-se ao número de resíduos de aminoácidos variáveis que separam essas cisteínas (CHARO e RANSOHOFF, 2006). O nome dos receptores e das quimiocinas (ligantes) são ainda seguidos respectivamente pela letra R ou L. No ano 2000, foi introduzido no sistema de nomenclatura um número que complementa a identificação de cada receptor e de cada ligante (ALLEN *et al.*, 2007). Por exemplo, a nomenclatura CXCR4 refere-se ao receptor de quimiocina da subfamília CXC, número 4. Os subgrupos de quimiocinas podem ser também representados pelas letras gregas α , β , γ e δ , o que corresponde respectivamente as subclasses CXC, CC, C e CX3C (ROSSI e ZLOTNIK, 2000).

Inicialmente reconhecidas por atuarem no processo inflamatório e no recrutando de leucócitos, o estudo da família das quimiocinas e seus receptores levou ao conhecimento de outras funções importantes dessas proteínas, como o desenvolvimento embrionário, atuação na hematopoiese, angiogênese, desenvolvimento de linfócitos, maturação de células, direcionamento do movimento de células mononucleares através do sangue e contribuição para a patogênese de várias doenças, como crescimento tumoral e processo metastático (CHARO e RANSOHOFF, 2006).

1.5.1 Quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4

Inicialmente denominada fator estimulador de crescimento de células B (*Pre-B-cell growth-stimulating factor*, PBSF) ou fator derivado de células estromais-1 (*stromal cell-derived factor-1*, SDF1), a quimiocina CXCL12, agora formalmente denominada, é um membro da subfamília de quimiocinas C-X-C (NAGASAWA *et al.*, 1996). Esta quimiocina é constitutivamente produzida na medula óssea por osteoblastos imaturos e células endoteliais, bem como por células epiteliais em diversos tipos de tecidos, onde atua como potente quimioatraente para células hematopoiéticas maduras e imaturas (WRIGHT *et al.*, 2005; DOMMANGE F. *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2010).

Seis isoformas de CXCL12, derivadas de *splicing* alternativo, têm sido identificadas em humanos: CXCL12 α (alfa), CXCL12 β (beta), CXCL12 γ (gama), CXCL12 δ (delta), CXCL12 ϵ (épsilon) e CXCL12 ϕ (phi). Dentre essas isoformas, CXCL12 α e CXCL12 β são os subtipos mais estudados. Embora derivados de um mesmo gene, o RNAm de CXCL12 α é transcrito numa proteína de 89 aminoácidos, enquanto o RNAm do subtipo β origina uma proteína com 93 aminoácidos (YU *et al.*, 2006). CXCL12 α é a principal isoforma secretada pelas células da medula óssea e células endoteliais e é encontrada em quase todos os órgãos; esta isoforma encontra-se aumentada no dano tecidual, porém é rapidamente degradada no sangue. Em contrapartida, a isoforma β é mais resistente à degradação na circulação e está presente em órgãos ricamente vascularizados, como fígado, baço e rins (JANOWSKI, 2009).

Tanto CXCL12 α quanto CXCL12 β possuem afinidade comparável ao receptor CXCR4. Este receptor encontra-se altamente expresso em células de progenitores hematopoiéticos na medula óssea e também na superfície de monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos B e T. O CXCR4 é também detectado nas células do endotélio vascular e de órgãos como cérebro, pulmão, e muitos outros (RATAJCZAK *et al.*, 2006). Estudos com animais *knockout* têm estabelecido a importante função de CXCL12 e CXCR4 na embriogênese. Animais *knockout* para CXCR4 e seu ligante apresentam comprometimento significativo na colonização da medula óssea embrionária por células pluripotentes, além de apresentarem alterações no desenvolvimento do coração, cérebro e grandes vasos. Como

resultado, essa deficiência é letal para os animais, que morrem ainda no útero (TACHIBANA *et al.*, 1998; ZOU *et al.*, 1998; LAZARINI *et al.*, 2003).

O CXCR4 (CD184) é um receptor de superfície celular com sete domínios transmembrana, composto por 352 aminoácidos e é membro da grande família dos receptores acoplados à proteína G (BUSILLO e BENOVIC, 2007). A interação CXCL12/CXCR4 ativa sinais intracelulares incluindo a mobilização de cálcio e a ativação de quinases (ERK1/2) que são reguladas por sinais extracelulares via p44/p42; e como resultado final, desencadeia à quimiotaxia celular (ROLAND *et al.*, 2003).

Há poucos anos acreditava-se que a interação CXCL12/CXCR4 era exclusiva, até que outro receptor, CXCR7, foi descrito com uma forte afinidade à CXCL12 (BALABANIAN *et al.*, 2005). A ausência de CXCR7 em animais *knockouts* é também letal para o embrião, porém, diferente do que ocorre na deficiência de CXCR4, não foi observado nenhum comprometimento no sistema de células hematopoiética fetal (SIERRO *et al.*, 2007). Apesar da identificação deste novo receptor, a importância da interação CXCR4/CXCL12 no *homing*, mobilização e estabelecimento do microambiente da medula óssea permanece evidente (GEORGIU *et al.*, 2010).

Além da regulação do tráfego de células hematopoiéticas, o eixo CXCL12/CXCR4 está associado à patogênese de malignidades como o câncer de mama (BOIMEL *et al.*, 2012) câncer de pâncreas (WU *et al.*, 2013), câncer de próstata (SINGH *et al.*, 2004) e também em malignidades hematológicas como as leucemias (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; PELED e TAVOR, 2013). SPOO *et al.* (2007) descreveram CXCR4 como marcador prognóstico na leucemia mieloide aguda (LMA); baixa expressão de CXCR4 em células da medula óssea de pacientes com LMA foi associado ao melhor prognóstico. Deste modo, o eixo CXCL12/CXCR4 é considerado um dos estímulos chaves envolvidos na interação entre células leucêmicas e seu microambiente estromal (GIL *et al.*, 2013).

A expressão de CXCR4 em células malignas indica que a via CXCL12/CXCR4 pode influenciar na biologia do câncer e exercer um papel fundamental no direcionamento de metástase de células tumorais CXCR4+ em direção a órgãos que expressam CXCL12. Assim, células tumorais CXCR4+ tendem a metastatizar para órgãos como ossos e nódulos linfáticos de modo CXCL12-dependente (TEICHER e FRICKER, 2010).

Além de atuar no processo de metástase, o complexo CXCL12/CXCR4 promove a progressão do tumor por estimular a sobrevivência e o crescimento das células neoplásicas de modo parácrino (GIL *et al.*, 2013), favorece a angiogênese tumoral por sua capacidade de recrutar da circulação células progenitoras endoteliais para o estroma tumoral (ORIMO *et al.*, 2005) e ainda atrai células T regulatórias para o meio neoplásico (GIL *et al.*, 2013).

YAN *et al.* (2011) demonstraram que o recrutamento de células Tregs no câncer de mama é mediado pelos níveis de CXCL12 no ambiente tumoral e pelo aumento da expressão de CXCR4 nas células regulatórias sob condição de hipóxia. A presença das células Tregs neste meio contribui para supressão da resposta imune antitumoral. Nos últimos anos, alguns estudos têm também demonstrado alta porcentagem de Tregs em malignidades hematológicas, incluindo a LLA (KELLEY e PARKER, 2010; MOON *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2012).

1.5.2 Participação da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 na LLA

Em condições normais, as citocinas e os fatores de crescimento fornecem às células hematopoiéticas estímulos essenciais para a manutenção da proliferação, sobrevivência, diferenciação, auto-renovação e ativação funcional das células. Sob condições patológicas como, por exemplo, nas leucemias, as vias das citocinas e dos fatores de crescimento sinalizam de forma aberrante e são parte crítica do perfil de malignidade das células leucêmicas (VAN ETTEN, 2007).

Na LLA, as células malignas CXCR4⁺ são atraídas para nichos com maior concentração de CXCL12, deste modo, o estroma medular pode funcionar como um “esconderijo protetor” para as células malignas resistirem à morte induzida pela quimioterapia (SISON e BROWN, 2011). Por exemplo, o quimioterápico asparaginase, utilizado na terapêutica da LLA pediátrica, atua na degradação de asparagina, um aminoácido endógeno necessário para a função de algumas células neoplásicas, como os linfoblastos que, diferente da maioria das células normais, são incapazes de buscar fontes alternativas de asparagina. Neste caso, a depleção de asparagina do plasma resulta na inibição da síntese de DNA e RNA com subsequente apoptose das células blásticas (PIATKOWSKA-JAKUBAS *et al.*, 2008). IWAMOTO *et al.* (2007) demonstraram que células malignas de LLA cultivadas em co-cultura com células do estroma da medula óssea, na presença de asparaginase,

são protegidas da apoptose devido a alta expressão de asparagina sintetase pelas células estromais que podem disponibilizar o aminoácido essencial. Deste modo, este é, possivelmente, um dos mecanismos relacionados à resistência a este quimioterápico.

Tendo em vista que o nicho medular pode ser potencial refúgio para as células leucêmicas, é evidente que a interação CXCL12 com seu receptor CXCR4 detêm importante papel na retenção de células leucêmicas neste meio. Por outro lado, apesar de alguns trabalhos reportarem que a expressão de CXCL12 encontra-se aumentada em regiões de hipóxia, como ocorre na medula óssea com o aumento de células leucêmicas (HITCHON *et al.*, 2002; CERADINI *et al.*, 2004), VAN DEN BERK *et al.* (2014) encontraram uma significativa diminuição de CXCL12 no meio intramedular de pacientes com LLA recém diagnosticados comparados com pacientes em remissão e indivíduos controle não leucêmicos. Foi ainda observado, que essa diminuição não é explicada pelo consumo de CXCL12 pelas células leucêmicas, e nem pela capacidade alterada das células do estroma mesenquimal produzir a quimiocina no momento do diagnóstico. Ao invés disso, observou-se que as células malignas, presentes na medula óssea, são capazes de afetar negativamente a produção de CXCL12 pelas células do estroma mesenquimal.

Infiltrados extramedulares de células leucêmicas são complicadores da LLA e são reconhecidos como indicativos de prognóstico ruim. Embora o envolvimento do sistema nervoso central (SNC) seja identificado no momento do diagnóstico em menos de 5% das crianças com LLA, na ausência de tratamento adequado 50 – 75% desses pacientes apresentariam recaída no SNC (ESTEY *et al.*, 2008). Evidências suportam o papel chave de CXCL12 em várias funções do SNC. Além do envolvimento na migração de precursores neuronais na fase de desenvolvimento, no SNC maduro, a sinalização CXCL12/CXCR4 modula a neurotransmissão, neurotoxicidade e a interação neuroglial (LI e RANSOHOFF, 2008). Assim, além da manutenção da homeostasia do SNC, os níveis de CXCL12 tornam este sistema, bem como outros sistemas e órgãos, vulnerável a invasão de células blásticas malignas na LLA.

Um estudo conduzido por CRAZZOLARA *et al.* (2001) comprovou que linfoblastos de crianças com LLA-B com alta expressão do receptor CXCR4 demonstraram maior propensão de infiltração de células leucêmicas no fígado ou baço comparado com casos que apresentavam baixa expressão do receptor. A alta

expressão de CXCR4 foi fortemente preditiva de envolvimento de órgão extramedular, independente da contagem de linfoblastos no sangue periférico. Em concordância a este achado, VAN DEN BERK *et al.* (2014) relataram, recentemente, uma maior expressão do receptor CXCR4 em LLA de células B precursoras (LLA-pré B) comparado com células hematopoiéticas mononucleares normais. A alta expressão de CXCR4 foi correlacionada ao aumento do risco de recidiva e pior prognóstico entre pacientes com LLA pré-B.

Além da ação quimiotática, ensaios *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado o papel de CXCL12/CXCR4 na proliferação celular (KATO *et al.*, 2011; SHEN *et al.*, 2013). A partir de um modelo de leucemia induzida em ratos, KATO *et al.* (2011) identificaram a capacidade de células leucêmicas, provenientes do fígados de animais doentes, se proliferarem, *in vitro*, sob a adição de CXCL12 ao meio. Contrariamente, na adição de Plerixafor, um antagonista de CXCR4, não foi observado aumento significativo na proliferação das células. Em suma os autores sugeriram que a doença extramedular leucêmica não é devida apenas a migração celular, mas também à proliferação de células malignas em nichos extramedulares com a participação de CXCL12.

A interação CXCL12/CXCR4 ainda contribui para a angiogênese por induzir a secreção de VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) sintetizado por células endoteliais CXCR4⁺. Em contrapartida, VEGF induz a expressão de CXCR4 e aumenta a produção de CXCL12 pelas células endoteliais, estabelecendo um *feedback*-positivo. A ativação deste eixo, leva também ao aumento da expressão de prostaciclina, um outro sinal angiogênico produzido pelas células do endotélio (SALCEDO e OPPENHEIM, 2003). Um estudo que comparou biópsia de medula óssea de crianças com LLA e crianças controle (sem nenhum comprometimento medular) identificou, na medula óssea leucêmica, um padrão microvascular com aumento da densidade de microvasos (PEREZ-ATAYDE *et al.*, 1997). Assim, a expressão constitutiva de CXCL12 pelas células endoteliais em conjunto com a expressão de CXCR4 sugere que esta interação, quimiocina-receptor, pode contribuir para a manutenção do endotélio, além de induzir a angiogênese, que é um possível mecanismo de favorecimento da sobrevivência de células malignas na medula óssea (SALCEDO e OPPENHEIM, 2003; SISON e BROWN, 2011).

Considerando o papel do eixo CXCL12/CXCR4 na LLA e em outras malignidades, estudos de associação genética têm investigado o efeito de

polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polimorphism* - SNP) na patogênese e progressão de algumas neoplasias. A presença de determinados SNPs nos genes *CXCL12* e *CXCR4* podem modular a expressão dessas proteínas, e assim, contribuir na variabilidade individual e na suscetibilidade e prognóstico da LLA.

O gene que codifica *CXCL12* apresenta uma variação polimórfica que leva a troca de uma guanina por uma adenina na posição 801 na região 3'UTR (3'-*untranslated region*) do *splice* variante β . Alguns trabalhos têm demonstrado o aumento da expressão de *CXCL12*, em nível de RNAm e proteína, em indivíduos portadores do alelo A ou do genótipo A/A, o que reforça a propriedade deste polimorfismo em regular a expressão de *CXCL12* (TSAI *et al.*, 2009; GU *et al.*, 2014). Analisando este mesmo polimorfismo, PERIM *et al.* (2013) verificaram uma associação positiva com a suscetibilidade a LLA infantil em indivíduos portadores do alelo mutante.

Em relação ao receptor *CXCR4*, a análise da sequência de DNA revelou um polimorfismo silencioso, onde ocorre a troca de uma citosina para uma timina no códon 138, no exon 2. Alguns trabalhos revelaram associação de risco deste polimorfismo para neoplasias como o câncer oral (TENG *et al.*, 2009), carcinoma de pulmão de células não pequenas (LEE *et al.*, 2011) e carcinoma de célula renal (CAI *et al.*, 2013). Em contrapartida, CROWTHER-SWANPEOEL *et al.* (2009) não encontraram evidência de que a variação no códon 138 pode afetar o risco de desenvolvimento da leucemia linfóide crônica. Além disso, até o momento, não é conhecido como este polimorfismo pode regular a expressão do receptor.

Finalmente, todos os estudos baseados no eixo *CXCL12/CXCR4* têm trazido importantes contribuições para a compreensão da complexa fisiologia da LLA e têm tornado possível o desenvolvimento de drogas capazes de interferir na regulação do eixo. Os estudos de polimorfismo genético unem-se a outras linhas de pesquisa na busca de uma melhor compreensão da LLA e reforçam a necessidade do olhar individualizado a cada paciente. Apesar de possuírem um mesmo diagnóstico, pela análise de variantes fenotípica e genética, estes pacientes devem manifestar diferentes evoluções e prognóstico da LLA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os polimorfismos rs1801157 do gene *CXCL12* e rs2228014 do gene *CXCR4*, e os níveis plasmáticos de CXCL12 em relação à suscetibilidade e o prognóstico de pacientes infantojuvenis com leucemia linfoblástica aguda.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar as frequências dos polimorfismos genéticos rs1801157 do gene *CXCL12* e rs2228014 do gene *CXCR4* em pacientes com LLA e em indivíduos controle livres de neoplasias;
- Avaliar possíveis associações entre a presença das variantes genéticas entre os dois grupos e o risco de suscetibilidade à doença num estudo do tipo caso-controle;
- Correlacionar a presença dos polimorfismos em pacientes com LLA com o risco de recidiva e o risco de óbito;
- Determinar os níveis plasmáticos de CXCL12 β em pacientes com LLA e grupo controle;
- Estabelecer relação entre a presença do polimorfismo do *CXCL12* com os níveis plasmáticos da quimiocina nos grupos caso e controle;
- Correlacionar os níveis plasmáticos de CXCL12 nos pacientes com LLA em diferentes fases clínicas (diagnóstico, tratamento e remissão).

3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

TITLE: GENETIC POLYMORPHISMS OF CXCL12 AND CXCR4 AND INFLUENCE ON PLASMA LEVELS IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CHILDHOOD PATIENTS

RUNNING TITLE: GENETIC POLYMORPHISM AND CXCL12 PLASMA LEVELS IN LEUKEMIA PATIENTS

ABSTRACT:

PURPOSE: Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) represents more than 80% of leukemia cases in children between 0-14 years. Pathogenesis of ALL involves alterations in regulatory processes of normal hematopoiesis, which is strictly controlled by chemokines and their receptors. CXCL12/CXCR4 interactions play an essential role in the hematopoiesis process and leukemia. In fact, altered CXCL12 and CXCR4 expressions may be determined by genetic polymorphisms and should affect ALL susceptibility and/or prognosis. **METHODS:** This study reports the *CXCL12* (rs1801157, G/A) and *CXCR4* polymorphisms (rs2228014, C/T) in 94 patients and 137 control individuals. Furthermore, CXCL12 plasma levels were determined by ELISA, and correlated with genotypes and therapeutic phase of ALL. **RESULTS:** There were no associations between rs1801157 and rs2228014 with ALL susceptibility or risk of relapse; however, a strong association of *CXCL12* polymorphism with risk of death was observed in individuals with AA genotype compared with other genotypes ($p=0.014$). Chemokine plasma levels did not show significant differences between patients and control group, risk of relapse or clinical stage. Although no differences were observed for CXCR4 polymorphism, a significant increase of CXCL12 was noted in patients ($p=0.004$) and controls ($p=0.04$) carrying A allele. **CONCLUSION:** This study suggests that variations in *CXCL12* gene could change its expression, and it indicates a possible involvement of *CXCL12* polymorphism in the risk of death in ALL patients.

KEYWORDS: ALL, Polymorphism, CXCL12, CXCR4, Risk of death.

INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the leading children-related cancer in industrialized countries and accounts for 26% of cancers diagnosed among children between the ages of 0 and 14 years (FERLAY J, 2015). ALL is a heterogeneous disease, with regard to genetic changes, treatment response and prognosis (PUI *et al.*, 2002; CASTOR *et al.*, 2005). Although overall survival of childhood ALL patients after chemotherapy has improved over the years, reaching 80% cure rates, an attempt to improve diagnosis and efficacy of current therapeutic protocols has been proposed.

One of the core basis involved in ALL pathogenesis and related to leukemic transformation of hematopoietic stem cells is concerned to alterations in key regulatory processes, subverting the controls of normal proliferation, blocking differentiation and promoting resistance to death signals (PUI, 2004; PUI *et al.*, 2004). In particular, chemokines and their receptors are crucial players in the nesting of hematopoietic progenitors within the bone marrow (BM). Considering the homing process, the stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 or CXCL12), in its relation to the receptor CXCR4, could be considered as the flagship chemokine (LATAILLADE *et al.*, 2004).

The CXCL12/CXCR4 axis mediates leukemic cells mobilization to extramedullary infiltration in addition to migration to specific CXCL12-positive vascular niches in the BM (BURGER e KIPPS, 2006; VAN DEN BERK *et al.*, 2014). In fact, it has been shown that BM from B-ALL pediatric patients, at the time of diagnosis, expresses lower CXCL12 levels compared to non-leukemic controls. Moreover, CXCR4 receptor was significantly increased and correlated with an unfavorable clinical outcome (VAN DEN BERK *et al.*, 2014).

Likewise, recent evidences showed that CXCL12–CXCR4 stromal signaling is required for T-ALL initiation and maintenance (AACR, 2015). In addition, enhanced cell survival and chemotherapy protection of T-ALL cells (LIOU *et al.*, 2014). These findings indicated the crucial involvement of activated CXCL12/CXCR4 axis in homing, and therefore, chemoprotection of leukemic cells to the BM niche, suggesting an intriguing and promising setting for ALL therapy protocols.

It is known that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *CXCL12* or *CXCR4* genes may modulate its expression, and then, their capacity to contribute to individual variations in ALL susceptibility and prognosis. *CXCL12* coding gene is located on chromosome 10q11.1,

and a common variant revealed a G /A transition at position 801 in the 3'-untranslated region of its β transcriptional splice variant, which has been suggested to involve an up-regulation of CXCL12 protein available to bind CXCR4 (WINKLER *et al.*, 1998; GU *et al.*, 2014). Meanwhile, DNA sequence analysis of *CXCR4* has revealed a silent SNP, a change of cytosine to thymine (C/T) at codon 138, which was investigated in HIV-1 subjects (MARTIN *et al.*, 1998), oral cancer (TENG *et al.*, 2009) and endometrial carcinoma (CACINA *et al.*, 2012).

Taken together, the effect of genetic polymorphisms of *CXCL12* and *CXCR4* in ALL may affect both key genes involved in BM homing and peripheral distribution of leukemic cells, and may influence ALL clinical outcome. Therefore, the relationship between SNPs of *CXCL12* as well as *CXCR4* genes and ALL risk was investigated in this study. Moreover, we investigated the correlations of CXCL12 plasma levels with genetic polymorphism and the stage of therapy in ALL childhood patients.

METHODS

Individuals and methods

Peripheral blood (5 mL) was collected from 94 patients (53 males and 41 females) with diagnosis for ALL attended in the Londrina Cancer Hospital (LCH) and University Hospital (UH) of State University of Londrina, Paraná, Brazil. Patients' diagnoses were based on the guidelines from the division of Hematology/Oncology of UH and LCH; risk of relapse was classified based on GBTLI Protocol (Brazilian Group of Childhood Leukemia Treatment Protocol – 2009). At the same time, blood samples of 137 individuals (61 males and 76 females) without cancer or inflammatory diseases (based on hematological, biochemical and serological tests) were collected and included as control group. People involved in this study were predominately of European descent (Caucasian) with age ranging from 3 months to 20 years old. The study was approved by Human Ethics Committee of the State University of Londrina, Londrina, Parana, Brazil (CAAE N° 0164.0.268.000-09). Informed consent was obtained from all individuals (parents) participants included in the study.

Polymorphisms analysis

Genomic DNA was extracted from 200µL peripheral blood cells using the Biopur kit (BiometrixDiagnosticaLtda, Curitiba, Brazil) according to the manufacturer's protocol, and stored at -20°C until genotyping.

The *CXCL12* (rs1801157, G/A) and *CXCR4* (rs2228014, C/T) polymorphisms were identified by the polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) assay. PCR reaction for rs1801157 was performed in a final volume of 25µL using 1X PCR buffer, dNTP (0.1mM), 0.2µM each primer sense 5'-CAGTCAACCTGGGCAAAGCC-3' and primer antisense 5'CCTGAGAGTCCTTTTGCGG-3', MgCl₂ (1.5mM), Taq polymerase (1.25U - Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) and 100ng of genomic DNA. The PCR conditions were: 5min denaturation at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C, and 10min elongation at 72°C.

The genotyping of rs2228014 *CXCR4* polymorphism were performed using forward 5' AACTTCCTATGCAAGGCAGT 3' and reverse 5' TATCTGTTCATCTGCCTCACT 3' primers. The reaction contained 1X PCR buffer, dNTP (0.1mM), 0.2µM each primer, MgCl₂ (1.5mM), Taq polymerase (0.75U Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) and 100ng of genomic DNA. The PCR conditions were: 5min denaturation at 94°C, 40 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C, and 20min for final elongation at 72°C.

Both PCR reactions were performed in a thermocycler (Gradient Thermal cyclers A200, Zhejiang, China). Amplicons containing polymorphic region were then digested with restriction enzymes *MspI* (Promega, Madison, WI, USA) for 3h at 37°C to *CXCL12* polymorphism, and *Bcc I* (BioLabs, New England) for 2h at 37°C to *CXCR4*. Genotyping was determined by electrophoresis on 10% acrylamide gel, visualized using silver staining method.

Detection of plasma CXCL12-1β levels

The determination of CXCL12-1β was performed using plasma obtained from EDTA-anticoagulated blood samples of patients and control groups by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with Human SDF-1 beta ELISA kit (RayBiotech Inc., Norcross, U.S.A.). Data were analyzed using the analytical curve-fitting software Gen5 (Bio Tek, Winooski, U.S.A.) and results were expressed in pg/ml. All determinations were done in duplicate following the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

Sample size calculation for unmatched case-control studies was performed before the selection, based on the normal approximation to the binomial distribution (SCHLESSELMAN e STOLLEY, 1982). Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium was determined using chi-square test (χ^2). The association study for risk of ALL development and clinical outcome was calculated by Odds ratio (OR) at 95% confidence interval (CI) and *Fisher's* exact test. Plasma CXCL12-1 β levels were compared by univariate analyses using *t* tests (*Mann-Whitney* U test). Data were analyzed using GraphPad Prism 6.0; $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

CXCL12 and CXCR4 Polymorphism

Genotypic distributions of *CXCL12* rs1801157 polymorphism among controls and ALL patients were in Hardy–Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 0.33$ and $\chi^2 = 0.60$, respectively). The average age from ALL patients and controls were 7.7 and 10.7 years old, respectively. Allelic and genotype frequencies of *CXCL12* (rs1801157) and *CXCR4* (rs2228013) polymorphisms are shown in Table 1. Genotype frequency of *CXCL12* homozygous mutant (AA) was higher in ALL group than controls (6.4% and 2.2%, respectively). Moreover, ALL patients presented more A allele (ALL 38.3% and control 30.7%), although the genotypic or allelic association study did not show significant risk association to both polymorphisms. In the same way, there was no association between carriers of the polymorphic allele and high or low-risk of relapse in ALL patients (Table 2). We did not identify any individual with TT genotype from *CXCR4* polymorphism in both groups.

It was also evaluated the association of the *CXCL12* polymorphism and risk of death, thereby we compared 19 ALL deceased patients against survivors (n=75). It was observed an association of *CXCL12* rs1801157 polymorphism with risk of death. Individuals with AA genotype had more than nine fold risk of death than individuals with wild type or A allele carriers ($p = 0.014$). There was no significant difference between wild type genotype compared to AG plus AA genotypes ($p = 0.793$) (Table 3). The analyses of *CXCR4* rs2228013 genotypes did not reveal association to risk of death (data not showed).

Table 1. *CXCR4* rs2228014 and *CXCL12* rs1801157 genotypes among ALL (N=92 and 94, respectively) and control subjects (N=137), and its association with ALL risk

SNPs	Allele/Genotype	ALL	Controls	OR	CI (95%)	p value
<i>Allelic frequency</i>						
<i>CXCR4</i> (rs2228014)	C	173(94.0%)	259(94.5%)	1.00	(Reference)	0.84
	T	11(6.0%)	15(5.5%)	1.1	(0.49 – 2.45)	
<i>CXCL12</i> (rs1801157)	G	146(77.7%)	229(83.6%)	1.00	(Reference)	0.12
	A	42(22.3%)	45(16.4%)	1.46	(0.92 – 2.34)	
<i>Genotypes</i>						
<i>CXCR4</i>	CC	81(88.0%)	122(89.1%)	1.00	(Reference)	0.83
	CT	11(12.0%)	15(10.9%)	1.11	(0.48-2.53)	
<i>CXCL12</i>	GG	58(61.7%)	95(69.3%)	1.00	(Reference)	0.46
	GA	30(31.9%)	39(28.5%)	1.26	(0.71 – 2.24)	
	AA	6(6.4%)	3(2.2%)	3.28	(0.79 – 13.61)	
<i>Allele carriers</i>						
<i>CXCL12</i>	GG	58(61.7%)	95(69.3%)	1.00	(Reference)	0.26
	GA + AA	36(38.3%)	42(30.7%)	1.4	(0.81 – 2.44)	

Statistical analysis of genotype distribution and allele frequencies revealed no significant differences between cases and controls. ALL: acute lymphoblastic leukemia; OR: odds ratio; CI: confidence interval.

Table 2. Association study between polymorphic allele carriers of *CXCR4* and *CXCL12* polymorphisms and ALL risk of relapse

SNPs	Groups	N		n		OR (95% CI)	p value*
			%		%		
<i>CXCR4</i> rs2228014		CC		Allele T carrier		0.44 (0.12-1.57)	0.32
	Low-Risk	28	82.4	6	17.6		
	High-Risk	53	91.4	5	8.6		
<i>CXCL12</i> rs1801157		GG		Allele A carrier		0.46 (0.20-1.10)	0.12
	Low-Risk	17	50.0	17	50.0		
	High-Risk	41	68.3	19	31.7		

*Fisher's exact test, $p > 0.05$. OR: odds ratio.

Table 3. Risk of death association in different genotypic profiles of *CXCL12* rs1801157 in ALL group

Outcome	Genotypes				OR (CI 95%)	p value*
	GA		GG			
	n	%	n	%		
Death	4	26.7	11	73.3	0.66 (0.19 – 2.27)	0.57
Survivors	26	35.6	47	64.4		
	AA		GG + GA		9.73 (1.63-58.09)	0.01 [§]
Death	4	21.1	15	78.9		
Survivors	2	2.7	73	97.3		
	GG		GA + AA		0.82 (0.29-2.28)	0.79
Death	11	57.9	8	42.1		

Survivors	47	62.7	28	37.3
-----------	----	------	----	------

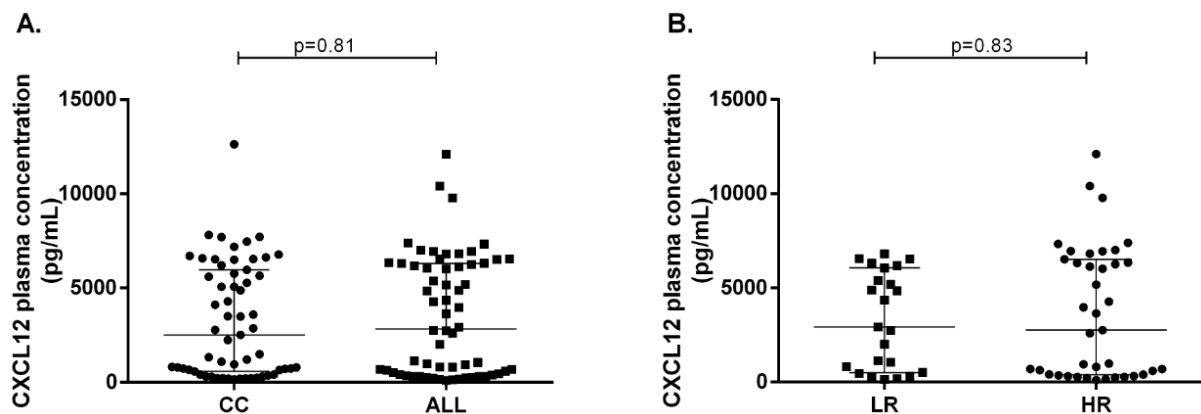
*Fisher's exact test, §statistically significant difference. OR: odds ratio, CI: confidence interval.

Determination of CXCL12-1 β plasma levels

Analysis of CXCL12-1 β in peripheral blood was determined in 62 individuals ALL and 59 controls. Comparison of median CXCL12-1 β plasma levels in ALL patients (2,836.0 pg/mL; mean= 3,528.0pg/mL \pm 108.3-12,103.0) and controls (2,519.0 pg/mL; mean= 3,255.0pg/mL \pm 161.1-12,632.0) did not show differences (p=0.81) (Figure 1A). CXCL12-1 β plasma levels were not statistically different comparing low-risk (median= 2,918.0 pg/mL; mean= 3,290.0 pg/mL \pm 147.0 – 6,809.0) and high-risk of relapse (median= 2,755.0 pg/mL; 3,669.0 pg/mL \pm 108.3 – 12,103.0,) ALL patients (Figure 1B; p=0.83).

CXCL12-1 β plasma levels were analyzed according to clinical stage at the time of sampling (at diagnosis, during treatment or in remission phase). However, it was not observed significant differences (Figure 1C). There was no significant difference comparing CXCL12-1 β levels between survival patients (median=2,836 pg/mL; mean= 3,274m pg/mL \pm 147.0 - 7,388) and deceased patients (median=3628.0 pg/mL; mean= 4,589 pg/mL \pm 108.3 - 12,103).

In view of a possible variation in CXCL12-1 β plasma levels according to the presence or absence *CXCL12* rs1801157 polymorphism, we compared wild type genotype (GG) versus A allele carriers. Patients and controls carrying A allele (4,234pg/mL \pm 108.3 - 7,388; median=5,450 pg/mL vs. 4,417 pg/mL \pm 192.9 - 12,632; median=5,279, respectively) showed significant increase in plasma CXCL12-1 β levels compared to GG genotypes (GG genotype 2,867pg/mL \pm 147 - 12,103; median=961 pg/mL vs. 2,131 pg/mL \pm 161.1 - 7,822; median=956.1, respectively) (Figure 2).



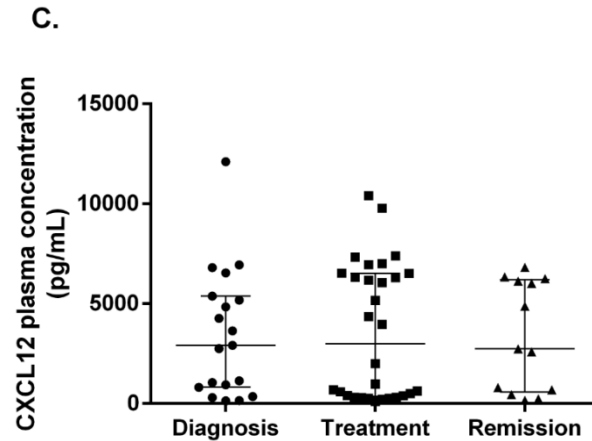


Fig 1. CXCL12-1 β plasma levels according to risk, genotypes and clinical stage. Comparisons of CXCL12-1 β plasma concentration were not significant comparing controls (N=59) and ALL patients (N=62) (A), low-risk (LR) (N=23) and high-risk of relapse (HR) (N=39) patients (B), and patients grouped according to clinical stage at the time of sampling (diagnosis N=19, treatment N= 30, remission N=13) (C). The concentration of CXCL12-1 β in each group is given as median, and bars as interquartile range. ALL: acute lymphoblastic leukemia.

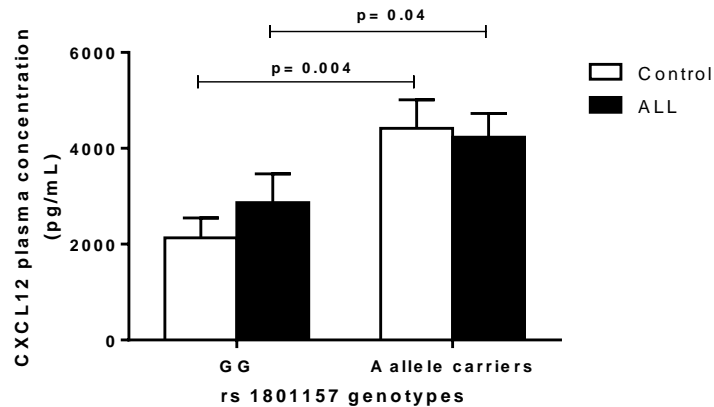


Fig 2. CXCL12-1 β plasma levels according to presence or absence A allele

“A” allele carriers for the rs1801157 polymorphism (control N=29 and ALL N=30) showed higher levels of plasma CXCL12-1 β compared to wild individuals (control N=30 and ALL N=32). p-values determined by *Mann-Whitney U* test. The concentration of CXCL12-1 β in each group is given as mean, and bars as interquartile range. ALL: acute lymphoblastic leukemia

DISCUSSION

The binding of CXCL12 to CXCR4 initiates divergent signaling pathways downstream of ligand binding, which can result in a variety of responses such as chemotaxis, cell survival and/or proliferation, increase in intracellular calcium, and gene transcription

(TEICHER e FRICKER, 2010). In hematopoiesis, the essential role of CXCL12/CXCR4 in stem cell maintenance within the bone marrow is highlighted by genetic ablation of CXCL12 (in stroma) or CXCR4 (in hematopoietic stem cells), resulting in stem cell depletion, and by antagonism of CXCL12/CXCR4, leading to cell mobilization from bone marrow into bloodstream (MORRISON e SCADDEN, 2014; KARPOVA e BONIG, 2015).

DNA polymorphisms studies have provided real contributions for understanding cancer and other diseases risks and prognosis. In fact, the identification of SNPs that affect gene function or expression and contribute to ALL susceptibility is important as it may help to predict individual and population risk and clarify pathophysiological mechanisms relevant to this neoplasia.

The rs2228014 CXCR4 polymorphism is a silent mutation that has been associated with diseases such as renal cell carcinoma (Cai, 2013), non-small cell lung cancer (Lee, 2011) and multiple myeloma (Mazur, 2013). Currently, several mechanisms may explain the possible implications of a synonymous mutation on the regulation RNA. Although do not determine amino acid sequence of encoded proteins, studies has demonstrated that these polymorphisms may affect mRNA splicing, stability, structure and regulation of translation through preferred synonymous codons that are translated more efficiently and accurately (SHABALINA *et al.*, 2013; HUNT *et al.*, 2014).

In this study, we evaluated the correlations of *CXCL12* rs1801157 and *CXCR4* rs2228014 polymorphisms in DNA obtained from 94 childhood ALL patients and 137 controls. Genotypic or allelic frequencies did not show significant risk association to both polymorphisms. Additionally, there was no association between rs2228014 and rs1801157 genetic polymorphisms and risk of relapse between ALL patients. Nonetheless, genetic analysis revealed increased frequency of homozygosity (AA genotype) for *CXCL12* polymorphism in ALL deceased patients ($p < 0.05$). Notably, no previous population studies documented its role as a genetic risk factor for death in childhood ALL.

In fact, there are currently few studies investigating *CXCL12* and *CXCR4* polymorphisms related to ALL risk. Further, although several cancer genetic-association studies have been published so far, adequately powered studies with large samples should be tested avoiding the possibility of substantial bias. In this particular, we performed sample size estimation prior to the analysis and our results were based on a suitable sample size to detect the effect of both polymorphisms.

The *CXCL12* rs1801157 polymorphism has been investigated in various types of cancers; however, previous studies presented controversies on the association between *CXCL12* rs1801157 polymorphism and cancer susceptibility. A meta-analysis conducted by ZHU *et al.* (2014), including 4,435 cases and 6,898 controls from 30 case-control studies, explored the association between this polymorphism and cancer risk. Although only 1 study presented data regarding acute lymphoblastic leukemia susceptibility, they showed that *CXCL12* rs1801157 polymorphism was associated with an increased risk of this cancer (PERIM *et al.*, 2013).

Considering specifically other leukemias, the description of increased release of blasts from bone marrow to blood and higher frequency of distal dissemination in A allele carriers of rs1801157 among acute myeloid leukemia (AML) patients was the first record of an association between this polymorphism and risk of tissue infiltration by malignant cells (RIZQ *et al.*, 2011). Moreover, ABD EL-RAHMAN (2010) reported a highly statistical significant relationship between the *CXCL12* A allele and extramedullary tissue infiltration, and also, a highly significant association between *CXCL12* genotypes, *CXCR4* expression and treatment outcome.

DOMMANGE *et al.* (2006) reported that *CXCL12* rs1801157 polymorphism is a genetic determinant involved in the clinical presentation of AML. Also, *CXCR4* expression predicts poor prognosis in AML and *CXCL12* rs1801157 polymorphism is a genetic determinant involved in the clinical presentation of leukemia (RIZQ *et al.*, 2011).

In ALL, the characteristic uncontrolled proliferation of lymphoid progenitors as well as tendency to dissemination into extramedullary environment may involve high expression of *CXCR4* by malignant blasts and activation of the *CXCL12/CXCR4* axis (AYALA *et al.*, 2009). Furthermore, overexpression of *CXCL12* is associated with the development and metastasis of many cancers, and *CXCL12* rs1801157 polymorphism may be involved at increasing the production of *CXCL12* protein.

The data presented here revealed that mean *CXCL12*-1 β plasma levels were not different in ALL patients compared to the controls. Likewise, chemokine plasma levels did not differ from low- and high-risk of relapse patients. In addition, the *CXCL12*-1 β plasma levels were analyzed according to clinical stage at the time of sampling (at diagnosis, during treatment or in remission phase), and no significant differences were observed. Our findings are in contrast to WEN *et al.* (2011) and KHANDANY *et al.* (2012), which demonstrated

higher levels of CXCL12 in ALL patients at diagnosis when compared to controls. Importantly, it is noteworthy that we found similar mean CXCL12 concentration in ALL patients at diagnosis. However, none of the other studies showed which CXCL12 isoform was quantified in plasma (alpha, beta or gamma) (YU *et al.*, 2006).

Finally, this study revealed that patients and controls carrying A allele for rs1801157 showed significant increase in plasma CXCL12 levels and there was no significant difference between AA genotype and the other genotype profiles. These results may indicate that there is a possible relation between the presence of A allele and higher CXCL12 expression, which corroborated with previous studies (TSAI *et al.*, 2009; GU *et al.*, 2014).

In view of our findings, it is imperative the investigation of how *CXCL12* rs1801157A allele may drive CXCL12 expression and its possible signaling modulation in ALL cells. In this regard, further analysis on CXCL12 expression in ALL blasts should clarify the role of CXCL12/CXCR4 axis in ALL pathobiology.

Conflict of Interests: The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical approval: All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária do Paraná, Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), Fundo Estadual para a Infância e Adolescência (FIA/PR), Secretaria da Família e Desenvolvimento Social (SEDS) and Pro-reitoria de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina (PROPPG-UEL).

REFERENCES

- AACR, A. A. F. C. R. CXCL12-CXCR4 Stromal Signaling Is Necessary for T-ALL Oncogenesis. **Cancer Discov**, v. 5, n. 8, p. OF10, Aug 2015.
- ABD EL-RAHMAN, A. A.-H., SAMAH; MAKHLOUF, MANAL; EL-DESOUKY, NERMINE; AL-FEKY, MOHAMED; YOUSRI, SHERIF. Detection of CXCL12 Gene Polymorphism and CXCR4 Expression in Egyptian Acute Myeloid Leukemia Patients v. 6, n. 9, p. 318-330, 2010.
- AYALA, F.; DEWAR, R.; KIERAN, M.; KALLURI, R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. **Leukemia**, v. 23, n. 12, p. 2233-41, Dec 2009.
- BURGER, J. A.; KIPPS, T. J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. **Blood**, v. 107, n. 5, p. 1761-7, Mar 1 2006.
- CACINA, C.; BULGURCUOGLU-KURAN, S.; IYIBOZKURT, A. C.; YAYLIM-ERALTAN, I.; CAKMAKOGLU, B. Genetic variants of SDF-1 and CXCR4 genes in endometrial carcinoma. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 2, p. 1225-9, Feb 2012.
- CASTOR, A.; NILSSON, L.; ASTRAND-GRUNDSTROM, I.; BUITENHUIS, M.; RAMIREZ, C.; ANDERSON, K.; STROMBECK, B.; GARWICZ, S.; BEKASSY, A. N.; SCHMIEGELOW, K.; LAUSEN, B.; HOKLAND, P.; LEHMANN, S.; JULIUSSON, G.; JOHANSSON, B.; JACOBSEN, S. E. Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. **Nat Med**, v. 11, n. 6, p. 630-7, Jun 2005.
- DOMMANGE, F.; CARTRON, G.; ESPANEL, C.; GALLAY, N.; DOMENECH, J.; BENBOUBKER, L.; OHRESSER, M.; COLOMBAT, P.; BINET, C.; WATIER, H.; HERAULT, O.; GROUP, G. S. CXCL12 polymorphism and malignant cell dissemination/tissue infiltration in acute myeloid leukemia. **FASEB J**, v. 20, n. 11, p. 1913-5, Sep 2006.
- FERLAY J, S. I., ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France, 2015. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 20/05/2015. >. Acesso em: 05/25/2015.
- GU, X. L.; MA, N.; XIANG, D. C.; HUANG, J.; DONG, Z. H.; LEI, H. Y.; DING, R.; GONG, Z. H.; WEN, Y. F.; QIU, J.; MA, L. Polymorphism of stromal cell-derived factor-1 selectively upregulates gene expression and is associated with increased susceptibility to coronary artery disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, n. 3, p. 932-937, Jan 17 2014.
- HUNT, R. C.; SIMHADRI, V. L.; IANDOLI, M.; SAUNA, Z. E.; KIMCHI-SARFATY, C. Exposing synonymous mutations. **Trends Genet**, v. 30, n. 7, p. 308-21, Jul 2014.
- KARPOVA, D.; BONIG, H. Concise Review: CXCR4/CXCL12 Signaling in Immature Hematopoiesis-Lessons From Pharmacological and Genetic Models. **Stem Cells**, v. 33, n. 8, p. 2391-9, Aug 2015.

KHANDANY, B. K.; HASSANSHAH, G.; KHORRAMDELAZAD, H.; BALALI, Z.; SHAMSIZADEH, A.; ARABABADI, M. K.; OSTADEBRAHIMI, H.; FATEHI, A.; REZAZADEH, M.; AHMADI, Z.; KARIMABAD, M. N. Evaluation of circulating concentrations of CXCL1 (Gro-alpha), CXCL10 (IP-10) and CXCL12 (SDF-1) in ALL patients prior and post bone marrow transplantation. **Pathol Res Pract**, v. 208, n. 10, p. 615-9, Oct 15 2012.

LATAILLADE, J. J.; DOMENECH, J.; LE BOUSSE-KERDILES, M. C. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)\CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: survival, cell cycling and trafficking. **Eur Cytokine Netw**, v. 15, n. 3, p. 177-88, Jul-Sep 2004.

LIU, A.; DELGADO-MARTIN, C.; TEACHEY, D. T.; HERMISTON, M. L. The CXCR4/CXCL12 Axis Mediates Chemotaxis, Survival, and Chemoresistance in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v. 124, n. 21, Dec 6 2014.

MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M.; DEAN, M.; O'BRIEN, S. J.; SHEPPARD, H. W.; WEGNER, S. A.; MICHAEL, N. L. CXCR4 polymorphisms and HIV-1 pathogenesis. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 19, n. 4, p. 430, Dec 1 1998.

MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 327-34, Jan 16 2014.

PERIM, A. D.; GUEMBAROVSKI, R. L.; ODA, J. M. M.; LOPES, L. F.; ARIZA, C. B.; AMARANTE, M. K.; FUNGARO, M. H. P.; DE OLIVEIRA, K. B.; WATANABE, M. A. E. CXCL12 and TP53 genetic polymorphisms as markers of susceptibility in a Brazilian children population with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 7, p. 4591-4596, Jul 2013.

PUI, C. H. Recent advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Formos Med Assoc**, v. 103, n. 2, p. 85-95, Feb 2004.

PUI, C. H.; RELING, M. V.; CAMPANA, D.; EVANS, W. E. Childhood acute lymphoblastic leukemia. **Rev Clin Exp Hematol**, v. 6, n. 2, p. 161-80; discussion 200-2, Jun 2002.

PUI, C. H.; RELING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 350, n. 15, p. 1535-48, Apr 8 2004.

RIZQ, E. A.; ELBORDINY, M. M.; GANDOUR, A. H.; SOROUR, A. F.; IMBABI, S. A. Detection of CXCL12 Gene Polymorphism and its Relation to Malignant Cell/Tissue Infiltration in de novo Acute Myeloid Leukemia. **Journal of Molecular Diagnosis and Vaccines**, v. 9, 2011.

SCHLESSELMAN, J. J.; STOLLEY, P. D. **Case-control Studies: Design, Conduct, Analysis**. Oxford University Press, 1982. ISBN 9780195029338. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=IKJpAAAAMAAJ>>.

SHABALINA, S. A.; SPIRIDONOV, N. A.; KASHINA, A. Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. 4, p. 2073-94, Feb 1 2013.

TEICHER, B. A.; FRICKER, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 11, p. 2927-31, Jun 1 2010.

TENG, Y. H.; LIU, T. H.; TSENG, H. C.; CHUNG, T. T.; YEH, C. M.; LI, Y. C.; OU, Y. H.; LIN, L. Y.; TSAI, H. T.; YANG, S. F. Contribution of genetic polymorphisms of stromal cell-derived factor-1 and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and clinicopathologic development of oral cancer. **Head Neck**, v. 31, n. 10, p. 1282-8, Oct 2009.

TSAI, H. T.; TEE, Y. T.; HSIEH, Y. H.; CHIOU, H. L.; LIN, C. W.; TSAI, H. C.; WANG, P. H.; YANG, S. F. Elevated plasma stromal cell-derived factor 1 protein and its gene polymorphism in patients with pelvic inflammatory disease. **Reprod Sci**, v. 16, n. 6, p. 610-7, Jun 2009.

VAN DEN BERK, L. C.; VAN DER VEER, A.; WILLEMSE, M. E.; THEEUWES, M. J.; LUIJENDIJK, M. W.; TONG, W. H.; VAN DER SLUIS, I. M.; PIETERS, R.; DEN BOER, M. L. Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 166, n. 2, p. 240-9, Jul 2014.

WEN, Q.; CHEN, R. L.; CAI, K. R.; LIN, Y. W. [Level of SDF-1/CXCR4 in children with acute leukemia and its significance]. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 19, n. 2, p. 324-6, Apr 2011.

WINKLER, C.; MODI, W.; SMITH, M. W.; NELSON, G. W.; WU, X.; CARRINGTON, M.; DEAN, M.; HONJO, T.; TASHIRO, K.; YABE, D.; BUCHBINDER, S.; VITTINGHOFF, E.; GOEDERT, J. J.; O'BRIEN, T. R.; JACOBSON, L. P.; DETELS, R.; DONFIELD, S.; WILLOUGHBY, A.; GOMPERS, E.; VLAHOV, D.; PHAIR, J.; O'BRIEN, S. J. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). **Science**, v. 279, n. 5349, p. 389-93, Jan 16 1998.

YU, L.; CECIL, J.; PENG, S. B.; SCHREMENTI, J.; KOVACEVIC, S.; PAUL, D.; SU, E. W.; WANG, J. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. **Gene**, v. 374, p. 174-9, Jun 7 2006.

ZHU, K.; JIANG, B.; HU, R.; YANG, Y.; MIAO, M.; LI, Y.; LIU, Z. The CXCL12 G801A polymorphism is associated with cancer risk: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108953, 2014.

4 CONCLUSÃO

- Nossos resultados demonstraram que não há associação genotípica ou alélica entre os polimorfismos rs1801157 do *CXCL12* e rs2228014 do *CXCR4* quanto a suscetibilidade e ao risco de recidiva de LLA;
- O polimorfismo rs2228014 do *CXCR4* não está associado ao risco de morte em pacientes com LLA. Por outro lado, indivíduos com o genótipo A/A para o polimorfismo rs1801157 do *CXCL12* apresentaram risco de morte nove vezes maior quando comparados aos genótipos selvagem (GG) e heterozigoto (GA);
- Os níveis plasmáticos de CXCL12 β não diferem entre pacientes com LLA e indivíduos controle, ou seja, a doença, por si só, não está relacionada a variações do CXCL12 circulante. Do mesmo modo, não houve diferença nos níveis de CXCL12 entre as fases de tratamento dos pacientes, indicando que, provavelmente, o tratamento não interfere nos níveis circulantes desta quimiocina;
- Pacientes com LLA e indivíduos controle portadores do alelo A do polimorfismo rs1801157 apresentaram níveis significativamente maiores de CXCL12 plasmático comparados aos indivíduos selvagens (GG). Embora não elucidado por este trabalho, a presença do alelo variante parece favorecer a expressão da quimiocina, com consequente aumento no plasma sanguíneo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAMID, G. Classification of Acute Leukemia. 2011. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/acute-leukemia-the-scientist-s-perspective-and-challenge/classification-of-acute-leukemia#exportas> >. Acesso em: 07. nov. 2015.

ACS. American Cancer Society - Cancer in Children. Atlanta, 2015. Disponível em: < <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002287-pdf.pdf> >. Acesso em: 02 de nov. 2015.

ALLEN, S. J.; CROWN, S. E.; HANDEL, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 787-820, 2007.

ALPAR, D.; WREN, D.; ERMINI, L.; MANSUR, M. B.; VAN DELFT, F. W.; BATEMAN, C. M.; TITLEY, I.; KEARNEY, L.; SZCZEPANSKI, T.; GONZALEZ, D.; FORD, A. M.; POTTER, N. E.; GREAVES, M. Clonal origins of ETV6-RUNX1(+) acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. **Leukemia**, v. 29, n. 4, p. 839-46, Apr 2015.

AZIZ, S. A.; SHARMA, S. K.; SABAH, I.; JAN, M. A. Prognostic significance of cell surface phenotype in acute lymphoblastic leukemia. **South Asian J Cancer**, v. 4, n. 2, p. 91-4, Apr-Jun 2015.

BALABANIAN, K.; LAGANE, B.; INFANTINO, S.; CHOW, K. Y. C.; HARRIAGUE, J.; MOEPPS, B.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; THELEN, M.; BACHELERIE, F. The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 42, p. 35760-35766, 2005.

BARTLEY, K.; METAYER, C.; SELVIN, S.; DUCORE, J.; BUFFLER, P. Diagnostic X-rays and risk of childhood leukaemia. **Int J Epidemiol**, v. 39, n. 6, p. 1628-37, Dec 2010.

BAZAN, J. F.; BACON, K. B.; HARDIMAN, G.; WANG, W.; SOO, K.; ROSSI, D.; GREAVES, D. R.; ZLOTNIK, A.; SCHALL, T. J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. **Nature**, v. 385, n. 6617, p. 640-4, Feb 13 1997.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 1, p. 138-45, Jan 2007.

BENE, M. C.; CASTOLDI, G.; KNAPP, W.; LUDWIG, W. D.; MATUTES, E.; ORFAO, A.; VAN'T VEER, M. B. Proposals for the immunological classification of acute

leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia**, v. 9, n. 10, p. 1783-6, Oct 1995.

BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, v. 33, n. 4, p. 451-8, Aug 1976.

BOIMEL, P. J.; SMIRNOVA, T.; ZHOU, Z. N.; WYCKOFF, J.; PARK, H.; CONIGLIO, S. J.; QIAN, B. Z.; STANLEY, E. R.; COX, D.; POLLARD, J. W.; MULLER, W. J.; CONDEELIS, J.; SEGALL, J. E. Contribution of CXCL12 secretion to invasion of breast cancer cells. **Breast Cancer Res**, v. 14, n. 1, p. R23, 2012.

BUITENKAMP, T. D.; IZRAELI, S.; ZIMMERMANN, M.; FORESTIER, E.; HEEREMA, N. A.; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; PIETERS, R.; KORBIJN, C. M.; SILVERMAN, L. B.; SCHMIEGELOW, K.; LIANG, D. C.; HORIBE, K.; ARICO, M.; BIONDI, A.; BASSO, G.; RABIN, K. R.; SCHRAPPE, M.; CARIO, G.; MANN, G.; MORAK, M.; PANZER-GRUMAYER, R.; MONDELAERS, V.; LAMMENS, T.; CAVE, H.; STARK, B.; GANMORE, I.; MOORMAN, A. V.; VORA, A.; HUNGER, S. P.; PUI, C. H.; MULLIGHAN, C. G.; MANABE, A.; ESCHERICH, G.; KOWALCZYK, J. R.; WHITLOCK, J. A.; ZWAAN, C. M. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. **Blood**, v. 123, n. 1, p. 70-7, Jan 2 2014.

BUSILLO, J. M.; BENOVIC, J. L. Regulation of CXCR4 signaling. **Biochim Biophys Acta**, v. 1768, n. 4, p. 952-63, Apr 2007.

CAI, C.; WANG, L. H.; DONG, Q.; WU, Z. J.; LI, M. Y.; SUN, Y. H. Association of CXCL12 and CXCR4 gene polymorphisms with the susceptibility and prognosis of renal cell carcinoma. **Tissue Antigens**, v. 82, n. 3, p. 165-70, Sep 2013.

CARROLL, W. L. Safety in numbers: hyperdiploidy and prognosis. **Blood**, v. 121, n. 13, p. 2374-6, Mar 28 2013.

CAZÉ, M. A.; BUENO, D.; SANTOS, M. E. F. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Rev Hosp Clin Porto Alegre**, v. 30, n. 1, p. 5-12, 2010.

CAZÉ, M. O.; BUENO, D.; SANTOS, M. E. F. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **HCPA**,

, 2010. Disponível em: < <http://www.seer.ufrgs.br/hcpa/article/viewFile/11651/7510>

>. Acesso em: 21 jan

CERADINI, D. J.; KULKARNI, A. R.; CALLAGHAN, M. J.; TEPPER, O. M.; BASTIDAS, N.; KLEINMAN, M. E.; CAPLA, J. M.; GALIANO, R. D.; LEVINE, J. P.; GURTNER, G. C. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 858-864, 2004.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med**, v. 354, n. 6, p. 610-21, Feb 9 2006.

CHIARETTI, S.; ZINI, G.; BASSAN, R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v. 6, n. 1, p. e2014073, 2014.

CORBISIER, J.; GALES, C.; HUSZAGH, A.; PARMENTIER, M.; SPRINGAEL, J. Y. Biased signaling at chemokine receptors. **J Biol Chem**, v. 290, n. 15, p. 9542-54, Apr 10 2015.

CRAZZOLARA, R.; KRECZY, A.; MANN, G.; HEITGER, A.; EIBL, G.; FINK, F. M.; MOHLE, R.; MEISTER, B. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 115, n. 3, p. 545-53, Dec 2001.

CROWTHER-SWANPEOEL, D.; QURESHI, M.; DYER, M. J.; MATUTES, E.; DEARDEN, C.; CATOVSKY, D.; HOULSTON, R. S. Genetic variation in CXCR4 and risk of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 114, n. 23, p. 4843-6, Nov 26 2009.

DE OLIVEIRA, C. E.; CAVASSIN, G. G.; PERIM ADE, L.; NASSER, T. F.; DE OLIVEIRA, K. B.; FUNGARO, M. H.; CARNEIRO, J. L.; WATANABE, M. A. Stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in blood donors and chronic myelogenous leukemia patients. **J Clin Lab Anal**, v. 21, n. 1, p. 49-54, 2007.

DE SOUZA REIS, R., SR.; DE CAMARGO, B.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.; DE OLIVEIRA, J. M.; AZEVEDO SILVA, F.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatr Blood Cancer**, v. 56, n. 1, p. 58-64, Jan 2011.

DOMMANGE F.; CARTRON G. ; ESPANEL C.; GALLAY N.; DOMENECH J.; BENBOUBKER L. ; OHRESSER M.; COLOMBAT P. ; BINET C. ; WATIER H.; HERAULT O. CXCL12 polymorphism and malignant cell dissemination/tissue infiltration in acute myeloid leukemia. **FASEB J**, v. 20, n. 11, p. 1913-1915, 2006.

ESPARZA, S. D.; SAKAMOTO, K. M. Topics in pediatric leukemia--acute lymphoblastic leukemia. **MedGenMed**, v. 7, n. 1, p. 23, 2005.

ESTEY, E. H.; FADERL, S. H.; KANTARJIAN, H. **Hematologic Malignancies: Acute Leukemias**. 2008. 294.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. D. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 40, n. 2, p. 91-98, 2004.

GALE, K. B.; FORD, A. M.; REPP, R.; BORKHARDT, A.; KELLER, C.; EDEN, O. B.; GREAVES, M. F. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 25, p. 13950-4, Dec 9 1997.

GEORGIU, K. R.; FOSTER, B. K.; XIAN, C. J. Damage and recovery of the bone marrow microenvironment induced by cancer chemotherapy - potential regulatory role of chemokine CXCL12/receptor CXCR4 signalling. **Curr Mol Med**, v. 10, n. 5, p. 440-53, Jul 2010.

GIL, M.; SESHADRI, M.; KOMOROWSKI, M. P.; ABRAMS, S. I.; KOZBOR, D. Targeting CXCL12/CXCR4 signaling with oncolytic virotherapy disrupts tumor vasculature and inhibits breast cancer metastases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 14, p. E1291-300, Apr 2 2013.

GREAVES, M. Childhood leukaemia. **BMJ**, v. 324, n. 7332, p. 283-7, Feb 2 2002.

GREAVES, M. In utero origins of childhood leukaemia. **Early Hum Dev**, v. 81, n. 1, p. 123-9, Jan 2005.

GREAVES, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 3, p. 193-203, Mar 2006.

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 659-702, 2014.

GU, X. L.; MA, N.; XIANG, D. C.; HUANG, J.; DONG, Z. H.; LEI, H. Y.; DING, R.; GONG, Z. H.; WEN, Y. F.; QIU, J.; MA, L. Polymorphism of stromal cell-derived factor-1 selectively upregulates gene expression and is associated with increased susceptibility to coronary artery disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, n. 3, p. 932-937, Jan 17 2014.

GUENOVA, M.; BALATZENKO, G. **Leukemia**. INTECH 2013.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. AS QUIMIOCIAS E OS SEUS RECEPTORES

Características e Funções Fisiológicas. **Acta Med Port** v. 24, p. 967-976, 2011.

HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, H. K.; VARDIMAN, J.; LISTER, T. A.; BLOOMFIELD, C. D. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. **Ann Oncol**, v. 10, n. 12, p. 1419-32, Dec 1999.

HARRISON, C. J. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 144, n. 2, p. 147-56, Jan 2009.

HEJMADI, M. **Introduction to cancer biology**. PUBLISHING, V. 2010.

HITCHON, C.; WONG, K.; MA, G.; REED, J.; LYTTLE, D.; EL-GABALAWY, H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 10, p. 2587-97, Oct 2002.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia**. 6 ed. Porto Alegre: 2013.

HOWARD, S. C.; METZGER, M. L.; WILIMAS, J. A.; QUINTANA, Y.; PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; RIBEIRO, R. C. Childhood cancer epidemiology in low-income countries. **Cancer**, v. 112, n. 3, p. 461-72, Feb 1 2008.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541-1552, 2015.

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

INCA. Leucemias agudas na infância e adolescência. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 47, p. 245 - 257, 2001a.

INCA. Leucemias agudas na infância e adolescência. **Rev Bras Cancerol**, v. 47, n. 3, p. 245-57 2001b.

INCA. Particularidades do Câncer Infantil. 2008. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=343 >. Acesso em: 29 de nov. de 2015.

INCA. Estimativa 2016 - Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp> >. Acesso em: 08 de nov de 2015.

IWAMOTO, S.; MIHARA, K.; DOWNING, J. R.; PUI, C. H.; CAMPANA, D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. **J Clin Invest**, v. 117, n. 4, p. 1049-57, Apr 2007.

JANOWSKI, M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. **Cell Adh Migr**, v. 3, n. 3, p. 243-9, Jul-Sep 2009.

KAMPEN, K. R. The discovery and early understanding of leukemia. **Leuk Res**, v. 36, n. 1, p. 6-13, Jan 2012.

KATO, I.; NIWA, A.; HEIKE, T.; FUJINO, H.; SAITO, M. K.; UMEDA, K.; HIRAMATSU, H.; ITO, M.; MORITA, M.; NISHINAKA, Y.; ADACHI, S.; ISHIKAWA, F.; NAKAHATA, T. Identification of hepatic niche harboring human acute lymphoblastic leukemic cells via the SDF-1/CXCR4 axis. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27042, 2011.

KELLEY, T. W.; PARKER, C. J. CD4 (+)CD25 (+)Foxp3 (+) regulatory T cells and hematologic malignancies. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 2, p. 980-92, 2010.

LAZARINI, F.; THAM, T. N.; CASANOVA, P.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; DUBOIS-DALCQ, M. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. **Glia**, v. 42, n. 2, p. 139-48, Apr 15 2003.

LEE, Y. L.; KUO, W. H.; LIN, C. W.; CHEN, W.; CHENG, W. E.; CHEN, S. C.; SHIH, C. M. Association of genetic polymorphisms of CXCL12/SDF1 gene and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and prognosis of non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 73, n. 2, p. 147-52, Aug 2011.

LEONI, V.; BIONDI, A. Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 100, n. 3, p. 295-9, Mar 2015.

LI, M.; RANSOHOFF, R. M. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. **Prog Neurobiol**, v. 84, n. 2, p. 116-31, Feb 2008.

LIANG, C.-M. Chemokines and their receptors play important roles in the development of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 10, p. 1390, 2015.

LICHTMAN, M. A.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Williams Hematology**. 8ed. 2011.

MA, X.; EDMONSON, M.; YERGEAU, D.; MUZNY, D. M.; HAMPTON, O. A.; RUSCH, M.; SONG, G.; EASTON, J.; HARVEY, R. C.; WHEELER, D. A.; MA, J.; DODDAPANENI, H.; VADODARIA, B.; WU, G.; NAGAHAWATTE, P.; CARROLL, W. L.; CHEN, I. M.; GASTIER-FOSTER, J. M.; RELLING, M. V.; SMITH, M. A.; DEVIDAS, M.; GUIDRY AUVIL, J. M.; DOWNING, J. R.; LOH, M. L.; WILLMAN, C. L.; GERHARD, D. S.; MULLIGHAN, C. G.; HUNGER, S. P.; ZHANG, J. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Commun**, v. 6, p. 6604, 2015.

MAHONEY, M. C.; MOYSICH, K. B.; MCCARTHY, P. L., JR.; MCDONALD, R. C.; STEPANENKO, V. F.; DAY, R. W.; MICHALEK, A. M. The Chernobyl childhood leukemia study: background & lessons learned. **Environ Health**, v. 3, n. 1, p. 12, 2004.

MOON, H. W.; KIM, B. H.; PARK, C. M.; HUR, M.; YUN, Y. M.; KIM, S. Y.; LEE, M. H. CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T-cells in hematologic diseases. **Korean J Lab Med**, v. 31, n. 4, p. 231-7, Oct 2011.

MULLIGHAN, C. G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2012, p. 389-96, 2012.

NACHMAN, J. B.; HEEREMA, N. A.; SATHER, H.; CAMITTA, B.; FORESTIER, E.; HARRISON, C. J.; DASTUGUE, N.; SCHRAPPE, M.; PUI, C. H.; BASSO, G.; SILVERMAN, L. B.; JANKA-SCHAUB, G. E. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1112-5, Aug 15 2007.

NAGASAWA, T.; HIROTA, S.; TACHIBANA, K.; TAKAKURA, N.; NISHIKAWA, S.; KITAMURA, Y.; YOSHIDA, N.; KIKUTANI, H.; KISHIMOTO, T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. **Nature**, v. 382, n. 6592, p. 635-8, Aug 15 1996.

NCI. National Cancer Institute - Hematopoietic and Lymphoid Neoplasm Coding Manual. 2015. Disponível em: <
http://seer.cancer.gov/tools/heme/Hematopoietic_Instructions_and_Rules.pdf>.
 Acesso em: 29 de nov. de 2015.

ORIMO, A.; GUPTA, P. B.; SGROI, D. C.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; DELAUNAY, T.; NAEEM, R.; CAREY, V. J.; RICHARDSON, A. L.; WEINBERG, R. A. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. **Cell**, v. 121, n. 3, p. 335-48, May 6 2005.

PELED, A.; TAVOR, S. Role of CXCR4 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. **Theranostics**, v. 3, n. 1, p. 34-9, 2013.

PEREZ-ATAYDE, A. R.; SALLAN, S. E.; TEDROW, U.; CONNORS, S.; ALLRED, E.; FOLKMAN, J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. **Am J Pathol**, v. 150, n. 3, p. 815-21, Mar 1997.

PERIM, A. D.; GUEMBAROVSKI, R. L.; ODA, J. M. M.; LOPES, L. F.; ARIZA, C. B.; AMARANTE, M. K.; FUNGARO, M. H. P.; DE OLIVEIRA, K. B.; WATANABE, M. A. E. CXCL12 and TP53 genetic polymorphisms as markers of susceptibility in a Brazilian children population with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 7, p. 4591-4596, Jul 2013.

PIATKOWSKA-JAKUBAS, B.; KRAWCZYK-KULIS, M.; GIEBEL, S.; ADAMCZYK-CIOCH, M.; CZYZ, A.; LECH MARANDA, E.; PALUSZEWSKA, M.; PALYNYCZKO, G.; PISZCZ, J.; HOLOWIECKI, J. Use of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: recommendations of the Polish Adult Leukemia Group. **Pol Arch Med Wewn**, v. 118, n. 11, p. 664-9, Nov 2008.

PILLER, G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. **Br J Haematol**, v. 112, n. 2, p. 282-92, Feb 2001.

PLASSCHAERT, S. L.; KAMPS, W. A.; VELLENGA, E.; DE VRIES, E. G.; DE BONT, E. S. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? **Cancer Treat Rev**, v. 30, n. 1, p. 37-51, Feb 2004.

POPAT, U. R.; ABRAHAM, J. **Leukemia (Emerging Cancer Therapeutics)** 1 ed. New York: Demos Medical, 2011.

PUI, C. H.; CAMPANA, D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 14, n. 5, p. 783-5, May 2000.

PUI, C. H.; ONCIU, M. **Childhood Leukemias**. Cambridge: Cambridge University. 2012.

QUIXABEIRA, V. B. L.; SADDI, V. A. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. **Rev. bras. anal. clin.**, v. 40, n. 3, p. 199-202, 2008.

RAHNEMOON, A. R.; ZAKER, F.; IZADYAR, M.; ANSARI, S.; POOPAK, B.; TADAVOSYAN, Y. Prevalence of ETV6/RUNX1 Fusion Gene in Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in Iran. **Iran J Pediatr**, v. 23, n. 6, p. 681-6, Dec 2013.

RATAJCZAK, M. Z.; ZUBA-SURMA, E.; KUCIA, M.; RECA, R.; WOJAKOWSKI, W.; RATAJCZAK, J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. **Leukemia**, v. 20, n. 11, p. 1915-24, Nov 2006.

ROLAND, J.; MURPHY, B. J.; AHR, B.; ROBERT-HEBMANN, V.; DELAUZUN, V.; NYE, K. E.; DEVAUX, C.; BIARD-PIECHACZYK, M. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. **Blood**, v. 101, n. 2, p. 399-406, Jan 15 2003.

ROSE-INMAN, H.; KUEHL, D. Acute leukemia. **Emerg Med Clin North Am**, v. 32, n. 3, p. 579-96, Aug 2014.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The Biology of Chemokines and their Receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 18, n. 1, p. 217-242, 2000.

SALCEDO, R.; OPPENHEIM, J. J. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. **Microcirculation**, v. 10, n. 3-4, p. 359-70, Jun 2003.

SHEN, B.; ZHENG, M. Q.; LU, J. W.; JIANG, Q.; WANG, T. H.; HUANG, X. E. CXCL12-CXCR4 promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 9, p. 5403-8, 2013.

SIERRO, F.; BIBEN, C.; MARTINEZ-MUNOZ, L.; MELLADO, M.; RANSOHOFF, R. M.; LI, M.; WOEHLE, B.; LEUNG, H.; GROOM, J.; BATTEN, M.; HARVEY, R. P.; MARTINEZ, A. C.; MACKAY, C. R.; MACKAY, F. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 37, p. 14759-64, Sep 11 2007.

SINGH, S.; SINGH, U. P.; GRIZZLE, W. E.; LILLARD, J. W. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 12, p. 1666-1676, 2004.

SISON, E. A.; BROWN, P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. **Expert Rev Hematol**, v. 4, n. 3, p. 271-83, Jun 2011.

SPOO, A. C.; LUBBERT, M.; WIERDA, W. G.; BURGER, J. A. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 786-91, Jan 15 2007.

SUN, X.; CHENG, G.; HAO, M.; ZHENG, J.; ZHOU, X.; ZHANG, J.; TAICHMAN, R. S.; PIENTA, K. J.; WANG, J. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 4, p. 709-22, Dec 2010.

TACHIBANA, K.; HIROTA, S.; IIZASA, H.; YOSHIDA, H.; KAWABATA, K.; KATAOKA, Y.; KITAMURA, Y.; MATSUSHIMA, K.; YOSHIDA, N.; NISHIKAWA, S.-I.; KISHIMOTO, T.; NAGASAWA, T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 591-594, 1998.

TEICHER, B. A.; FRICKER, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 11, p. 2927-2931, 2010.

TEITELL, M.; PANDOLFI, P. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 175 - 198, 2009.

TENG, Y. H.; LIU, T. H.; TSENG, H. C.; CHUNG, T. T.; YEH, C. M.; LI, Y. C.; OU, Y. H.; LIN, L. Y.; TSAI, H. T.; YANG, S. F. Contribution of genetic polymorphisms of stromal cell-derived factor-1 and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and clinicopathologic development of oral cancer. **Head Neck**, v. 31, n. 10, p. 1282-8, Oct 2009.

THOMAS, X. First contributors in the history of leukemia. **World Journal of Hematology**, v. 2, n. 3, p. 62, 2013.

TSAI, H. T.; TEE, Y. T.; HSIEH, Y. H.; CHIOU, H. L.; LIN, C. W.; TSAI, H. C.; WANG, P. H.; YANG, S. F. Elevated plasma stromal cell-derived factor 1 protein and its gene polymorphism in patients with pelvic inflammatory disease. **Reprod Sci**, v. 16, n. 6, p. 610-7, Jun 2009.

USVASALO, A.; ELONEN, E.; U. M. S.-P.; RÄTY, R.; HARILA-SAARI, A.; KOISTINEN, P.; SAVOLAINEN, E. R.; KNUUTILA, S.; HOLLMÉN, J. Prognostic classification of patients with acute lymphoblastic leukemia by using gene copy number profiles identified from array-based comparative genomic hybridization data. **Leuk Res.**, v. 34, n. 11, p. 1476-1482, 2010.

VAN DEN BERK, L. C.; VAN DER VEER, A.; WILLEMSE, M. E.; THEEUWES, M. J.; LUIJENDIJK, M. W.; TONG, W. H.; VAN DER SLUIS, I. M.; PIETERS, R.; DEN BOER, M. L. Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 166, n. 2, p. 240-9, Jul 2014.

VAN ETEN, R. A. Aberrant cytokine signaling in leukemia. **Oncogene**, v. 26, n. 47, p. 6738-49, Oct 15 2007.

VARDIMAN, J. W.; THIELE, J.; ARBER, D. A.; BRUNNING, R. D.; BOROWITZ, M. J.; PORWIT, A.; HARRIS, N. L.; LE BEAU, M. M.; HELLSTROM-LINDBERG, E.; TEFFERI, A.; BLOOMFIELD, C. D. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-51, Jul 30 2009.

WAKEFORD, R. On pre- or postnatal diagnostic X-rays as a risk factor for childhood leukaemia. **Radiat Environ Biophys**, v. 48, n. 2, p. 237-9; author reply 241, Apr 2009.

WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 2015a. Disponível em: < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx >. Acesso em: 25 de nov. 2015.

WHO. International Childhood Cancer. 2015b. Disponível em: < http://www.who.int/cancer/media/news/Childhood_cancer_day/en >. Acesso em: 29 de nov 2015.

WIEMELS, J. L.; CAZZANIGA, G.; DANIOTTI, M.; EDEN, O. B.; ADDISON, G. M.; MASERA, G.; SAHA, V.; BIONDI, A.; GREAVES, M. F. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. **Lancet**, v. 354, n. 9189, p. 1499-503, Oct 30 1999.

WRIGHT, L. M.; MALONEY, W.; YU, X.; KINDLE, L.; COLLIN-OSDOBY, P.; OSDOBY, P. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. **Bone**, v. 36, n. 5, p. 840-53, May 2005.

WU, C. P.; QING, X.; WU, C. Y.; ZHU, H.; ZHOU, H. Y. Immunophenotype and increased presence of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Oncol Lett**, v. 3, n. 2, p. 421-424, Feb 2012.

WU, P. F.; LU, Z. P.; CAI, B. B.; TIAN, L.; ZOU, C.; JIANG, K. R.; MIAO, Y. Role of CXCL12/CXCR4 signaling axis in pancreatic cancer. **Chin Med J (Engl)**, v. 126, n. 17, p. 3371-4, 2013.

YAN, M.; JENE, N.; BYRNE, D.; MILLAR, E. K. A.; O'TOOLE, S. A.; MCNEIL, C. M.; BATES, G. J.; HARRIS, A. L.; BANHAM, A. H.; SUTHERLAND, R. L.; FOX, S. B. Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 2, 2011.

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


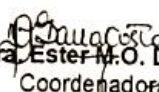
YU, L.; CECIL, J.; PENG, S. B.; SCHREMENTI, J.; KOVACEVIC, S.; PAUL, D.; SU, E. W.; WANG, J. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. **Gene**, v. 374, p. 174-9, Jun 7 2006.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; R.PASQUINI. **Tratado de Hematologia**. 1ed. Rio de Janeiro: 2013.

ZHOU, Y.; ZHANG, S.; LI, Z.; ZHU, J.; BI, Y.; BAI, Y.; WANG, H. Maternal benzene exposure during pregnancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis of epidemiologic studies. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110466, 2014.

ZOU, Y. R.; KOTTMANN, A. H.; KURODA, M.; TANIUCHI, I.; LITTMAN, D. R. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 595-9, Jun 11 1998.

6 ANEXOS

 <p>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA</p> <p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</p>	
<p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná Registro CONEP 268</p>	
<p>Parecer PF Nº 214/09 CAAE Nº 0164.0.268.000-09 FOLHA DE ROSTO Nº 289083</p>	<p>Londrina, 21 de dezembro de 2009.</p>
<p>PESQUISADORA: APARECIDA DE LOURDES PERIM CCS/PAC</p>	
<p>Prezada Senhora:</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p>"ANÁLISE DA REGIÃO 3'UTR DA QUIMIOCINA SDF-1, EXPRESSÃO DO RECEPTOR CXCR4 E SEU LIGANTE: IMPLICAÇÕES NA PATOGÊNESE DAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS"</p>	
<p>Situação do Projeto: APROVADO</p>	
<p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UJEL relatório final da pesquisa.</p>	
<p>Atenciosamente,</p> <p> Prof.ª Dra. Ester M.O. Dalla Costa Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UJEL</p>	
<p><small>Campus Universitário: Rua Santa Catarina 447, 300 300 - Fone (043) 371-4000 FAX: 371-330-6400 - Caixa Postal 6001 - CEP 86051-999 - UJEL/MS: www.uel.br Hospital Universitário/Centro de Ciências da Saúde: Av. Robert Koch, 46 - Vila Operária - Fone (043) 301-2000 FAX: 337-4043 e 337-7495 - Caixa Postal 791 - CEP 86038-448 LONDRINA - PARANÁ - BRASIL</small></p>	
<p><small>Form. Código 11.744 - Versão A1 (10/2009)</small></p>	



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informações sobre a pesquisa:

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, da pesquisa intitulada “**Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer**”, que tem por objetivo analisar determinados tipo 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 e tecido obtidos, serão utilizados para obtenção de DNA e RNA para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof^ª. Dr^ª Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel / Fax: (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490.

Pesquisador Responsável: _____

RG:: _____

Consentimento livre esclarecido e informado:

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

Londrina, ____ de _____, 20 ____.

Assinatura do responsável (ou representante legal):



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
DIRETORIA SUPERINTENDENTE

PARECER PROCESSO 12901 . 2013 . 87

À Pesquisadora

Maria Angélica Ehara Watanabe

Considerando o Projeto de Pesquisa com o título "ESTUDO DE MARCADORES GENÉTICOS, EPIGENÉTICOS, MOLECULARES E IMUNOLÓGICOS EM CÂNCER" apresentado a esse Hospital Universitário, estando vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental - Centro de Ciências Biológicas/UEL;

Considerando o parecer favorável apresentado nas instâncias administrativas que envolvem a realização do estudo;

Considerando que o projeto deverá ser analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HU/UEL para posterior operacionalização, atendendo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Pesquisa;

Vimos informar que **somos de parecer favorável à sua realização, resguardando-se o atendimento da legislação vigente.**

Solicitamos que, tão logo o Comitê de Ética emita parecer, que essa Diretoria Superintendente seja notificada, para os procedimentos cabíveis relacionados à documentação da pesquisa.

Solicitamos também que, uma vez realizado o estudo, uma cópia seja apresentada a esta Diretoria Superintendente, para ciência e divulgação.

Em 29/05/2013.

Prof. Dra. Margarida de Fátima Fernandes Carvalho
Diretora Superintendente do HU



Hospital do
Câncer de
Londrina

DECLARAÇÃO

À Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe
Depto. Ciências Patológicas

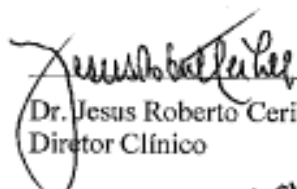
Prezada,

O Instituto de Câncer de Londrina declara para os devidos fins, que é colaborador no Projeto de Pesquisa sob o tema “Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer”, que se encontra em fase de submissão e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEL.

Neste Projeto será realizada a obtenção de amostra de sangue, tecido e blocos de parafina de pacientes portadores de tumores mamários, de intestino e colon bem como a realização de consultas aos prontuários, na busca por informações clínicas e histopatológicas que possam ser correlacionadas aos dados obtidos com as pesquisas básicas. Nenhuma intervenção terapêutica será realizada pelos pesquisadores e todos os sujeitos de pesquisa assinarão um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de qualquer procedimento do Estudo.

O referido estudo terá início somente após parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa.

Sendo o que tínhamos, agradecemos

 08/09/13
Dr. Jesus Roberto Ceribelli
Diretor Clínico
Dr. Jesus Roberto Ceribelli
DIRETOR CLÍNICO - CRAMP 5784
Hospital do Câncer de Londrina