



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

APARECIDA DE LOURDES PERIM

**Análise dos polimorfismos rs1801157 na região 3'UTR da
quimiocina *CXCL12* e rs1042522 no códon 72 do gene *P53*:
implicações na patogênese da
Leucemia Linfóide Aguda**

APARECIDA DE LOURDES PERIM

Análise dos polimorfismos rs1801157 na região 3'UTR da quimiocina *CXCL12* e rs1042522 no códon 72 do gene *P53*: implicações na patogênese da Leucemia Linfóide Aguda

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

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

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.

Londrina
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P444a Perim, Aparecida de Lourdes.

Análise dos polimorfismos rs1801157 na região 3'UTR da quimiocina CXCL12 e rs1042522 no códon 72 do gene TP53 : implicações na patogênese da Leucemia Linfóide Aguda / Aparecida de Lourdes Perim. – Londrina, 2013.

65 f.: il.

Orientador: Maria Angélica Ehara Watanabe

Coorientador: Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Leucemia linfóide – Teses. 2. Quimiocinas – Teses. 3. Polimorfismo (Genética) – Teses. 4. Câncer x Tratamento – Teses. I. Watanabe, Maria Angélica Ehara. II. Fungaro, Maria Helena Pelegrinelli. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616.155.392

APARECIDA DE LOURDES PERIM

**Análise dos polimorfismos rs1801157 na região 3'UTR da
quimiocina CXCL12 e rs1042522 no códon 72 do gene TP53:
implicações na patogênese da Leucemia Linfóide Aguda**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a Jaqueline Carvalho de Oliveira
Universidade Federal de Alfenas - MG

Prof. Dr. José Wander Breganó
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Luiz Antonio Custodio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de agosto de 2013.

“Tudo posso Naquele que me fortalece.” [Filipenses: 4. 13]

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus dias!

Aos meus pais Moysés e Adelma Perim, meus amores e maiores incentivadores, minha força emana de vocês.

Aos meus filhos Luiz Antonio, Rômulo Henrique, Isadora Fernanda e Adelma Luiza e minha nora Melina, por entender minha ausência, acreditar no meu amor e me ajudar nestes momentos de ausência.

Aos meus amores João Henrique e Maria Fernanda, que ainda não entendem muito porque a vovó faz as atividades que a tia Angélica passa, trabalha e não fica em casa...muitos beijinhos.

Ao meu amor e amigo Luiz Antonio Custodio pela compreensão nos meus momentos em “alfa”. Sua presença me conforta e tranquiliza.

À minha irmã Solange Maria Perim Garcia Lopes, minha amiga e suporte, meu eterno amor, carinho, admiração e respeito.

Aos meus irmãos Rui Perim, Sérgio Perim e Waldyr Perim pelo carinho, amor e apoio.

Ao meu afilhado Luiz Henrique Prata T. Garcia Lopes pelo carinho e sua alegria inata com a Dinda.

A toda da minha família pelas palavras e gestos de incentivo e por compreender meus momentos de ausência.

À Prof^ª. Dr.^a Maria Angelica Ehara Watanabe, que acreditou e me aceitou como orientanda. Foi uma honra tê-la como orientadora, um exemplo a ser seguido pela capacidade de agregar, ajudar e incentivar jovens e velhinhas. Minha profunda e eterna admiração, respeito, carinho e gratidão.

À Prof^a. Dr.^a Maria Helena Pelegrinelli Fúngaro, um exemplo a ser seguido, pela orientação.

À Prof^a. Dr^a Marla Karine Amarante, este anjo que apareceu na minha vida. Nunca pensei que nossos caminhos se cruzariam e desse tão certo. Sua competência e paciência me fizeram acreditar que eu conseguiria ir adiante e chegar aqui. Desculpe-me se te deixei louquinha com minha ansiedade.

À Prof^a Dr^a Roberta Losi Guembarovski, com os olhos verdes que me incentivam e amedrontam, conseguiu me conduzir a este degrau, muito obrigada. Sua competência, seriedade e dedicação fizeram toda a diferença. Perdoe-me pela ansiedade.

Aos Professores Dr^a Jaqueline Carvalho de Oliveira, Dr^a Roberta Losi Guembarowisk, Dr Luiz Antonio Custodio e Dr José Wander Breganó por aceitarem participar da banca de defesa de tese.

À Prof^a. Dr^a. Edna Maria Vissoci Reiche pela contribuição e amizade.

À Prof^a. Elaine Delicato pelo companheirismo, foi muito bom contar com sua amizade.

Aos amigos do laboratório, Leandra Fiori Lopes, Karen Brajão de Oliveira, Carlos Eduardo Coral de Oliveira, Julie Massayo Maeda Oda, Kalil William Alves de Lima, Thiago Cezar Fujita, Roberto Iemitsu Tatakihara, Vania Darc, Patricia Midori Murobushi Ozawa, Glauco Akelinghton Freire Vitiello e Carol Ariza, por todas as horas que passamos juntos, pela amizade e por toda a ajuda durante o desenvolvimento de minha pesquisa. Vocês são especiais!

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental pelos ensinamentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional. À Capes, CNPq e Fundação Araucária, e à PROPPG-UEL, pelo apoio financeiro para desenvolvimento deste estudo.

Às crianças saudáveis e as crianças com Leucemia, inseridas neste estudo, bem como suas mães, pela colaboração na doação do sangue, porque mesmo passando por momentos tão difíceis foram amáveis e generosas. Meu eterno agradecimento.

Aos docentes do setor de Hematologia, Sandra Quintal Carvalho, Maria Emília Fávero e José Wander Breganó pelo apoio e amizade ao longo destes anos.

Aos funcionários do setor de Hematologia do LAC/HU Luis H. Corrente, Edmar Honorato, Fernando Godoy, Áurea S. Silva, Elisabeth B. Strass, Aparecida D. Malvezi (sua ajuda foi valiosa), Ivete de Oliveira, Marta de P. Moura, Franciele A. Osete (seu café é especial) minha gratidão pela força, suporte e companheirismo.

À funcionária Vladma Elaine Lessa *in memoriam* pela ajuda importante no início deste trabalho, sua contribuição foi valiosa.

Ao Dr. Luiz Carlos Lúcio de Carvalho, seu apoio e palavras amigas foram muito importantes para mim.

Ao prof. Dr. Isaias Dichi, pelo incentivo, por suas palavras sábias e pela amizade.

Aos funcionários do CCS, especialmente à Marilza H. Sataka, Neuza M. Harfuch, Margareth Vicente, Emanuella Silveira de Oliveira e Rosimar Aparecida Nogueira, pela sensibilidade ajuda e companheirismo neste período atribulado, sou eternamente grata.

Aos Drs. Audrey e Ricardo Moita e funcionários do Laboratório CETEL pela imensa contribuição.

Aos funcionários do Hospital do Câncer de Londrina e ao Dr. José D'Oliveira Couto Filho por permitir nossa entrada e a abordagem aos pacientes.

Aos médicos hematologistas Cristina Célia Faune, Denise Akemi Mashima, Luis Gabriel Fernandez Turkowski, Roberto Franzin Coelho, Fausto Celso Trigo e Olavo Claudio Ferreira Amaral Filho pela imensa contribuição.

Aos professores Vera Lúcia Hideko Tatakihara, Luiz Antonio Custodio, Walter Murad e aos funcionários do setor de coleta do HU e HC.

Aos funcionários do SAME do HU e do HCL.

Às funcionárias do setor de quimioterapia do HU, Eliane A Athayde Sanches, Marina Viana Fernandes e Ivone de Jesus Duarte.

A todas as pessoas, que provavelmente por um momento de descuido, não mencionei os nomes, e que contribuíram direta ou indiretamente de uma maneira não menos importante para a realização deste trabalho, muito obrigada.

PERIM, A. L. **Análise dos polimorfismos rs1801157 na região 3'UTR da quimiocina CXCL12 e rs1042522 no códon 72 do gene TP53: implicações na patogênese da Leucemia Linfóide Aguda.** Departamento de Ciências Patológicas (CCB) – Universidade Estadual de Londrina, 2013.

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é caracterizada pela proliferação de células precursoras hematopoiéticas da linhagem linfóide na medula óssea. É a neoplasia mais comum na infância e sua etiologia é ainda desconhecida. O diagnóstico e a classificação das leucemias agudas baseiam-se na análise morfológica, na citoquímica e na imunofenotipagem celular. Nos últimos anos, tem se verificado avanços no tratamento da LLA na infância, com mais de 80% de remissão. No entanto, ainda são necessários marcadores adicionais para melhorar o prognóstico e o tratamento dos pacientes, especialmente nos casos onde ocorrem recidivas e resistência a quimioterapia convencional. Nas células hematopoiéticas saudáveis, citocinas e quimiocinas podem proporcionar o estímulo para a proliferação, sobrevivência, auto-renovação e diferenciação. O *CXCL12* é um membro da família CXC de quimiocinas o qual se liga ao receptor *CXCR4* e desempenha importante função na disseminação de tumores sólidos e também de doenças hematopoiéticas. É conhecido que *TP53*, um gene supressor tumoral, atua na regulação do desenvolvimento e do crescimento celular, o qual codifica uma fosfoproteína com importante papel no reparo do DNA e na apoptose, conseqüentemente prevenindo a carcinogênese. Tem sido verificado que os polimorfismos rs1801157 na região 3'UTR da quimiocina *CXCL12* e rs1042522 no códon 72 do gene *TP53* podem contribuir para a suscetibilidade e prognóstico do câncer por afetarem processos importantes como regulação metastática e supressão tumoral. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos verificar a frequência destes polimorfismos em uma amostra de 54 pacientes portadores de LLA e 58 controles livres de neoplasia, de mesma faixa etária, num estudo de associação do tipo caso controle, bem como correlacionar a presença de ambos os polimorfismos com o parâmetro prognóstico alto e baixo risco. Os polimorfismos genéticos foram analisados por metodologias baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a análise estatística utilizando-se o cálculo da Odds Ratio (OR) com Intervalo de Confiança a 95% (IC=95%). O estudo caso-controle indicou associações positivas para ambos os genes analisados: *CXCL12*: OR = 2.44; IC95%=1.05–5.64 e *TP53*: OR = 2.20; IC95%=1.03–4.70. Além disso, quando as duas variantes genéticas foram analisadas em conjunto, aumentaram significativamente em mais de cinco vezes o risco de desenvolver LLA (OR = 5.24; IC95%=1.39–19.75). O parâmetro prognóstico alto e baixo risco foi avaliado em relação à presença das variantes genéticas, porém os resultados não indicaram uma significância estatística (OR=0,56; IC95%=0,15-2,11). Os polimorfismos analisados nos genes *CXCL12* e *TP53* se mostraram candidatos a marcadores de suscetibilidade para a LLA, especialmente quando ambos os genótipos de risco foram herdados pelo mesmo indivíduo.

Palavras-chave: LLA. *CXCL12*. *CXCR4*. *TP53*. Polimorfismos genéticos e tratamento.

PERIM, A. L. **Analysis of the polymorphisms rs1801157 in the 3'UTR of chemokine CXCL12 and rs1042522 at codon 72 of TP53 gene: implications for Acute Lymphoblastic Leukemia pathogenesis.** Department of Pathological Sciences - State University of Londrina, 2013.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is characterized by the proliferation of hematopoietic precursor cells of the lymphoid lineage in the bone marrow. It is the most common malignancy in childhood and its etiology is still unknown. The diagnosis and classification of ALL is based on morphological analysis, in cytochemistry and cell immunophenotyping. In recent years, progress has been observed in childhood ALL treatment, with more than 80% of remission. However, there is still a need for additional markers to further upgrade the prognosis and treatment, especially in cases where there are relapses and chemotherapy resistance. In healthy hematopoietic cells, cytokines and chemokines can provide the stimulus for proliferation, survival, self-renewal and differentiation. The *CXCL12* is a member of the CXC family which binds to *CXCR4* receptor and this axis play an important role in the spread of solid tumors as well as hematopoietic diseases. It is known that *TP53*, a tumor suppressor, acts in the regulation of development and cell growth which encodes a phosphoprotein that plays an important role in DNA repair and apoptosis, and consequently, helps to prevent carcinogenesis. It has been found that the polymorphisms *rs1801157* in the 3'UTR of chemokine *CXCL12* and *rs1042522* at codon 72 of *TP53* may contribute to cancer susceptibility since they affect the regulation of key processes such as metastases and tumor suppressor. In this context, this study aimed to detect the frequency of these polymorphisms in a sample of 54 patients with ALL and 58 cancer-free controls, of the same age, in a case-control association study, as well as analysis the presence of both polymorphisms in relation to the prognostic parameter high and low risk. The analysis of genetic polymorphisms was carried out by Polymerase Chain Reaction (PCR) methods and statistical analysis by calculating the Odds Ratio (OR) with Confidence Interval 95% (CI=95%). The case-control study showed positive associations for both analyzed genes: *CXCL12*: OR = 2.44; 95%CI=1.05–5.64 e *TP53*: OR = 2.20; 95%CI=1.03–4.70. Moreover, when the two genetic variants were analyzed together, increased significantly in more than five times the risk of developing ALL (OR = 5.24; 95%CI=1.39–19.75). The prognostic parameter high and low risk was evaluated in relation to the presence of genetic variants, but the results indicated no statistically significant (OR=0.56; 95%CI=0.15-2.11). The polymorphisms analyzed in *CXCL12* and *TP53* genes proved candidate markers of susceptibility to ALL development, especially when both risk genotypes were inherited by the same individual.

Keywords: ALL. *CXCL12*. *CXCR4*. *TP53*. Genetics polymorphisms and treatment.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABL	Tirosina quinase Abelson
AMD11070	(S)-N'-(1H-benzimidazol-2-ylmethyl)-N'-(5,6,7,8-tetrahydroquinolin-8-yl)butene-1,4-diamine
AMD3100	{1,1'[1,4-phenylenebis(methhylene)]-bis1,4,8,11 azatetradecano}
Arg	Arginina
BCR	Região de grupamento do ponto de quebra
CCL2	Quimiocina (família CC) 2
CD	Grupamento de diferenciação
cTdT	Deoxilnucleotidil transferase
CXCL12	Quimiocina (família CXC) 12
CXCR4	Receptor de quimiocina (família CXC) 4
CXCR7	Receptor de quimiocina (família CXC) 7
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAB	Franco Americano Britânico
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia da Infância
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano DR
HPV	Vírus do Papiloma humano
IgM	Imunoglobulina (anticorpo)
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK	Tirosina quinase Janus
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLA-B	Leucemia Linfóide Aguda de células B
LLA-PCB	Leucemia Linfóide Aguda de células B precursoras
LLA-T	Leucemia Linfóide Aguda de células T
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica

LNH	Linfoma não Hodgkin
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MLL	Gene da leucemia de linhagem mista
MN	Micronúcleo
MO	Medula óssea
MSCBM	Células estaminais mesenquimais da medula óssea
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
OMS	Organização mundial da saúde
PCR	Reação em cadeia polimerase
Ph	Cromossomo Philadelphia
PI-3K	Fosfatidilinositol-3-OH-quinase
PKR	Proteína Quinase Dependente de RNA
Pro	Prolina
SDF-1	Fator derivado do estroma
SNC	Sistema Nervoso Central
TEL/AML1	Oncogene TEL /Oncogene AML1
TP53	Proteína tumoral 53
VCAM1	Molécula de adesão celular vascular1
VLA-4	Antígeno de indução tardia 4

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Leucemias.....	14
1.2	Leucemia linfóide aguda	14
1.3	Gene supressor de tumor <i>TP53</i>	22
1.4	O eixo <i>CXCL12/CXCR4</i>	24
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo Geral	31
2.2	Objetivos Específicos.....	31
3	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	32
3.1	Artigo 1. <i>CXCL12</i> and <i>TP53</i> genetic polymorphisms as markers of susceptibility in a Brazilian children population with acute lymphoblastic leukemia (LLA)	32
3.2	Artigo 2. The <i>CXCL12/CXCR4</i> axis in the pathogenesis of acute lymphoblastic leukemia (ALL): a possible therapeutic target.....	47
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
5	BIBLIOGRAFIA	55
6	ANEXOS	62
6.1	Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina	62
6.2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a	63
	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido b	64
	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido c.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemias

As Leucemias são um grupo heterogêneo de doenças com distúrbios clonais de células hematopoiéticas, que diferem quanto à etiologia, apresentação clínica, curso e resposta à terapia (CHANG et al., 2004). São, conforme a célula de origem, linfóides ou mielóides e, de acordo com a diferenciação celular e o curso da doença, crônicas ou agudas. Nas leucemias agudas, é comum o achado de células jovens neoplásicas (blastos) nos exames morfológicos de sangue e medula óssea (MO) (WU; EVANS, 2007). Estes blastos podem infiltrar órgãos, como fígado, baço, linfonodos, meninges, cérebro e pele. Na MO se proliferam e produzem sintomas associados à falência medular, como anemia, neutropenia e trombocitopenia, (CRANS; SAKAMOTO, 2001; LOWENBERG, 2001; FERRARA, 2004).

O diagnóstico e a classificação das leucemias agudas baseiam-se, inicialmente, na análise morfológica e citoquímica das células neoplásicas. Porém, a falta de reprodutibilidade desses critérios, a variabilidade de tipos (subtipos de leucemias) e a dificuldade para classificar alguns pacientes, têm levado à busca por outros parâmetros. Assim, o diagnóstico e a classificação das leucemias agudas apóiam-se, em grande parte, nos estudos imunofenotípicos por citometria de fluxo, permitindo avançar na identificação de determinados subgrupos dificilmente classificáveis do ponto de vista morfológico. Nos últimos anos, houve também avanços no campo da biologia molecular, com técnicas de hibridização *in situ*, reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de *southern blot* que permitem compreender melhor a doença e definir prognóstico e grupos de risco (STASI et al., 1995; HARRIS et al., 1999; REGO et al., 2003; REDDY; PERKINS, 2004).

1.2 Leucemia linfóide aguda

A Leucemia linfóide aguda (LLA) é caracterizada por proliferação mono ou oligoclonal de células precursoras hematopoiéticas da linhagem linfóide na MO. É a neoplasia mais comum na infância e representa cerca de 80% das leucemias na faixa etária pediátrica. Nos adultos jovens e adolescentes a incidência diminui para 20%, e volta a aumentar novamente após os 60 anos de idade (FARIAS; CASTRO, 2004). É uma doença heterogênea, com vários

fenótipos clínicos, morfológicos e imunológicos, apoiados pela extrema diversidade genética (PUI; EVANS, 1998; YEOH et al., 2002; MROZEK et al., 2009).

No Brasil, em 2012, estimou-se 4.570 casos em homens e 3.940 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5 novos casos a cada 100.000 homens e 4 a cada 100.000 mulheres, sendo a LLA mais frequente em crianças com idade entre 0 a 14 anos com pico de incidência entre 1 e 4 anos (INCA, 2012). A incidência de LLA em crianças entre 0 e 14 anos, no período de 1997 a 2004, em 16 cidades das regiões brasileiras, baseada nos registros de câncer, foi de 24,8 casos por milhão de habitantes. A cidade de Manaus teve a maior incidência com 56,6 casos por milhão. A média de incidência das 16 cidades demonstrou um pico aos 3 anos de idade, para ambos os sexos (DE SOUZA REIS et al., 2011). Já nos Estados Unidos, a LLA ocorre em cerca de 6.000 pessoas por ano, resulta em aproximadamente 1.400 mortes e representa cerca de 25% dos cânceres em crianças e adolescente entre 1 e 19 anos (LI et al., 2006).

A idade, o sexo e a contagem de leucócitos no momento do diagnóstico são geralmente citados nos estudos como uns dos principais fatores prognósticos para a LLA, embora não haja um consenso mundial sobre isso, porque como a eficácia do tratamento atingiu níveis ideais para a maioria dos pacientes, os fatores de risco indicadores de prognóstico convencionais tais como sexo masculino, raça negra e hiperleucocitose diminuíram ou desapareceram. Outros exemplos de fatores prognósticos são as alterações na contagem de cromossomos das células blásticas (ESPARZA; SAKAMOTO, 2005; PUI, 2010).

A maioria dos casos de LLA é provavelmente resultado de mutações que ocorrem no desenvolvimento de células linfóides pós-concepção. A tendência familiar foi estabelecida apenas em raros casos. Há fortes evidências de que as primeiras alterações em algumas leucemias ocorram no útero. Estas evidências vêm de estudos em gêmeos idênticos, onde há uma alta concordância da doença com rearranjos genéticos (FORD et al., 1993; GREAVES et al., 2003; GREAVES e WIEMELS, 2003; MAIA et al., 2003). Adicionalmente, estudos retrospectivos utilizando manchas de sangue neonatal (cartões de Guthrie) têm demonstrado a presença de translocações leucêmicas

específicas anos antes do diagnóstico clínico de LLA (GALE et al., 1997; MAIA et al., 2004; GREAVES, 2005).

► Classificação da LLA

A história completa e exames clínicos devem ser complementados com exames laboratoriais para o diagnóstico da LLA. Estes incluem hemograma completo, biópsia e aspirado da MO para imunofenotipagem por citometria de fluxo, imunohistoquímica, citogenética e testes moleculares. A imunofenotipagem é o exame padrão para o diagnóstico, e achados citogenéticos são essenciais para a avaliação do risco e devem ser realizados em todos os casos antes do início de terapia. Testes moleculares complementares podem ser realizados por serem mais sensíveis que a citogenética clássica para a identificação de algumas anomalias, como as do cromossomo 11q23, que envolve o gene da leucemia de linhagem mista (MLL) (REDDY; PERKINS, 2004).

O diagnóstico e a classificação das leucemias agudas permitem a identificação e o estágio do tipo celular envolvido na leucemogênese, o que é essencial, pois orienta a terapia e determina o prognóstico. O diagnóstico inicial consiste no exame citomorfológico do sangue periférico e da MO. O mielograma apresenta uma hipercelularidade acentuada, e as células normais são quase totalmente substituídas por linfoblastos leucêmicos. O critério diagnóstico é o achado de, no mínimo, 25% de linfoblastos na MO. Portanto, a análise do aspirado de MO é importante para se estabelecer o diagnóstico e fornecer células para a avaliação imunofenotípica, histoquímica e citogenética (VARDIMAN et al., 2009).

A classificação do grupo Franco Americano Britânico (FAB), descrita nos anos 70, baseia-se na análise morfológica e considera o diâmetro celular, a forma do núcleo, o número e a protuberância dos nucléolos e a quantidade e aspecto do citoplasma das células malignas (BENNETT et al., 1976), e compreende os subtipos abaixo descritos:

- **LLA-L1:** Células linfóides pequenas e homogêneas, cromatina nuclear fina, ausência de nucléolos, citoplasma escasso e núcleo regular;

- **LLA-L2:** Células grandes e heterogêneas, cromatina nuclear frouxa, presença de nucléolos, citoplasma abundante e forma do núcleo irregular;
- **LLA-L3:** Células linfóides grandes com cromatina nuclear fina, nucléolos proeminentes, citoplasma fortemente basofílico com a presença de vacúolos.

► Classificação Imunofenotípica

A classificação pela OMS faz distinção entre leucemia linfoblástica e linfoma linfoblástico e considera que quando o paciente tem uma massa composta por linfoblastos B ou T e ausência de blastos no sangue ou na MO, ou ainda quando há massa extramedular e o envolvimento limitado da MO, trata-se de um linfoma. Esta revisão segue a convenção utilizada em muitos protocolos de tratamento e sugere que, quando ocorre a presença de massa extramedular e 25% ou mais de linfoblastos na MO, o diagnóstico de leucemia linfoblástica é preferido sobre linfoma linfoblástico. Mudanças significativas, segundo a revisão da OMS (**Tabela 1**), ocorreram no diagnóstico e classificação das neoplasias dos precursores de células B e T (VARDIMAN et al., 2009).

Tabela 1. Classificação de leucemia linfóide aguda de acordo com a OMS

Leucemia/linfoma linfoblástico B

Leucemia/linfoma linfoblástico B, NOS

Leucemia/linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes

Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(v;11q23): rearranjo *MLL*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13;q22) *TEL-AML1(ETV6-RUNX1)*

Leucemia/linfoma linfoblástico B 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 B

Fonte: Vardiman et al. (2009)

Além da classificação das LLA em T e B, pela expressão de antígenos específicos (**Quadro 1**), as características imunofenotípicas dos linfoblastos permitem detectar com bastante precisão o estágio de diferenciação em que se encontra o processo leucêmico (MEADOWS, 1995; FARIAS; CASTRO, 2004).

Quadro 1. Características imunofenotípicas dos linfoblastos

Classificação Imunofenotípica	Características Imunológicas
LLA-B (linfócitos B)	<p>Pró-B: HLA-DR; TdT; CD34; CD19; CD21 e CD22c (citoplasmático)</p> <p>Tipo comum (Calla): HLA-DR; TdT; CD10; CD19; CD20; CD21 e CD22c</p> <p>Pré-B: HLA-DR; TdT; CD10; CD19; CD20; CD21 e CD22c</p> <p>B maduro: HLA-DR; TdT; CD10; CD19; CD20; CD22c; CD79 e Smlg (imunoglobulina de superfície)</p>
LLA-T (linfócitos T)	<p>Pré-T: HLA-DR; TdT; CD3c; CD5; CD7 e CD10</p> <p>Tipo intermediário: TdT; CD1a; CD2; CD3c; CD7; CD10 e CD4/CD8</p> <p>T maduro: TdT; CD2; CD3c; CD3; CD5; CD7; CD10 e CD4/CD8</p>

Fonte: Adaptado de Meadows (1995); Farias e Castro (2004)

De acordo com Farias e Castro (2004) o estudo imunofenotípico eleva para 99% o percentual de casos corretamente classificados, permitindo identificar a linhagem celular (T ou B) e os diferentes estágios de maturação da célula.

A maioria das células neoplásicas de LLA-B mostra características imunofenotípicas que geralmente não são expressas pelas células normais (DE ZEN et al., 2000), o que permite a identificação da célula patológica baseada em aberrações fenotípicas (VAN LOCHEM et al., 2004).

No atual sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde, a principal forma da doença ocorre nos precursores de células B (LLA-PCB), e é a responsável por aproximadamente 85% das LLA pediátricas (JEMAL et al., 2009; HOSKING et al., 2010). Estas são agrupadas em diferentes subtipos que correspondem a diferentes níveis de maturação da célula B normal (KEBRIAIEI et al., 2003).

Durante as últimas décadas demonstrou-se que 95% das LLA-B e T apresentam aberrações fenotípicas. A avaliação simultânea de padrões fenotípicos de maturação de células B anormais e a expressão de antígenos de linhagem cruzada, refletido pela reatividade do CD13 e CD33, marcadores pan-

mielóides em células B leucêmicas, pode ser observada em cerca da metade dos casos (LUCIO et al., 2001).

► Citogenética

Na análise citogenética clonal são identificadas anormalidades cromossômicas numéricas e/ou estruturais, que podem estar presentes, confirmando assim a classificação do subtipo e fornecendo informações de prognóstico importantes para o planejamento do tratamento (FARIAS; CASTRO, 2004).

As principais anormalidades cromossômicas nas LLA são as translocações: t (9; 22) (q34, q11), t (12; 21) (p13; q22), t (4; 11) (q21, q23), t (1; 19) (q23, p13), 8q24 e hiperdiploidia. Geralmente a hiperdiploidia, que ocorre com maior frequência em casos pediátricos, associa-se a um bom prognóstico, enquanto a hipodiploidia confere prognóstico ruim. Entre as anomalias cromossômicas estruturais, a translocação t (9; 22) (q34, q11), que resulta na proteína de fusão *BCR/ABL*, e os rearranjos do gene da leucemia de linhagem mista *MLL*, conferem um pior prognóstico em crianças e adultos, enquanto a translocação t (12; 21) (p13; q22), que resulta na proteína de fusão *TEL/AML1* e a deleção (12p), conferem um bom prognóstico. Outras informações de diagnóstico e prognóstico são obtidas a partir de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e técnicas de microarranjos de DNA (KEBRIAEI et al., 2003).

O Cromossomo Filadélfia (Ph) positivo, translocação t (9; 22) (q34, q11), representa a alteração citogenética mais comum em adultos com LLA, em que uma tirosina-quinase constitutivamente ativa está presente (HEISTERKAMP et al., 1989). Encontra-se em 15 a 30% dos pacientes LLA adultos, e a sua incidência aumenta com a idade (ARICO et al., 2010). Na infância, a LLA-B cromossomo Filadélfia positivo, que representa apenas 3 a 5% dos casos, apresenta sobrevivência de 45 a 50% com a quimioterapia e é melhor do que em adultos (THOMAS, 2012).

A LLA-T representa 15 e 25% das LLA em crianças e adultos, respectivamente, é predominante no sexo masculino com achados de alto risco, incluindo número elevado de leucócitos, alargamento do mediastino, linfadenopatia generalizada e envolvimento do sistema nervoso central (SNC).

O cariótipo anormal é encontrado em 50 a 60% dos casos (PUI et al., 2004; GRAUX et al., 2006).

Nos últimos anos têm se verificado avanços no sucesso do tratamento da LLA na infância, com mais de 80% dos indivíduos curados (PUI et al., 2008). No entanto, há ainda uma margem considerável para melhorar o resultado do tratamento nesta neoplasia. A maioria dos pacientes adultos não é curada, em parte, devido a um aumento da frequência de alterações genéticas desfavoráveis (mais notavelmente o cromossomo Filadélfia) (GLEISSNER et al., 2002). Einsiedel et al. (2005), demonstraram que mais de um terço dos pacientes com recaída de LLA pode ser considerado curado quando a segunda remissão completa tiver duração maior que 10 anos. Eles também concluíram que o imunofenótipo e o tempo de recaída são fatores prognósticos importantes e que permitem adaptar mais precisamente a intensidade do tratamento com o prognóstico individual na triagem.

Achados de prognóstico desfavorável incluem resultados adversos na citogenética, altas contagens de leucócitos e idade inferior a 01 ano e superior a 10 anos, sexo masculino, raça negra bem como o tempo de resposta à quimioterapia, como indicado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Indicadores Prognósticos na Leucemia Linfóide Aguda

Determinantes	Favorável	Desfavorável
Idade, anos	1 a 9	<1, >10
Adenomegalia, hepatoesplenomegalia	Ausente	Maciça
Aumento testicular	Ausente	Presente
Invasão SNC	Ausente	Visível
Contagem leucócitos ($\times 10^9/L$)	< 50	>50
Genótipo	Hiperdiploidia > 50 cromossomos <i>ETV6-RUNX1</i>	Hipodiploidia, <44 cromossomos <i>BCR-ABL1; MLL-AF4</i>
Doença Residual Mínima	<0,01%	≥1%

Fonte: Reddy e Perkins (2004); Pui, 2010

Além dos indicadores de prognóstico, os pacientes com LLA podem ser estratificados em grupos de risco segundo vários protocolos, dentre eles o Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia da Infância (GBTLI-LLA-99), atualizado em 2001. Este protocolo utiliza a classificação do INCA e a resposta terapêutica *in vivo* avaliada no 7º, 14º, e 28º dias do tratamento da indução com quatro drogas (Dexametasona, Vincristina, Daunorubicina e

Asparaginase) e define os pacientes em alto e baixo risco (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

Grupo de baixo risco: idade maior ou igual 1 ano e menor que 9 anos; leucometria inferior a 50.000/ μ l ao diagnóstico e menor que 5.000/ μ l no 7º dia de tratamento; ausência de blastos periféricos e baixo comprometimento medular no 14º dia de tratamento e medula com baixa contagem de células leucêmicas no 28º de indução; se houver infiltração de blastos no SNC ao diagnóstico estes devem estar ausentes no exame de líquido cefalorraquidiano (LCR) no 14º dia de tratamento.

Grupo de alto risco: idade menor que 1 ano e maior ou igual a 9 anos; leucometria superior a 50.000/ μ l ao diagnóstico e maior ou igual a 5.000/ μ l no 7º dia de tratamento; presença de blastos leucêmicos no sangue periférico ou comprometimento extenso da MO no 14º dia; evidência de acometimento leucêmico extra-medular ao final da indução (CAZÉ; BUENO; SANTOS, 2010).

1.3 Gene supressor de tumor TP53

A origem e o desenvolvimento neoplásico são caracterizados por alterações em dois grupos principais de genes: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais (HANANAN; WEINBERG, 2000). Genes associados aos mecanismos de reparo aos danos no DNA são considerados como um terceiro grupo, que pode atuar direta ou indiretamente no processo de carcinogênese (HOEIJMAKERS, 2001).

Os genes supressores tumorais atuam como reguladores negativos da proliferação (VERMA; TRIANTAFILLOU, 1998). Sabe-se que as proteínas codificadas por eles fazem parte das vias de sinalização celular, retardando a progressão do ciclo, bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte programada. Conseqüentemente, mutações inativadoras liberariam a célula da inibição imposta por estes genes, levando à proliferação desordenada, característica das células cancerosas (WEIMBERG, 1991). Supressores tumorais precisam apresentar os dois alelos mutados para induzir o desenvolvimento maligno. A inativação do primeiro alelo decorre de mutação pontual, enquanto a segunda cópia é perdida normalmente por deleção do alelo remanescente, o que se denomina perda de heterozigosidade. A primeira mutação pode ser herdada ou adquirida, o que caracteriza os tumores

hereditários e esporádicos, respectivamente. Adicionalmente, os indivíduos que herdaram uma cópia inativa de um gene supressor tumoral apresentam risco muito maior de desenvolver determinados tumores malignos ao longo da vida (YAMAGUCHI et al., 1997).

O gene *TP53* é um supressor tumoral que age na regulação do desenvolvimento e do crescimento celular. Localiza-se no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e codifica uma fosfoproteína de 53kDa. Desempenha um importante papel no controle do ciclo celular, induzindo reparo de DNA ou apoptose e, como consequência, ajuda a prevenir o aparecimento de câncer (EISENBERG, 2001; EISENDEL et al., 2005; ALMEIDA, 2007). Este gene é ativado em resposta a sinais de dano e interage com pelo menos 6 outros genes (XIONG et al., 1993). Assim, promove a parada do ciclo na fase G1, portanto, antes de ocorrer à duplicação do DNA (fase S), permitindo o reparo do DNA danificado. Como alternativa a danos não reparados, a proteína p53 pode induzir a morte programada. Além disso, também promove um ponto de checagem da fase S para a fase G2 do ciclo. De um modo geral, a ativação da proteína p53 resulta na indução ou repressão de um grande número de genes envolvidos no reparo de DNA e na morte celular, protegendo, assim, contra o acúmulo de alterações genéticas (ROSSNER et al., 2009). Por este motivo, esta proteína foi chamada de “guardiã do genoma” (SILVA, 2002).

Mutações em determinadas regiões do gene *TP53* podem resultar em diferentes efeitos biológicos, em nível protéico, e constituem a anormalidade molecular mais comumente encontrada em tumores sólidos humanos, incluindo os de mama, onde estão associadas a tumores mais agressivos e a um pior prognóstico (EISENBERG, 2001). Adicionalmente, polimorfismos genéticos foram descritos neste gene, e o mais informativo deles está localizado no éxon 4, códon 72, e tem sido investigado extensivamente em relação a suscetibilidade e progressão de várias neoplasias humanas (KIETTHUBTHEW et al., 2003). O códon 72 codifica um aminoácido arginina (CGC; Arg72) ou um prolina (CCC; Pro72), correspondendo ao fenótipo arginina/prolina (Arg/Pro) (TADA et al., 2001) que resulta em diferentes características bioquímicas e biológicas dessa proteína. Consequentemente, três genótipos diferentes são criados, ou seja, homocigoto para arginina (Arg/Arg), homocigoto para prolina

(Pro/Pro), e heterozigoto (Arg/Pro). Este polimorfismo ocorre por simples substituição de uma base G para C, com alteração estrutural da proteína (THOMAS et al., 1999).

Pesquisas mostram que o genótipo homozigoto Arg/Arg poderia estar relacionado com risco aumentado para o desenvolvimento tumoral. Foi relatada uma associação positiva deste genótipo aumentando em até sete vezes o risco de adquirir HPV associado ao câncer cervical (CROOK et al., 1996). Outro estudo, realizado por Aoki et al. (2009), em pacientes com câncer de mama, também encontrou associação positiva com o genótipo homozigoto Arg/Arg. Uma associação significativa entre este genótipo e o desenvolvimento de neoplasia hematológica, porém LMA, também foi verificada por Dunna et al. (2012), mas em contrapartida não foi encontrada nenhuma associação significativa em pacientes com LLA.

Resultados apresentados por Siddique e Sabapathy (2006), demonstraram que o alelo que codifica para prolina é mais eficaz quanto à capacidade de reparação do DNA do que o alelo que codifica para arginina. Já Bergamaschi et al. (2006), relatam que o alelo que codifica para arginina aumenta a capacidade da proteína p53 em induzir a apoptose, enquanto aquele que codifica para prolina apresenta um menor potencial apoptótico, mas um aumento do bloqueio na fase G1 do ciclo celular.

Deve-se ressaltar que, embora a proteína contendo o aminoácido prolina seja mais eficaz na sua capacidade de reparação do DNA, aquela contendo arginina não é completamente deficiente, e sim menos eficiente. Além disso, células que expressam arginina têm menor capacidade de remover micronúcleos (MN), marcadores que são amplamente utilizados para avaliar danos cromossômicos, sugerindo que este pode ser menos eficiente na redução da instabilidade genômica e, talvez, na suscetibilidade ao câncer (SIDDIQUE; SABAPATHY, 2006).

Assim, é importante observar que ambos os alelos, que codificam para os aminoácidos arginina ou prolina, são dotados de propriedades de apoptose e reparo, mas com diferentes eficiências. Dentro deste contexto, o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* pode modificar a função da proteína final e influenciar a suscetibilidade ao câncer, constituindo um candidato interessante

a ser avaliado em diferentes modelos de neoplasias humanas, incluindo as doenças hematológicas.

1.4 O Eixo CXCL12/CXCR4

► Quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4

O fator 1 derivado de células estromais (SDF-1 ou CXCL12) é um membro da família das quimiocinas CXC que é produzido por vários tecidos incluindo a MO e o timo e liga-se ao receptor 4 (CXCR4) (BLEUL et al., 1996) e ao receptor 7 (CXCR7) (BURNS et al., 2006). Esta quimiocina foi clonada a partir de uma linhagem celular derivada do estroma da MO e identificada como um fator de estimulação do crescimento de células pré-B (IMAI et al., 1999; GLODEK et al., 2007).

Na MO, CXCL12 é produzido principalmente pelos osteoblastos que revestem o endosteo e regula a migração das células hematopoiéticas. É expressa por diversos tipos celulares, como osteoblastos imaturos e células endoteliais no interior da MO, bem como por células epiteliais em diversos órgãos (NEIVA et al., 2005; SUN et al., 2010).

Possui duas isoformas principais, α e β (TASHIRO et al., 1993). Ambas são derivadas de um único gene, sendo que a isoforma α é secretada predominantemente pelas células do estroma da MO e por células endoteliais, e é encontrada em quase todos os órgãos. A secreção da isoforma α reduz os danos teciduais, mas sofre rápida proteólise no sangue. Em contraste, a isoforma β é mais resistente à degradação, estimula a angiogênese, e está presente em órgãos altamente vascularizados tais como fígado, baço e rim (JANOWSKI, 2009). A secreção de CXCL12 dentro ou em tecidos lesionados no entorno pode criar um microambiente facilitador da migração de células estaminais de tecidos endoteliais circulantes para o tecido afetado, resultando na regeneração de órgãos ou na reparação tecidual (KUCIA et al., 2006).

Além de ser importante na migração celular, uma vez que é quimioatraente para vários tipos de leucócitos, existem trabalhos indicando que a quimiocina CXCL12 pode desempenhar um papel na patogênese de tumores malignos (DE OLIVEIRA et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2009) incluindo leucemias (NISHII et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2007). Neste contexto, a função primária deste gene parece ser a facilitação da metástase ou

mobilização de células tumorais, o recrutamento de células hematopoiéticas, e talvez o estabelecimento da CTH maligna dentro do microambiente do tumor, onde níveis elevados de sua proteína promovem sobrevivência celular, proliferação, angiogênese e metástase.

Tokoyoda et al. (2004), demonstraram a localização e movimento característicos de linfócitos B entre nichos específicos dentro da MO durante o desenvolvimento, e sugeriram que CXCL12 mantém as células no nicho. As células da LLA, decorrentes da transformação maligna, inicialmente estão em um único sítio da MO, no entanto, a disseminação para todas as cavidades resulta em doença extensa, e pode ser verificada no momento do diagnóstico. Além disso, as células da LLA também infiltram fígado, baço, nódulos linfáticos e SNC (CRAZZOLARA et al., 2001).

Células B precursoras normais respondem para CXCL12 de maneira semelhante às células tronco hematopoiéticas CD34+ normais, sendo que ambas utilizam vias de sinalização similares (JUAREZ et al., 2009). Sabe-se que CXCL12 pode contribuir para a infiltração de células leucêmicas na MO pelo aumento da expressão de CXCR4 e resposta migratória de blastos derivados da MO (MOHLE et al., 2000).

O receptor CXCR4 é expresso em uma grande variedade de tecidos, incluindo os sistemas imune e nervoso central, e pode mediar a migração de leucócitos e progenitores hematopoiéticos em resposta ao CXCL12. No sistema imune, o receptor CXCR4 é altamente expresso em monócitos, células B e células T virgens no sangue periférico, bem como em células progenitoras hematopoiéticas na MO (ZOU et al., 1998). A expressão diferenciada de CXCR4 em células progenitoras CD34 + podem estar envolvidas tanto na manutenção destas células na MO, como na regulação do tráfego de células estaminais (AIUTI et al. 1997).

Assim, CXCR4 é um dos vários receptores de quimiocinas definidos pela sua capacidade de induzir a migração de células para um gradiente citocina quimiotático. Foi investigado o papel deste receptor na patogênese do câncer de mama (DO VAL CARNEIRO et al., 2009; ODA et al., 2012), e vários estudos abordaram sua expressão e função biológica em diferentes fases do desenvolvimento das células B na hematopoiese normal e maligna. Crazzolara et al. (2001), demonstraram que crianças com LLA-B e alta expressão de

CXCR4 tiveram infiltração significativa mais proeminente no fígado ou no baço, quando comparadas com pacientes com baixa expressão deste receptor.

Nosso grupo de pesquisa avaliou mutações polimórficas e expressão gênica de *CXCL12* e *CXCR4*, buscando elucidar seus papéis na patogênese das doenças hematológicas. O polimorfismo é definido como a ocorrência de variações genéticas em uma população, com duas ou mais formas descontínuas de um determinado fenótipo, em tal proporção que o mais raro deles não seja mantido por mutação recorrente. São então considerados polimórficos os genes que exibem variantes alélicas onde a menos comum delas apresenta frequência superior a 1% na população normal. De Oliveira et al. (2007), verificaram que o alelo polimórfico (rs1801157) de *CXCL12* possui implicações na patogênese da LMC e De Oliveira et al. (2009), estudaram este mesmo polimorfismo em linfomas Hodgkin (LH) e não-Hodgkin (LNH) e sugeriram sua importância neste subtipo de neoplasia. De Oliveira et al. (2004), compararam a mesma variante genética entre pacientes com leucemia linfóide e linfomas, e observaram que pacientes brasileiros com linfoma apresentam maior frequência do alelo polimórfico em relação ao grupo controle, sugerindo uma associação entre esta variante e as doenças hematológicas.

► **CXCL12/CXCR4 na sinalização da LLA**

Nas células hematopoiéticas normais, as citocinas e os fatores de crescimento proporcionam estímulo para a proliferação, sobrevivência, auto-renovação, diferenciação e ativação funcional. Atuam na ligação do receptor de superfície destas células e acionam as cascatas de sinalização intracelular, principalmente as quinases. Anormalidades de citocinas e nas vias de sinalização dos fatores de crescimento são características de todas as formas de leucemia. Nas células leucêmicas, estas vias são utilizadas para dar suporte ao evento maligno (VAN ETTEN, 2007).

Sabe-se que as citocinas liberadas no microambiente da MO e do timo desempenham um papel chave no crescimento de células LLA-T. De acordo com de Vasconcellos et al. (2011), as células leucêmicas estimulam as células estaminais mesenquimais da MO (MSCBM) a secretar CCL2 e IL-8, os quais estão significativamente aumentados na MO leucêmica e promovem a proliferação e sobrevivência das MSCBM. Estas citocinas melhoram a adesão de

células da LLA para as MSCBMs, mas parecem não ter efeito direto sobre a sobrevivência e migração na maioria dos precursores de células LLA-B. No entanto, seus efeitos na sobrevivência e adesão à MSCBM, combinada com o seu efeito supressor contra alguns precursores hematopoiéticos normais, pode representar o mecanismo molecular pelo qual as células leucêmicas contribuem para o estabelecimento de um microambiente medular maligno.

O eixo *CXCL12/CXCR4* parece desempenhar papel na disseminação de tumores sólidos e doenças hematopoiéticas e muitos estudos têm indicado a participação destes genes na patogênese de doenças (CRAZZOLARA et al., 2001; ROUMBOUTS et al., 2004; CABIOGLU et al., 2005; KANG et al., 2005). De acordo com Crazzolara et al. (2001), a expressão elevada de *CXCR4* prevê infiltração de órgão extramedular em crianças com LLA e sugere que este receptor, bem como seu ligante, desempenham um papel essencial na invasão extramedular.

Kato et al. (2011), verificaram que a hepatomegalia em pacientes com LLA não é apenas devido à infiltração aleatória, mas sim o resultado da expansão e migração de células leucêmicas dependente de *CXCL12/CXCR4* no nicho hepático. Estes dados indicam que este eixo não só estimula a migração, mas também a proliferação de células da LLA *in vivo* e *in vitro*, e também ressalta a importância do microambiente extramedular na prevenção de doença residual mínima.

O papel deste eixo quimiocina-receptor na infiltração de locais extramedulares que expressam níveis significativos de *CXCL12*, é associado com a alta expressão de *CXCR4* pelas células da LLA e a invasão de órgãos extramedulares (MULLER et al., 2001; CRAZZOLARA et al., 2001). Adicionalmente, pela inibição de doença extramedular através de tratamento com antagonistas de *CXCR4* (JUAREZ et al., 2007). Assim, a ligação *CXCL12-CXCR4* é uma das principais interações que ocorrem entre as células da LLA e o estroma da MO, e a alta expressão deste receptor parece ter valor preditivo na recidiva precoce desta neoplasia na infância (SCHENEIDER et al., 2002).

As diferenças nos mecanismos de sinalização utilizados pelas células da LLA e pelas células estaminais hematopoiéticas normais (HSC) levantam a possibilidade de regulação diferente no tráfego das células leucêmicas, proporcionando aplicações terapêuticas. Embora ambas as células, HSC

normais e células B progenitoras, compartilhem uma dependência na sinalização PI-3K (KIM et al., 1999; ZHANG et al., 2001), as células da LLA demonstraram um menor envolvimento desta via e sinalização predominante pelas proteínas quinases ativadas por mitógenos (p38MAPK) (BENDALL et al., 2005; JUAREZ et al., 2009).

De um modo geral, um mau prognóstico na LLA é esperado para pacientes com fatores de risco e para aqueles em recaída da doença. Em particular, pacientes em recaída tem uma taxa de sobrevivência de apenas 30% (EINSIEDEL et al., 2005). Estudos sobre células leucêmicas e nichos específicos têm destacado a importância da terapêutica visando o microambiente da MO (IWAMOTO et al., 2007), sendo o eixo CXCL12/CXCR4 um candidato promissor.

► O eixo CXCL12/CXCR4 como um potencial alvo terapêutico

A falta de eficácia, em alguns casos, no tratamento das leucemias, pode ser atribuída, em parte, ao fato das células leucêmicas serem protegidas por seu microambiente, já que estas residem em nichos específicos da MO, com condições favoráveis para seu crescimento e sobrevivência (BRADSTOCK et al., 2000; NAGASAWA, 2006). Assim, podem escapar da morte induzida pelo tratamento quimioterápico (MISHRA et al., 2006). Neste contexto, Juarez et al. (2003), sugeriram que análogos ou antagonistas de quimiocinas podem ser utilizados em paralelo com as terapias convencionais para melhorar o tratamento da LLA.

O estroma da MO protege as células da LLA da citotoxicidade de agentes quimioterápicos, e é também uma possível fonte de recaída. O eixo CXCL12/CXCR4 é importante para a interferência do estroma nas células leucêmicas e o desenvolvimento de novas drogas e abordagens para o tratamento da recaída continua a ser uma meta importante para a melhoria das taxas de cura (PARAMESWARAN et al., 2011). Kato et al. (2011), demonstraram que as funções do estroma são mantidas pelo eixo CXCL12/CXCR4, propondo uma nova abordagem terapêutica por inibição destas moléculas. Neste trabalho eles comprovaram que a disseminação da leucemia no fígado não é devido a uma infiltração não seletiva, mas sim de uma invasão sistemática com proliferação das células leucêmicas no nicho

hepático. Estes resultados serviram de base para abordagens terapêuticas que visam o nicho extramedular por inibição do eixo CXCL12/CXCR4.

Mowafi et al. (2008), demonstraram que a adição de CXCL12 recombinante aumenta a proliferação das células de LLA-B em cultura e induz a internalização de CXCR4, com sua diminuição na superfície. Porém, não ocorre a dessensibilização deste receptor e este processo não interfere na proliferação celular. Os autores acreditam que o gene *CXCL12* no contexto da LLA da infância merece estudos mais aprofundados para esclarecer tanto o papel desta quimiocina na patogênese da doença quanto à possibilidade de sinalização modular dirigida pela mesma.

Já o receptor CXCR4 parece ser um alvo terapêutico potencial, uma vez que foi demonstrado em modelo experimental de linfoma não-Hodgkin humano (NHL) que a neutralização deste receptor aumenta a apoptose e diminui a proliferação (BERTOLINI et al., 2002). Konoplev et al. (2011), concluíram que a forma ativa de CXCR4 (HARIBABU et al., 1997; SIGNORET et al., 1997) está diretamente relacionada à progressão metastática em pacientes adultos com LLA, independentemente de outros parâmetros prognósticos. Esta observação é potencialmente importante tanto na clínica como na terapia, porque antagonistas de CXCR4, atualmente, têm sido avaliados e podem ser adicionados, como adjuvantes, aos protocolos atuais de quimioterapia propostos para pacientes com LLA.

Hatse et al. (2002), demonstraram que a droga AMD3100 inibiu a internalização do receptor CXCR4, o influxo de cálcio e a quimiotaxia de células da LLA, provando ser um antagonista deste receptor. Kato et al. (2011), desenvolveram um modelo terapêutico em que o AMD3100 impediu a repopulação extramedular de células leucêmicas após a quimioterapia e melhorou dramaticamente a sobrevida global em camundongos tratados. Os autores verificaram ainda que sem a administração de AMD3100, algumas células leucêmicas remanescentes na região portal no fígado, após a quimioterapia, contribuíram para a recaída da neoplasia.

Ainda, de acordo com Welschinger et al. (2013), é possível que o rompimento entre as células da LLA e o microambiente poderia ser utilizado para melhorar a eficácia dos agentes quimioterápicos, devido à perda de proteção pelo estroma. Os autores relatam que o tratamento com o AMD3100

faz com que as células leucêmicas permaneçam no sangue periférico por um tempo maior do que as progenitoras hematopoiéticas normais, prolongando sua exposição aos agentes quimioterápicos. Finalmente, o AMD3100 aumenta a proporção de células mobilizadas que se encontram ativas no ciclo, um fator que provavelmente aumenta a sensibilidade aos agentes de atuação dependentes do ciclo celular, como a Vincristina.

Parameswaran et al. (2011), investigaram a utilização de outra droga, o AMD11070 (também conhecido como AMD070 ou 070), outro antagonista de CXCR4, como um agente sensibilizante na LLA. Este composto efetivamente bloqueou a migração de células leucêmicas humanas em cultura e interrompeu a migração e a adesão destas para o estroma. Também demonstraram que o tratamento convencional, combinado com este antagonista, pode trazer um benefício significativo na erradicação das células leucêmicas residuais em locais onde, de outra forma, estas estariam protegidas pelo estroma. Assim sendo, compreender os mecanismos pelos quais as células da LLA se disseminam pode fornecer informações para auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas adicionais, baseadas em alvos específicos, como a migração das células leucêmicas regulada pelo eixo CXCL12/CXCR4.

De um modo geral, frente à importância do eixo CXCL12/CXCR4 na patogênese e como promissor alvo terapêutico na LLA, e devido ao fato dos genes *CXCL12* e *TP53* estarem envolvidos na migração de células metastáticas em alguns tipos de câncer (MEHTA et al., 2007; YEUDALL et al., 2012; PANKA et al., 2013), a proposta do presente trabalho foi investigar se polimorfismos genéticos nestes genes apresentam implicações na suscetibilidade e prognóstico da LLA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os polimorfismos rs1801157 na região 3'UTR do gene *CXCL12* e rs1042522 no códon 72 do gene *TP53* em pacientes com LLA e em controles livres de neoplasia, bem como suas possíveis implicações no prognóstico da LLA.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar os polimorfismos genéticos rs1801157 e rs1042522 dos genes *CXCL12* e *TP53*, respectivamente, em pacientes com LLA e em controles de mesma faixa etária, livres de neoplasia;
- ✓ Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle para comparar a presença das variantes genéticas entre os dois grupos, na busca por marcadores de suscetibilidade ao desenvolvimento da LLA;
- ✓ Correlacionar a presença de ambos os polimorfismos com o prognóstico da LLA, por meio da análise do parâmetro clínico alto e baixo risco;

3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigo1 - The CXCL12/CXCR4 axis in the pathogenesis of acute lymphoblastic leukemia (ALL): a possible therapeutic target.

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the commonest childhood malignancy, accounting for approximately 80% of leukemia in the pediatric age group and its etiology is unknown. In the last years has been verified advances in the success of treatment of childhood ALL, with over 80% of individuals cured, however, there remains considerable scope for improving treatment outcome in this neoplasia. Despite the improvements in therapy over the past decade there is a need for additional biomarkers that can predict and refine prognosis in patients with ALL. In normal hematopoietic cells, cytokines provide the stimulus for proliferation, survival, self-renewal, differentiation and functional activation. Abnormalities of cytokines are characteristic of all forms of leukemia, include ALL. The stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 or CXCL12) is a member of the CXC chemokine family that binds to CXC chemokine receptor 4 (CXCR4). The CXCL12/CXCR4 axis appears to play a role in the dissemination of solid tumors and also hematopoietic diseases. We believe that understanding the mechanisms by which ALL cells disseminated, additional information will be provided to develop new therapeutic strategies. Therefore, in a general manner, this review provide informations relating to ALL pathogenesis, focus specifically in a cytokine-receptor important axis, the CXCL12/CXCR4 one, that may have implications for novel treatment strategies to improve life expectancy of patients with this neoplasia.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia (ALL), CXCL12, CXCR4, therapeutic target

1 Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is characterized by the monoclonal and/or oligoclonal proliferation of hematopoietic precursor cells of the lymphoid series within the bone marrow (BM). ALL is the commonest childhood malignancy and accounting for approximately 80% of leukemia in the pediatric age group, but its etiology is unknown (Stiller and Parkin 1996).

ALL occurs in approximately 6000 individuals per year and results in approximately 1400 deaths annually in the United States (Society 2012). In Brazil, according to National Cancer Institute (INCA), leukemia is the most common type of cancer in most populations, representing between 25% and

35% of all types, with the ALL the most frequent in children aged 0 to 14 years. In 2012 4,570 new cases of leukemia were estimated in men and 3,940 in women. These values correspond to an estimated risk of 5 new cases per 100,000 men and 4 per 100,000 women (INCA 2012).

In normal hematopoietic cells, cytokines provide the stimulus for proliferation, survival, self-renewal, differentiation and functional activation. Abnormalities of cytokine and growth factor signaling pathways are characteristic of all forms of leukemia: lymphoid and myeloid, acute and chronic. In leukemic cells, these pathways are usurped to sub serve critical parts of the malignant program (Van Etten 2007).

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) accounts for 15% and 25% of ALL in children and adults, respectively. T-ALL is characterized by male predominance, high-risk features including high white blood cell (WBC) count, mediastinal enlargement, generalized lymphadenopathy, central nervous system involvement, and poor outcome. An abnormal karyotype is found in 50%-60% of T-ALL cases (Pui, Relling et al. 2004; Oyekunle, Castagnetti et al. 2011).

The bone marrow (BM) microenvironment provides a variety of cytokines, chemokines, growth factors and adhesion molecules that coordinately regulate B-cell development. Perturbation of B-cell differentiation in the bone marrow leads to malignancies including acute the lymphoblastic leukemia (B-ALL) (LeBien 2000). Patients with B-ALL in the current World Health Organization classification system represent the majority of ALL diagnoses (Jemal, Siegel et al. 2009). B-cell precursor (BCP)-ALL is the major form of the disease, accounting for approximately 85% of all pediatric ALL (Hosking, Papaemmanuil et al. 2010).

In the last years has been verified advances in the success of treatment of childhood ALL, with over 80% of individuals cured (Pui, Robison et al. 2008). However, remains considerable scope for improving treatment outcome in this neoplasia. The majority of adult patients are not cured, in part, due to an increased frequency of unfavorable genetic alterations (most notably the Philadelphia chromosome encoding BCR-ABL) (Gleissner, Gokbuget et al. 2002). (Einsiedel, von Stackelberg et al. 2005) have demonstrated that more than one-third of patients may be regarded as cured from recurrent ALL with

second complete remissions lasting more than 10 years. They also concluded that the immunophenotype and time point of relapse are important prognostic factors that allow adapting more precisely treatment intensity to individual prognosis in trials.

Philadelphia chromosome (Ph)-positive leukemias include chronic myelogenous leukemia (CML) and Ph-positive ALL. The latter represents the most common cytogenetic abnormality in adult ALL, in which a constitutively active Bcr/Abl tyrosine kinase is present (Heisterkamp, Morris et al. 1989). It is found in 15% to 30% of ALL adults' patients, and its incidence increases with age (INCA 2012). For childhood Philadelphia-chromosome positive B-lymphoblastic leukemia, which accounts for only 3–5% of cases of pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL), survival is 45–50% with chemotherapy, which is better than survival in adults (Thomas 2012).

A poor prognosis is still expected for a minority of patients with various risk factors and those with ALL relapses. In particular, relapsed ALL has a survival rate of only 30% (Einsiedel, von Stackelberg et al. 2005). Studies about leukemic cells and niche correlation highlight the importance of therapeutically targeting the bone marrow (BM) microenvironment (Iwamoto, Mihara et al. 2007).

Despite the improvements in therapy over the past decade there is a need for additional biomarkers that can predict and refine prognosis in patients with ALL. Knowing that chemokine and their receptors have been implicated in the pathogenesis of many diseases, including cancer risk and disease progression, this work reviewed the CXCL12/CXCR4 axis in the pathogenesis of ALL and its role as a possible therapeutic target.

1.1 Chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4

The stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 or CXCL12) is a member of the CXC chemokine family that binds to CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) (Bleul, Fuhlbrigge et al. 1996) and CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) receptors (Burns, Summers et al. 2006). CXCL12 is constitutively produced by many cell types, including immature osteoblasts and endothelial cells within the bone marrow as well as by epithelial cells in many organs and central nervous

system and is known to stimulate the growth of normal pre-B cells (Imai, Kobayashi et al. 1999; Glodek, Le et al. 2007).

Besides a crucial role in migration, there are reports indicating that CXCL12 may play a role in the pathogenesis of malignant tumors (de Oliveira Cavassin, De Lucca et al. 2004; de Oliveira, Oda et al. 2009), including leukemia (Nishii, Katayama et al. 1999; de Oliveira, Cavassin et al. 2007). In this context, the primary role of CXCL12 appears to be the facilitation of metastasis or mobilization of tumor cell, the recruitment of hematopoietic cells, and perhaps the establishment of the cancer stem-like cell within the tumor microenvironment where high levels of CXCL12 recruit a highly tumorigenic population of tumor cells and promotes cell survival, proliferation, angiogenesis, and metastasis.

Tokoyoda, Egawa et al. (2004) demonstrated the B lymphocyte characteristic location and movement between specific niches within bone marrow during development and suggested that CXCL12 maintains the cells in the niche. ALL arising from malignant transformation of these cells undoubtedly in a single BM site, however, the spread to essentially all BM cavities, resulting in extensive disease, has occurred by the time of diagnosis. In addition, ALL cells also infiltrate the liver, spleen, lymph nodes, and central nervous system (Crazzolaro et al. 2001). In this context, there is a need for additional biomarkers that can predict and refine prognosis in patients with B-ALL.

CXCL12 may contribute to leukemic marrow infiltration by increased CXCR4 expression and migratory response in BM-derived blasts compared with circulating cells (Mohle, Schittenhelm et al. 2000). So, CXCR4 is one of several chemokine receptors defined by their ability to induce cell migration toward a chemotactic cytokine gradient. It has been investigated a role for this receptor in breast cancer pathogenesis (do Val Carneiro, Nixdorf et al. 2009; Oda, de Oliveira et al. 2012) and several reports have addressed the expression and biological role of CXCR4 at different stages of B cell development in normal and malignant hematopoiesis. Crazzolaro, Kreczy et al. (2001) demonstrated that pediatric patients who had B-ALL and high CXCR4 expression had significantly more prominent infiltration of the liver or spleen compared with patients who had low CXCR4 expression.

CXCR4 has received much attention in the literature because it is the receptor for CXCL12, and the CXCR4-CXCL12 axis is essential for the migration of normal cells to the bone marrow microenvironment (Bleul, Fuhlbrigge et al. 1996). This receptor is activated by phosphorylation, and it is believed that the process is primarily ligand-dependent (Haribabu, Richardson et al. 1997).

Our group of research has evaluated polymorphic mutations and gene expression of CXCL12 and CXCR4, seeking to elucidate their roles in the pathogenesis of cancer, with a focus on hematological diseases. de Oliveira, Cavassin et al. (2007) verified that the CXCL12 polymorphic allele have implications in CML pathogenesis. de Oliveira, Oda et al. (2009) studied the same SNP (rs1801157) in CXCL12 gene in Hodgkin's (HL), and non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and suggesting that this genetic variant may have important implications in this neoplasia subtype. de Oliveira Cavassin, De Lucca et al. (2004) compared the same allelic variant between patients with lymphoid leukemias and lymphomas and indicated that patients with lymphoma from Brazil are more likely to carry the polymorphic allele for CXCL12 gene, suggesting a differential role for this gene in subgroups of hematological diseases.

1.2 CXCL12/CXCR4 axis in ALL signaling

It is known that cytokines released in the bone marrow and thymus microenvironments play a key role in the growth of T-ALL cells. de Vasconcellos, Laranjeira et al. (2011) showed that leukemia cells stimulate bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSC) to secrete CCL2 and IL-8, which are significantly increased in the leukemic bone marrow (BM). These cytokines enhance ALL cells adhesion to BMMSCs, but seem to have no direct effect on most precursors B-cell ALL survival or migration. However, their pro-survival and adhesion supportive effects on BMMSC, combined with their suppressive effect against some normal hematopoietic precursors, may represent a molecular mechanism by which the leukemia contributes to the establishment of a malignant BM microenvironment.

The CXCL12/CXCR4 axis appears to play a role in the dissemination of solid tumors and hematopoietic diseases and many studies have indicated a

role for these molecules in the pathogenesis of diseases (Crazzolaro, Kreczy et al. 2001; Rombouts, Pavic et al. 2004; Cabioglu, Sahin et al. 2005; Kang, Watkins et al. 2005). According to Crazzolaro, high expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood ALL and suggest that this receptor and its ligand play an essential role in extramedullary invasion.

CXCR4 ligation by CXCL12 induces receptor internalization, elevation of cytoplasmic calcium mobilization levels, activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase C and phosphorylation of MEK (dual threonine and tyrosine recognition kinase), extracellular signal-regulated kinase (ERK) and components of focal adhesion complexes in many cell types, including B-cell precursors (Ganju, Brubaker et al. 1998; Wang, Park et al. 2000; Bendall, Baraz et al. 2005). Stromal cells also secrete fibronectin, a component of the extracellular matrix that enhances the CXCL12-induced migration of ALL cells without influencing CXCR4 expression (Sbaa-Ketata, Vasse et al. 2001).

In immature B cells, CXCL12 stimulation induces activation of small GTP-binding protein (GTPases) such as Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) (Palmesino, Moepps et al. 2006), leading to co-location of CXCR4 and the small GTPase Rac1 into membrane lipid rafts, which is necessary for cell migration in response to a CXCL12 gradient (Wysoczynski, Reza et al. 2005). Freret, Gouel et al. (2011) also found that inactivation of Rac1 can interfere with the mechanisms involved in receptor internalization modulating the chemotactic response to CXCL12 by regulating the internalization of CXCR4, and thus may control mechanisms involve in B-type ALL cell dissemination.

Shen, Bendall et al. (2001) and Spiegel, Kollet et al. (2004) have demonstrated that down regulation of CXCR4 following exposure to high doses of CXCL12 results in significant inhibition of ALL cell homing to the BM. Kato, Niwa et al. (2011) verified that hepatomegaly in ALL patients are not only due to random infiltration but rather the result of CXCL12/CXCR4 axis-dependent migration and expansion of leukemic cells in the hepatic niche. These data indicate that the this axis stimulates not only migration but also proliferation of ALL leukemic cells *in vivo* and *in vitro*, but also implied the importance of

targeting the extramedullary microenvironment to prevent recurrence from minimal residual disease in the extramedullary microenvironment.

The role for this axis in the infiltration of extramedullary sites, which commonly express significant levels of CXCL12 (Muller, Homey et al. 2001) is supported by the association between high expression of CXCR4 by ALL cells and extramedullary organ invasiveness (Crazzolara et al, 2001), and the inhibition of extramedullary disease by treatment with CXCR4 antagonists. (Juarez, Dela Pena et al. 2007). So, the binding of CXCL12-CXCR4 is one of the key interactions that take place between human ALL cells and bone marrow stroma, and the high expression of the chemokine receptor CXCR4 is of predictive value for early relapse in ALL childhood (Schneider, Vasse et al. 2002).

The differences in the signalling mechanisms utilized by ALL cells and normal haematopoietic stem cells (HSC) raises the possibility of differentially regulating the trafficking of ALL cells and thereby providing novel therapeutic applications. While both normal HSC and B cell progenitors shared a dependence on PI-3K signaling (Kim, Hangoc et al. 1999; Zhang, Wang et al. 2001), ALL cells demonstrated only a minor involvement of this pathway, with signaling through mitogen-activated protein kinases (p38MAPK) dominating (Bendall, Baraz et al. 2005; Juarez, Thien et al. 2009).

Zhang, Wang et al. (2001) demonstrated that the cytoplasmic tyrosine kinase, JAK2, is involved in CXCR4 receptor-mediated signaling through PI3-kinase and that JAK2 appears to be required for the CXCL12 induced migration of hematopoietic progenitor cells. These results suggest that JAK2 is required for the tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins, and for cell migration in hematopoietic progenitor cells.

The expression of CXCL12 imposes a survival potential for hematopoietic cells due to activation of PI-3K-AKT-NF- κ B and MAPK pathways (Bendall, Baraz et al., 2005; Wang, Park et al., 2000). In addition, it has also been shown that signal transducer and activators (STATs) are activated upon binding of CXCL12 to CXCR4 (Vila-Coro, Rodriguez-Frade et al. 1999; Kato, Iwama et al. 2005).

Shen, Bendall et al. (2001) previously demonstrated that signalling through PI-3K is necessary for CXCL12-induced activation of very late antigen 4

(VLA-4) and increased adhesion of cells to vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and fibronectin. In addition, it has been shown that VLA-4 function is essential for the BM homing of ALL cells (Shen, Bendall et al. 2001; Spiegel, Kollet et al. 2004).

1.3 The CXCL12/CXCR4 axis as a potential therapeutic target

The lack of efficacy of treatment can be partly attributed to the fact that leukemia cells are protected by their microenvironment. Leukemic cells residing in BM niches are provided with favorable conditions for their growth and survival (Bradstock, Makrynika et al. 2000; Nagasawa 2006) and thereby escape from chemotherapy-induced death (Mishra, Zhang et al. 2006). In this context, several studies suggested that chemokine analogues or antagonists could be used as adjuvant with conventional therapies to improve treatment of ALL.

Additionally to the fact that BM stromal niche can protect ALL cells against the cytotoxicity of chemotherapeutic agents also it is a possible source of relapse. Since CXCL12/CXCR4 axis is a major determinant in the crosstalk between leukemic cells and BM stroma, the development of new drugs and approaches for the treatment of relapse remains an important goal for improved cure rates (Parameswaran, Yu et al. 2011). Kato, Niwa et al. (2011) showed that functions of the niche are maintained by the CXCL12/CXCR4 axis, proposing a novel therapeutic approach targeting by inhibition of these molecules. It was demonstrated that the liver dissemination of leukemia is not due to nonselective infiltration, but rather systematic invasion and proliferation of leukemic cells in hepatic niche. These findings formed the basis for therapeutic approaches that target the extramedullary niche by inhibiting the CXCL12/CXCR4 axis.

Mowafi, Cagigi et al. (2008) demonstrated that the addition of recombinant CXCL12 increases the proliferation of B-ALL cells in culture and induces a decrease internalization of the receptor CXCR4 on the surface. However, does not occur receptor desensitization and this process does not interfere in cell proliferation. They believed that CXCL12 in childhood ALL deserves further study to clarify both the role of this chemokine in the pathogenesis of ALL and the possibility of modulating signaling directed by CXCL12.

The CXCR4 could be a potential therapeutic target, since it has been shown that this receptor neutralization enhances apoptosis and decreases proliferation in a experimental model of human non-Hodgkin's lymphoma (NHL) (Bertolini, Dell'Agnola et al. 2002). Konoplev, Jorgensen et al. (2011) concluded that the activated form of CXCR4 (Haribabu, Richardson et al. 1997; Signoret, Oldridge et al. 1997) is directly related to metastasis progression and provides independent prognostic information in adult patients with ALL, independently of other prognostic parameters. This observation is potentially important in both clinically and in therapy as anti-CXCR4 has currently been evaluated and can be added to current chemotherapy protocols designed for patients with ALL. Hatse, Princen et al. (2002) showed that a small-molecule CXCR4 antagonist, AMD3100 inhibited the internalization of CXCR4, the calcium influx and chemotaxis of ALL cells, proving that it is an antagonist rather than agonist CXCR4. Kato, Niwa et al. (2011), developed a therapeutic model where AMD3100 prevented repopulation of extramedullary ALL cells after chemotherapy and dramatically improved overall survival in mice treated with AMD3100. They found that no AMD3100 administration, some leukemia cells remaining in the portal region in liver after chemotherapy contribute to relapse of leukemia.

Some authors has proposed that CXCR4 could be a potential therapeutic target (Table 1), in this context Juarez, Bradstock et al. (2003) demonstrated that polyphemusin II peptide analogues T140, T134 and TC14012, and the bicyclam, AMD3100, are potent inhibitors of CXCL12-mediated chemotaxis and BM stromal-dependent proliferation of precursor B ALL cells. They examined, in other study, the ability of CXCR4 antagonists to disrupt the interaction between precursor B ALL cells and their supportive niche in vivo and found that blocking CXCL12/CXCR4 interactions resulted in rapid mobilization of leukemic cells into the PB and in significant reduction in the expansion of precursor B ALL in a mice model (Juarez, Dela Pena et al. 2007).

In a therapeutic model developed by (Kato, Niwa et al. 2011), the AMD3100 prevented extramedullary relapse of leukemic cells after chemotherapy and improved the overall survival in AMD3100-treated mice. Importantly, without AMD3100 administration, a few leukemic cells remaining in

the liver portal region after chemotherapy and appeared too contributed to the relapse of leukemia.

Although higher levels of CXCR4 expression have been shown to correlate with shorter survival of patients, effective drugs affecting cell surface CXCR4 expression are still unknown. Matsumoto, Jimi et al. (2010) examined the effects of a synthetic retinoid Am80 on CXCR4 expression of cultured T-ALL cells. They observed that the drug inhibited surface CXCR4 expression and CXCL12-induced chemotaxis by the acceleration of CXCR4 internalization. Therefore, Am80 may be an effective drug to inhibit the extramedullary infiltration of T-ALL cells.

Parameswaran, Yu et al. (2011) investigated the use of AMD11070 (also known as AMD070 or 070), a novel small-molecule antagonist of CXCR4, as an ALL-sensitizing agent. This compound effectively blocked stromal-induced migration of human ALL cells in culture and disrupted pre-established adhesion to stroma. They also demonstrated that combined treatment with this antagonist may be of significant benefit in eradicating residual leukemia cells at locations where they would otherwise be protected by stroma.

Disruption of ALL cell microenvironmental interaction could be used to enhance the effectiveness of chemotherapeutic agents due loss of protection by the stroma. The treatment with AMD3100 causes the remaining leukemic cells in peripheral blood for a longer time than normal hematopoietic progenitors, prolonging exposure to chemotherapeutic agents. Finally, AMD3100 increases the proportion of cells in the circulation that are actively cycling, a factor that is likely to increase sensitivity to cell cycle dependent agents commonly used for the treatment of ALL, such as Vincristine (Welschinger, Liedtke et al. 2013).

Among other cytokines, interleukin-8 is highly expressed in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells refractory to chemotherapy. The IL-8 could be one NF-kB target gene involved in the progression of T-ALL and the characterization of molecular mechanisms leading to IL-8 upregulation could be relevant to elucidate the development of T-ALL and design new therapeutic strategies (Scupoli, Donadelli et al. 2008). They determined that the activity of NF-kB and AP-1 transcription factors are central to induced IL-8 expression. The involvement of NF-kB is of particular interest as this transcription factor and a key molecule in the establishment of T-ALL and, as a consequence, its

inhibiting agents are considered attractive candidates to T-ALL treatment (Vilimas, Mascarenhas et al. 2007).

Understanding the mechanisms by which ALL cells disseminate may provide information to assist in developing therapeutic strategies based on the specific targeting of ALL cell trafficking. Therefore, in a general manner, this review provide informations relating to ALL cell biology, focus specifically in a cytokine-receptor important axis, the CXCL12/CXCR4 one, that may have implications for development of novel treatment strategies to improve life expectancy of patients with this neoplasia.

Table 1- CXCR4 receptor as a target in ALL treatment

Drug	Model	Autor	Country	Year
AMD3100	Human and murine cells culture	Hatse, Princen et al.	Belgium	2002
T140, T134, TC140012 and AMD3100	Leukemic blasts of patients, human and murine cells culture	Juarez, Bradstock et al.	Australian	2003
AMD3100 and TC140012	Leukemic blasts of patients and murine cell culture	Juarez, Dela Pena et al.	Australian	2007
Am80	Human cell culture	Matsumoto, Jimi et al.	Japan	2010
AMD3100	Murine	Kato, Niwa et al.	Japan	2011
AMD11070 (AMD070 or 070)	Mice transplanted with human ALL cells	Parameswaran, Yu et al.	USA	2011
AMD 3100	NOD/SCID xenograft model of ALL and BALB/c mice	Welschinger ,Liedtke et al.	Australian	2013

AMD3100 (Plerixafor® or Mozobil™)

References

- Bendall, L. J., R. Baraz, et al. (2005). "Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1alpha in acute lymphoblastic leukemia." *Cancer Res* **65**(8): 3290-3298.
- Bertolini, F., C. Dell'Agnola, et al. (2002). "CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma." *Cancer Res* **62**(11): 3106-3112.
- Bleul, C. C., R. C. Fuhlbrigge, et al. (1996). "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." *J Exp Med* **184**(3): 1101-1109.
- Bradstock, K. F., V. Makrynika, et al. (2000). "Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers." *Leukemia* **14**(5): 882-888.
- Burns, J. M., B. C. Summers, et al. (2006). "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." *J Exp Med* **203**(9): 2201-2213.

Cabioglu, N., A. Sahin, et al. (2005). "Chemokine receptor CXCR4 expression in breast cancer as a potential predictive marker of isolated tumor cells in bone marrow." Clin Exp Metastasis **22**(1): 39-46.

Crazzolaro, R., A. Kreczy, et al. (2001). "High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia." Br J Haematol **115**(3): 545-553.

De Oliveira Cavassin, G. G., F. L. De Lucca, et al. (2004). "Molecular investigation of the stromal cell-derived factor-1 chemokine in lymphoid leukemia and lymphoma patients from Brazil." Blood Cells Mol Dis **33**(1): 90-93.

De Oliveira, C. E., G. G. Cavassin, et al. (2007). "Stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in blood donors and chronic myelogenous leukemia patients." J Clin Lab Anal **21**(1): 49-54.

De Oliveira, K. B., J. M. Oda, et al. (2009). "CXCL12 rs1801157 polymorphism in patients with breast cancer, Hodgkin's lymphoma, and non-Hodgkin's lymphoma." J Clin Lab Anal **23**(6): 387-393.

De Vasconcellos, J. F., A. B. Laranjeira, et al. (2011). "Increased CCL2 and IL-8 in the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia." Pediatr Blood Cancer **56**(4): 568-577.

Do Val Carneiro, J. L., S. L. Nixdorf, et al. (2009). "Plasma malondialdehyde levels and CXCR4 expression in peripheral blood cells of breast cancer patients." J Cancer Res Clin Oncol **135**(8): 997-1004.

Einsiedel, H. G., A. von Stackelberg, et al. (2005). "Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87." J Clin Oncol **23**(31): 7942-7950.

Freret, M., F. Gouel, et al. (2011). "Rac-1 GTPase controls the capacity of human leukaemic lymphoblasts to migrate on fibronectin in response to SDF-1alpha (CXCL12)." Leuk Res **35**(7): 971-973.

Ganju, R. K., S. A. Brubaker, et al. (1998). "The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways." J Biol Chem **273**(36): 23169-23175.

Gleissner, B., N. Gokbuget, et al. (2002). "Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis." Blood **99**(5): 1536-1543.

Glodek, A. M., Y. Le, et al. (2007). "Focal adhesion kinase is required for CXCL12-induced chemotactic and pro-adhesive responses in hematopoietic precursor cells." Leukemia **21**(8): 1723-1732.

Haribabu, B., R. M. Richardson, et al. (1997). "Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization." J Biol Chem **272**(45): 28726-28731.

Hatse, S., K. Princen, et al. (2002). "Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4." FEBS Lett **527**(1-3): 255-262.

Heisterkamp, N., C. Morris, et al. (1989). "ABR, an active BCR-related gene." Nucleic Acids Res **17**(21): 8821-8831.

Hosking, F. J., E. Papaemmanuil, et al. (2010). "Genome-wide homozygosity signatures and childhood acute lymphoblastic leukemia risk." Blood **115**(22): 4472-4477.

Imai, K., M. Kobayashi, et al. (1999). "Selective secretion of chemoattractants for haemopoietic progenitor cells by bone marrow endothelial cells: a possible role in homing of haemopoietic progenitor cells to bone marrow." Br J Haematol **106**(4): 905-911.

INCA. (2012). "Instituto Nacional de Câncer (INCA) (Brasil). Câncer no Brasil: estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil."

Iwamoto, S., K. Mihara, et al. (2007). "Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase." J Clin Invest **117**(4): 1049-1057.

Jemal, A., R. Siegel, et al. (2009). "Cancer statistics, 2009." CA Cancer J Clin **59**(4): 225-249.

Juarez, J., K. F. Bradstock, et al. (2003). "Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells in vitro." Leukemia **17**(7): 1294-1300.

Juarez, J., A. Dela Pena, et al. (2007). "CXCR4 antagonists mobilize childhood acute lymphoblastic leukemia cells into the peripheral blood and inhibit engraftment." Leukemia **21**(6): 1249-1257.

Juarez, J. G., M. Thien, et al. (2009). "CXCR4 mediates the homing of B cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia cells to the bone marrow via activation of p38MAPK." Br J Haematol **145**(4): 491-499.

Kang, H., G. Watkins, et al. (2005). "The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer." Breast **14**(5): 360-367.

Kato, I., A. Niwa, et al. (2011). "Identification of hepatic niche harboring human acute lymphoblastic leukemic cells via the SDF-1/CXCR4 axis." PLoS One **6**(11): e27042.
Kato, Y., A. Iwama, et al. (2005). "Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis." J Exp Med **202**(1): 169-179.

Kim, C. H., G. Hangoc, et al. (1999). "Altered responsiveness to chemokines due to targeted disruption of SHIP." J Clin Invest **104**(12): 1751-1759.

Konoplev, S., J. L. Jorgensen, et al. (2011). "Phosphorylated CXCR4 is associated with poor survival in adults with B-acute lymphoblastic leukemia." Cancer **117**(20): 4689-4695.

LeBien, T. W. (2000). "Fates of human B-cell precursors." Blood **96**(1): 9-23.

Matsumoto, T., S. Jimi, et al. (2010). "Am80 inhibits stromal cell-derived factor-1-induced chemotaxis in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells." Leuk Lymphoma **51**(3): 507-514.

Mishra, S., B. Zhang, et al. (2006). "Resistance to imatinib of bcr/abl p190 lymphoblastic leukemia cells." Cancer Res **66**(10): 5387-5393.

- Mohle, R., M. Schittenhelm, et al. (2000). "Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia." Br J Haematol **110**(3): 563-572.
- Mowafi, F., A. Cagigi, et al. (2008). "Chemokine CXCL12 enhances proliferation in pre-B-ALL via STAT5 activation." Pediatr Blood Cancer **50**(4): 812-817.
- Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-56.
- Nagasawa, T. (2006). "Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development." Nat Rev Immunol **6**(2): 107-116.
- Nishii, K., N. Katayama, et al. (1999). "Survival of human leukaemic B-cell precursors is supported by stromal cells and cytokines: association with the expression of bcl-2 protein." Br J Haematol **105**(3): 701-710.
- Oda, J. M., K. B. de Oliveira, et al. (2012). "TGF-beta polymorphism and its expression correlated with CXCR4 expression in human breast cancer." Mol Biol Rep **39**(12): 10131-10137.
- Oyekunle, A. A., F. Castagnetti, et al. (2011). "F317L BCR-ABL1 kinase domain mutation associated with a sustained major molecular response in a CML patient on dasatinib." Leuk Res **35**(7): e118-120.
- Palmesino, E., B. Moepps, et al. (2006). "Differences in CXCR4-mediated signaling in B cells." Immunobiology **211**(5): 377-389.
- Parameswaran, R., M. Yu, et al. (2011). "Combination of drug therapy in acute lymphoblastic leukemia with a CXCR4 antagonist." Leukemia **25**(8): 1314-1323.
- Pui, C. H., M. V. Relling, et al. (2004). "Acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **350**(15): 1535-1548.
- Pui, C. H., L. L. Robison, et al. (2008). "Acute lymphoblastic leukaemia." Lancet **371**(9617): 1030-1043.
- Rombouts, E. J., B. Pavic, et al. (2004). "Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia." Blood **104**(2): 550-557.
- Sbaa-Ketata, E., M. Vasse, et al. (2001). "Fibronectin increases the migration induced by stromal cell-derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells." Eur Cytokine Netw **12**(2): 223-230.
- Schneider, P., M. Vasse, et al. (2002). "Is high expression of the chemokine receptor CXCR-4 of predictive value for early relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia?" Br J Haematol **119**(2): 579-580.
- Scupoli, M. T., M. Donadelli, et al. (2008). "Bone marrow stromal cells and the upregulation of interleukin-8 production in human T-cell acute lymphoblastic leukemia through the CXCL12/CXCR4 axis and the NF-kappaB and JNK/AP-1 pathways." Haematologica **93**(4): 524-532.

Shen, W., L. J. Bendall, et al. (2001). "The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow." Exp Hematol **29**(12): 1439-1447.

Signoret, N., J. Oldridge, et al. (1997). "Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4." J Cell Biol **139**(3): 651-664.

Society, A. C. (2012). American Cancer Society: Cancer Facts & Figures 2012. American Cancer Society. Atlanta - Georgia.

Spiegel, A., O. Kollet, et al. (2004). "Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling." Blood **103**(8): 2900-2907.

Stillier, C. A. and D. M. Parkin (1996). "Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer." Br Med Bull **52**(4): 682-703.

Tokoyoda, K., T. Egawa, et al. (2004). "Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development." Immunity **20**(6): 707-718.

Van Etten, R. A. (2007). "Aberrant cytokine signaling in leukemia." Oncogene **26**(47): 6738-6749.

Thomas, D. (2012). "Childhood Philadelphia-chromosome-positive B-lymphoblastic leukaemia." Lancet Oncol **13**(9): 860-862.

Van Etten, R. A. (2007). "Aberrant cytokine signaling in leukemia." Oncogene **26**(47): 6738-6749.

Vila-Coro, A. J., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (1999). "The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway." FASEB J **13**(13): 1699-1710.

Vilimas, T., J. Mascarenhas, et al. (2007). "Targeting the NF-kappaB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia." Nat Med **13**(1): 70-77.

Wang, J. F., I. W. Park, et al. (2000). "Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C." Blood **95**(8): 2505-2513.

Welschinger, R., F. Liedtke, et al. (2013). "Plerixafor (AMD3100) induces prolonged mobilization of acute lymphoblastic leukemia cells and increases the proportion of cycling cells in the blood in mice." Exp Hematol **41**(3): 293-302 e291.

Wysoczynski, M., R. Reca, et al. (2005). "Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient." Blood **105**(1): 40-48.

Zhang, X. F., J. F. Wang, et al. (2001). "Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells." Blood **97**(11): 3342-3348.

Artigo 2 - CXCL12 and TP53 genetic polymorphisms as markers of susceptibility in a Brazilian children population with acute lymphoblastic leukemia (ALL)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ A variante genética rs1801157 do gene *CXCL12* apresentou uma associação positiva com a suscetibilidade ao desenvolvimento da LLA na amostra deste trabalho.
- ✓ A variante genética rs1042522 do gene *TP53* também se mostrou positivamente associada ao desenvolvimento da LLA nesta amostra.
- ✓ Nossos resultados sugerem ainda que, na amostra deste trabalho, as variantes alélicas analisadas nos genes *CXCL12* e *TP53*, quando herdadas concomitantemente, podem ser fortes marcadores de suscetibilidade para a LLA.
- ✓ O parâmetro clínico alto/baixo risco não se mostrou diretamente associado à presença das variantes genéticas nos genes *CXCL12* e *TP53*, tanto de forma isolada quanto de forma combinada.
- ✓ Entretanto, nossos resultados podem indicar que a inclusão de novos marcadores moleculares seria de grande valia no acompanhamento da LLA, uma vez que pacientes inicialmente considerados de baixo risco evoluíram a óbito e eram portadores das duas mutações genéticas avaliadas neste trabalho.

5 BIBLIOGRAFIA

AIUTI, A. et al. "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." J Exp Med **185**(1): p.111-120, 1997.

ALMEIDA, J. R. C. P. "Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura." Revista Brasileira de Cancerologia **53**(3): p.305-316, 2007.

AOKI, M. N. et al. "CCR5 and p53 codon 72 gene polymorphisms: implications in breast cancer development." Int J Mol Med **23**(3): p.429-435, 2009.

ARICO, M., M. et al. "Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005." J Clin Oncol **28**(31): p.4755-4761, 2010.

BENDALL, L. J. et al. "Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1alpha in acute lymphoblastic leukemia." Cancer Res **65**(8): p.3290-3298, 2005.

BENNETE, J. M. et al. "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group." Br J Haematol **33**(4): p.451-458, 1976.

BERGAMASCHI, D. et al. "iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53." Nat Genet **38**(10): p.1133-1141, 2006.

BERTOLINI, F. et al. "CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma." Cancer Res **62**(11): p.3106-3112, 2002.

BLEUL, C. C. et al. "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." J Exp Med **184**(3): p.1101-1109, 1996.

BRADSTOCK, K. F. et al. "Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers." Leukemia **14**(5): p.882-888, 2000.

BURNS, J. M. et al. "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." J Exp Med **203**(9): p.2201-2213, 2006.

CABIOGLU, N. et al. "Chemokine receptor CXCR4 expression in breast cancer as a potential predictive marker of isolated tumor cells in bone marrow." Clin Exp Metastasis **22**(1): p.39-46, 2005.

CAZÉ, M. O.; BUENO, D.; SANTOS, M.E. "Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil." Rev HCPA **30**(1): p.5-12, 2010.

CHANG, H. et al. "Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia." Leuk Res **28**(1): p.43-48, 2004.

CRANS, H. N.; SAKAMOTO K. M. "Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia." Leukemia **15**(3): p.313-331, 2011.

- CRAZZOLARA, R. et al. "High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia." Br J Haematol **115**(3): p.545-553, 2001.
- CROOK, T. et al. "Sensitivity of p53 lysine mutants to ubiquitin-directed degradation targeted by human papillomavirus E6." Virology **217**(1): p.285-292, 1996.
- DE OLIVEIRA CAVASSIN, G. G. et al. "Molecular investigation of the stromal cell-derived factor-1 chemokine in lymphoid leukemia and lymphoma patients from Brazil." Blood Cells Mol Dis **33**(1): p.90-93, 2004.
- DE OLIVEIRA, C. E. et al. "Stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in blood donors and chronic myelogenous leukemia patients." J Clin Lab Anal **21**(1): p.49-54, 2007.
- DE OLIVEIRA et al. "CXCL12 rs1801157 polymorphism in patients with breast cancer, Hodgkin's lymphoma, and non-Hodgkin's lymphoma." J Clin Lab Anal **23**(6): p.387-393, 2009.
- DE SOUZA REIS, R. et al. "Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions." Pediatr. Blood Cancer **56**: p.58-64, 2011.
- DE VASCONCELLOS, J. F. et al. "Increased CCL2 and IL-8 in the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia." Pediatr Blood Cancer **56**(4): p.568-577, 2011.
- DE ZEN, L. et al. "Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification." Leukemia **14**(7): p.1225-1231, 2000.
- DO VAL CARNEIRO, J. L. et al. "Plasma malondialdehyde levels and CXCR4 expression in peripheral blood cells of breast cancer patients." J Cancer Res Clin Oncol **135**(8): p.997-1004, 2009.
- DUNNA, N. R. et al. "TP53 codon 72 polymorphism and risk of acute leukemia." Asian Pac J Cancer Prev **13**(1): p.347-350, 2012.
- EISIENDEL, H. G. et al. "Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87." J Clin Oncol **23**(31): p.7942-7950, 2005.
- EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. "Câncer de Mama: Marcadores Tumorais." Revista Brasileira de Cancerologia **47**(4): p.377-388, 2001.
- ESPARZA, S. D.; SAKAMOTO, K. M. "Topics in pediatric leukemia acute lymphoblastic leukemia." Med Gen Med **7**(1): p.23, 2005.
- FARIAS, M. G.; CASTRO S. M. "Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas." J Bras Patol Med Lab **40**(2): p.91-98, 2004.
- FERRARA, F. "Unanswered questions in acute myeloid leukaemia." Lancet Oncol **5**(7): p.443-450, 2004.
- FORD, A. M. et al. "In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias." Nature **363**(6427): p.358-360, 1993.

- GALE, K. B. et al. "Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): p.13950-13954, 1997.
- GLEISSNER, B. et al. "Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis." Blood **99**(5): p.1536-1543, 2002.
- GLODEK, A. M. et al. "Focal adhesion kinase is required for CXCL12-induced chemotactic and pro-adhesive responses in hematopoietic precursor cells." Leukemia **21**(8): p.1723-1732, 2007.
- GRAUX, C. et al. "Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast." Leukemia **20**(9): p.1496-1510, 2006.
- GREAVES, M. "In utero origins of childhood leukaemia." Early Hum Dev **81**(1): p.123-129, 2005.
- GREAVES, M. F. et al. "Leukemia in twins: lessons in natural history." Blood **102**(7): p.2321-2333, 2003.
- GREAVES, M. F.; WIEMELS, J. "Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia." Nat Rev Cancer **3**(9): p.639-649, 2003.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): p.57-70, 2000.
- HARIBABU, B. et al. "Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization." J Biol Chem **272**(45): p.28726-28731, 1997.
- HARRIS, N. L. et al. "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 **10**(12): p.1419-1432, 1999.
- HATSE, S. et al. "Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4." FEBS Lett **527**(1-3): p.255-262, 2002.
- HEISTERKAMP, N. et al. "ABR, an active BCR-related gene." Nucleic Acids Res **17**(21): p.8821-8831, 1989.
- HOEIJMAKERS, J. H. "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): p.366-374, 2001.
- HOSKING, F. J. et al. "Genome-wide homozygosity signatures and childhood acute lymphoblastic leukemia risk." Blood **115**(22): p.4472-4477, 2010.
- IMAI, K. et al. "Selective secretion of chemoattractants for haemopoietic progenitor cells by bone marrow endothelial cells: a possible role in homing of haemopoietic progenitor cells to bone marrow." Br J Haematol **106**(4): p.905-911, 1999.
- INCA. (2012). "Instituto Nacional de Câncer (INCA) (Brasil). Câncer no Brasil: estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil."
- IWAMOTO, S. et al. "Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase." J Clin Invest **117**(4): p.1049-1057, 2007.

- JANOWSKI, M. "Functional diversity of SDF-1 splicing variants." Cell Adh Migr **3**(3): p.243-249, 2009.
- JEMAL, A. et al. "Cancer statistics, 2009." CA Cancer J Clin **59**(4): p. 225-249, 2009.
- JUAREZ, J. et al. "Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells in vitro." Leukemia **17**(7): p.1294-1300, 2003.
- JUAREZ, J. et al. "CXCR4 antagonists mobilize childhood acute lymphoblastic leukemia cells into the peripheral blood and inhibit engraftment." Leukemia **21**(6): p.1249-1257, 2007.
- JUAREZ, J. G. et al. "CXCR4 mediates the homing of B cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia cells to the bone marrow via activation of p38MAPK." Br J Haematol **145**(4): p.491-499, 2009.
- KANG, H. et al. "The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer." Breast **14**(5): p.360-367, 2005.
- KATO, I. et al. "Identification of hepatic niche harboring human acute lymphoblastic leukemic cells via the SDF-1/CXCR4 axis." PLoS One **6**(11): e27042, 2011.
- KEBRIAIEI, P. et al. "Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification." Best Pract Res Clin Haematol **15**(4): p.597-621, 2003.
- KIETTHUBTHEW, S. et al. "The p53 codon 72 polymorphism and risk of oral cancer in Southern Thailand." Asian Pac J Cancer Prev **4**(3): p.209-214, 2003.
- KIM, C. H. et al. "Altered responsiveness to chemokines due to targeted disruption of SHIP." J Clin Invest **104**(12): p.1751-1759, 1999.
- KONOPLEV, S. et al. "Phosphorylated CXCR4 is associated with poor survival in adults with B-acute lymphoblastic leukemia." Cancer **117**(20): p.4689-4695, 2011.
- KUCIA, M. et al. "The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **54**(2): p.121-135, 2006.
- LI, C. K. et al. "Improved outcome of acute lymphoblastic leukaemia treated by delayed intensification in Hong Kong children: HKALL97 study." Hong Kong Med J **12**(1): p.33-39, 2006.
- LOWENBERG, B. "Prognostic factors in acute myeloid leukaemia." Best Pract Res Clin Haematol **14**(1): p.65-75, 2001.
- LUCIO, P. et al. "BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation." Leukemia **15**(8): p.1185-1192, 2001.
- MAIA, A. T. et al. "Identification of preleukemic precursors of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in cord blood." Genes Chromosomes Cancer **40**(1): p.38-43, 2004.
- MAIA, A. T. et al. "Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins." Leukemia **17**(11): p.2202-2206, 2003.

MEADOWS, A. T. "Curing cancer in children: minimizing price, maximizing value." J Clin Oncol **13**(8): p.1837-1839, 1995.

MEHTA, S. A. et al. "Negative regulation of chemokine receptor CXCR4 by tumor suppressor p53 in breast cancer cells: implications of p53 mutation or isoform expression on breast cancer cell invasion." Oncogene **26**(23): p.3329-3337, 2007.

MISHRA, S. et al. "Resistance to imatinib of bcr/abl p190 lymphoblastic leukemia cells." Cancer Res **66**(10): p.5387-5393, 2006.

MOHLE, R. et al. "Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia." Br J Haematol **110**(3): p.563-572, 2000.

MOWAFI, F. et al. "Chemokine CXCL12 enhances proliferation in pre-B-ALL via STAT5 activation." Pediatr Blood Cancer **50**(4): p.812-817, 2008.

MROZEK, K. et al. "Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia." Hematol Oncol Clin North Am **23**(5): p.991-1010, 2009.

MULLER, A. et al. "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): p.50-56, 2001.

NAGASAWA, T. "Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development." Nat Rev Immunol **6**(2): p.107-116, 2006.

NEIVA, K. et al. "The role of osteoblasts in regulating hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis." Braz J Med Biol Res **38**(10): p.1449-1454, 2005.

NISHII, K. et al. "Survival of human leukaemic B-cell precursors is supported by stromal cells and cytokines: association with the expression of bcl-2 protein." Br J Haematol **105**(3): p.701-710, 1999.

ODA, J. M. et al. "TGF-beta polymorphism and its expression correlated with CXCR4 expression in human breast cancer." Mol Biol Rep **39**(12): p.10131-10137, 2012.

PANKA, D. J. et al. "Effects of HDM2 antagonism on sunitinib resistance, p53 activation, SDF-1 induction, and tumor infiltration by CD11b+/Gr-1+ myeloid derived suppressor cells." Mol Cancer **12**: p.17, 2013.

PARAMESWARAN, R. et al. "Combination of drug therapy in acute lymphoblastic leukemia with a CXCR4 antagonist." Leukemia **25**(8): p.1314-1323, 2011.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. "Acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **339**(9): p.605-615, 1998.

PUI, C. H. et al. "Acute lymphoblastic leukaemia." Lancet **371**(9617): p.1030-1043, 2008.

PUI, C. H. "Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia." J Formos Med Assoc **109**(11): p.777-787, 2010.

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

REGO, M. F. et al. "Acute leukemias in Piauí: comparison with features observed in other regions of Brazil." Braz J Med Biol Res **36**(3): p.331-337, 2003.

ROMBOULTS, E. J. et al. "Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia." Blood **104**(2): p.550-557, 2004.

ROSSNER, P. et al. "Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival." J Cell Mol Med **13**(9B): p.3847-3857, 2009.

SCHNEIDER, P. et al. "Is high expression of the chemokine receptor CXCR-4 of predictive value for early relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia?" Br J Haematol **119**(2): p.579-580, 2002.

SIDDIQUE, M.; SABAPATHY, K. "Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism." Oncogene **25**(25): p.3489-3500, 2006.

SIGNORET, N. et al. "Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4." J Cell Biol **139**(3): p.651-664, 1997.

SILVA, D. M.; SADDI, V.A.; MOMOTUK, E.G. "Marcadores Moleculares relacionados ao câncer de mama não metastático." Revista Brasileira de Cancerologia **48**(1): p.39-48, 2002.

STASI, R. et al. "Contribution of immunophenotypic and genotypic analyses to the diagnosis of acute leukemia." Ann Hematol **71**(1): p.13-27, 1995.

SUN, X. et al. "CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression." Cancer Metastasis Rev **29**(4): p.709-722, 2010.

TADA, M. et al. "Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants." Carcinogenesis **22**(3): p.515-517, 2001.

TASHIRO, K. et al. "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins." Science **261**(5121): p.600-603, 1993.

THOMAS, D. "Childhood Philadelphia-chromosome-positive B-lymphoblastic leukaemia." Lancet Oncol **13**(9): p.860-862.

THOMAS, M. et al. "Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically." Mol Cell Biol **19**(2): p.1092-1100, 1999.

TOKOYODA, K. et al. "Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development." Immunity **20**(6): p.707-718, 2004.

VAN ETTEN, R. A. "Aberrant cytokine signaling in leukemia." Oncogene **26**(47): p.6738-6749.

VAN LOCHEM, E. G. et al. "Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts." Cytometry B Clin Cytom **60**(1): p.1-13, 2004.

VARDIMAN, J. W. et al. "The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes." Blood **114**(5): p.937-951, 2009.

VERMA, R. S.; TRIANTAFILOU, N. G. "Oncogenetic map of human genome." Cancer Genet Cytogenet **100**(1): p.88-90, 1998.

WEINBERG, R. A. "Tumor suppressor genes." Science **254**(5035): p.1138-1146, 1991.

WELSCHINGER, R. et al. "Plerixafor (AMD3100) induces prolonged mobilization of acute lymphoblastic leukemia cells and increases the proportion of cycling cells in the blood in mice." Exp Hematol **41**(3): p.293-302 e291, 2013.

WU, L. et al. Leukemias. Medscape General Medicine, 2007.

XIONG, Y. et al. "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases." Nature **366**(6456): p.701-704, 1993.

YAMAGUCHI, K. et al. "Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms." Am J Gastroenterol **92**(2): p.307-312, 1997.

YEOH, E. J. et al. "Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling." Cancer Cell **1**(2): p.133-143, 2002.

YEUDALL, W. A. et al. "Gain-of-function mutant p53 upregulates CXC chemokines and enhances cell migration." Carcinogenesis **33**(2): p.442-451, 2012.

ZHANG, X. F. et al. "Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells." Blood **97**(11): p.3342-3348, 2001.

ZOU, Y. R. et al. "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): p.595-599, 1998.

6 ANEXOS



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO a

A – Informações sobre a pesquisa:

Você está sendo convidada a participar, como voluntário, da pesquisa intitulada “**Análise da região 3’UTR da quimiocina SDF-1, expressão do receptor CXCR4: implicações na patogênese das neoplasias hematológicas**”, que tem por objetivo analisar um determinado tipo de alteração no organismo que pode influenciar na imunidade do paciente e conseqüentemente agravar a doença. Você será esclarecido sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar e informado de resultados que poderão trazer benefícios ou piora da sua doença. Na ocorrência destes resultados você será encaminhado a especialistas da área para as providências necessárias. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

Para esta análise será necessária a coleta de amostras de seu sangue, cujo procedimento de coleta está informado abaixo.

Solicitamos ainda, sua autorização para que seu sangue seja armazenado em um banco de material biológico, que quando aprovado, poderá ser utilizado em pesquisas futuras. O material será armazenado sob a guarda e responsabilidade da prof^a Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe, orientadora desta pesquisa, no laboratório de Genética Molecular–Imunologia, do Centro de Ciências Biológicas da UEL. A formação do banco é importante para os avanços nesta área e outros projetos de pesquisa poderão ser necessários para a complementação dos achados desta pesquisa.

Asseguramos que a cada nova pesquisa, novo projeto será enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da UEL e solicitado novo consentimento.

Sua participação ou autorização para constituição de um banco de material biológico não é obrigatória e sua recusa não acarretará nenhum prejuízo ao seu atendimento. Caso aceite participar e autorizar a formação do banco, sua autorização poderá ser retirada em qualquer fase da pesquisa. Também sem prejuízo ao seu atendimento.

B – Procedimentos de coleta do sangue:

A coleta de sangue será realizada por agulha conectada em tubo à vácuo. Serão colhidos 2 tubos de ensaio totalizando 10ml de sangue, que serão utilizados para análise das células e moléculas do sistema imunológico.

Este procedimento causará o desconforto normal de uma agulha, quando se realiza uma colheita de sangue.

C – 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 participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do coordenador do projeto de pesquisa, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

A coordenadora do projeto é a Prof^a. Aparecida de Lourdes Perim, que pode ser encontrada no endereço: Av Robert Koch, nº 60, Vila Operária, no Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel : (43) 3371-2332/2322.

Laboratório de Genética Molecular–Imunologia- prof^a Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe- Tel: (043) 3371-5728.

Comitê de Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina - CEP- Tel: (043) 3371-2490.

Londrina, ____ de _____, 200 ____.

Aparecida de Lourdes Perim
Pesquisadora responsável

Maria Angélica Ehara Watanabe
Orientadora responsável pelo laboratório
de Genética Molecular-Imunologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

“Análise da região 3’UTR da quimiocina SDF-1, expressão do receptor CXCR4: implicações na patogênese das neoplasias hematológicas”

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO b

D – Consentimento livre esclarecido e informado:

Eu, _____, RG _____, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecido pela pesquisadora dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada. Concordo em participar voluntariamente desse estudo **permitindo a colheita do sangue de meu filho(a)**, sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste serviço e que poderei solicitar esclarecimentos e informações a qualquer tempo.

Assinatura do responsável voluntário ou seu representante legal _____

D – Autorização para armazenamento das amostras de sangue:

Eu, _____, RG _____, autorizo o armazenamento das amostras em banco de amostra biológica e declaro que fui devidamente esclarecido pela pesquisadora dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada e de que a qualquer uso no futuro será solicitado novo consentimento e que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do responsável _____



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

“Análise da região 3’UTR da quimiocina SDF-1, expressão do receptor CXCR4: implicações na patogênese das neoplasias hematológicas”

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO c

D – Consentimento livre esclarecido e informado:

Eu, _____, RG _____, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecido pela pesquisadora dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada. Concordo em participar voluntariamente desse estudo **permitindo a colheita do meu sangue**, sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste serviço e que poderei solicitar esclarecimentos e informações a qualquer tempo.

Assinatura do responsável voluntário ou seu representante legal _____

D – Autorização para armazenamento das amostras de sangue:

Eu, _____, RG _____, autorizo o armazenamento das amostras em banco de amostra biológica e declaro que fui devidamente esclarecido pela pesquisadora dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada e de que a qualquer uso no futuro será solicitado novo consentimento e que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do responsável _____