



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIEL RUBENS MARQUES VIEIRA FILHO

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS NOS GENES
CCR5 (rs333) E *CXCL12* (rs1801157):
ASSOCIAÇÃO COM NEUROBLASTOMA PEDIÁTRICO**

DANIEL RUBENS MARQUES VIEIRA FILHO

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS NOS GENES
CCR5 (rs333) E *CXCL12* (rs1801157):
ASSOCIAÇÃO COM NEUROBLASTOMA PEDIÁTRICO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica
Ehara Watanabe

Co-orientadora: Profa. Dra. Roberta Losi
Guembarovski

Londrina
2019

DANIEL RUBENS MARQUES VIEIRA FILHO

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS NOS GENES *CCR5*
(rs333) E *CXCL12* (rs1801157):
ASSOCIAÇÃO COM NEUROBLASTOMA PEDIÁTRICO**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Ehara
Watanabe
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Danielle Venturini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de março de 2019.

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

Filho, Daniel.

Análise dos polimorfismos genéticos nos genes CCR5 (rs333) e CXCL12 (rs1801157) : Associação com neuroblastoma pediátrico / Daniel Filho. - Londrina, 2019.
66 f. : il.

Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe.

Coorientador: Roberta Losi Guembarovski.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2019. Inclui bibliografia.

1. Quimiocinas - Tese. 2. Tumores Pediátricos - Tese. 3. Prognóstico - Tese. 4. Neuroblastoma - Tese. I. Ehara Watanabe, Maria Angelica. II. Losi Guembarovski, Roberta. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ajudando a superar todos os desafios nesses anos como mestrando e a continuar lutando para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os professores por me proporcionarem o conhecimento, não apenas racional, mas para a construção do caráter e da afetividade durante todo esse processo de aprimoramento, pelo tanto que se dedicaram a mim, não somente no ensinamento, mas pelo aprendizado de vida.

Agradeço em especial minha orientadora professora Dra. Maria Angélica, pela recepção calorosa como seu orientando, pela paciência, cooperação e à imensa ajuda na conclusão deste processo.

Agradeço minha co-orientadora professora Dra. Roberta Losi, pela ligação surpresa convidando à iniciar essa jornada e o incentivo a querer melhorar mais e à expandir as áreas do conhecimento.

Agradeço pelo imenso apoio à professora Dra. Marla Karine, que esteve do meu lado durante todo esse processo, incentivando a não desistir e a continuar a lutar por esse projeto.

Agradeço ao aceite da professora Dra. Danielle Venturini em participar da banca desta tese, acrescentando ainda mais conhecimento à conclusão deste trabalho.

Aos meus pais e minhas irmãs, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Meus agradecimentos aos amigos, pela amizade que fez parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Quanto mais alto voamos, menores parecemos aos olhos daqueles que não sabem voar.”

– Friedrich Nietzsche

FILHO, Daniel Rubens Marques Vieira. **Análise dos polimorfismos genéticos nos genes CCR5 (rs333) e CXCL12 (rs1801157):** associação com neuroblastoma pediátrico. 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O câncer infantojuvenil corresponde à um grupo heterogêneo de doenças, apresentando características próprias tanto em relação à sua histologia quanto ao seu comportamento clínico. Dentre estas doenças, estão os tumores embrionários como os retinoblastomas, neuroblastomas e nefroblastomas, os quais são responsáveis por cerca de 20% de todos os tumores que acometem crianças e adolescentes. O neuroblastoma (NB) é uma neoplasia infantil heterogênea e particularmente maligna em seus estágios mais avançados, com propensão a formar metástase em órgãos selecionados e para os quais ainda não há tratamento eficaz disponível além da cirurgia. Evidências recentes indicam que as quimiocinas e seus receptores apresentam envolvimento como mediadores de neuroinflamação e têm papel neurofisiológico. Sabe-se que polimorfismos genéticos podem modificar funcionalmente ou quantitativamente um produto gênico, podendo estar associados ao desenvolvimento de diversos tumores malignos. Portanto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a possível influência de polimorfismos nos genes CCR5 e CXCL12 no NB, como possíveis candidatos a marcadores de suscetibilidade e prognóstico para esta doença. Foram selecionados 28 pacientes com diagnóstico de NB e 140 crianças livres de neoplasia e as amostras foram genotipadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) para o polimorfismo rs333 do gene CCR5 e por PCR seguida da análise do comprimento do fragmento de restrição para o polimorfismo do gene CXCL12. Em seguida, foi verificado se estas variantes alélicas estavam associadas ao NB. Para os portadores do polimorfismo rs333 (delta32) verificou-se diferença significativa ($p = 0,0004$) e para CXCL12 houve diferença estatisticamente significativa para o genótipo em homozigose 3'A/3'A ($p = 0,0001$) e portador do alelo ($p = 0,0001$) em relação à suscetibilidade nos pacientes com NB. A influência das variantes polimórficas em relação aos parâmetros prognósticos do NB não mostrou resultados significativos para os dois genes: CCR5- comprometimento de linfonodos e / ou metástases ($p = 0,82$), estadiamento tumoral ($p = 0,86$) e óbito ($p = 0,66$); CXCL12 comprometimento de linfonodos e/ou metástase ($p = 0,23$) estadiamento tumoral ($p = 0,34$) e óbito ($p = 0,14$). No presente estudo foi verificado que os polimorfismos CCR5 (rs333) e CXCL12 (rs1801157) estão associados à suscetibilidade ao NB e merecem atenção em investigações futuras envolvendo um maior número amostral.

Palavras-chave: Quimiocinas. Receptores de quimiocinas. Tumores pediátricos. Prognóstico. Suscetibilidade. CXCL12. CCR5. Neuroblastoma.

FILHO, Daniel Rubens Marques Vieira. **Analysis of genetic polymorphisms in CCR5 (rs333) and CXCL12 (rs1801157) genes:** association with pediatric neuroblastoma. 2019. 65 p. Dissertation (Master's degree in Clinical and Laboratory Physiopathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Child-juvenile cancer corresponds to a heterogeneous group of diseases, presenting characteristics both in relation to its histology and its clinical behavior. Among these tumors are embryonic tumors, such as retinoblastomas, neuroblastomas and nephroblastomas, which account for about 20% of all tumors affecting children and adolescents. Neuroblastoma (NB) is a heterogeneous and particularly malignant childhood neoplasm in its higher stages, with a propensity to form metastasis in selected organs and for which there is still no effective treatment available besides surgery. Recent evidence indicates that chemokines and their receptors are involved as mediators of neuroinflammation and have a neurophysiological role. It is known that genetic polymorphisms can functionally or quantitatively modify a gene product and may be associated with the development of several malignant tumors. Therefore, the objectives of the present study were to evaluate the possible influence of polymorphisms in CCR5 and CXCL12 genes in NB, as potential candidates for susceptibility and prognostic markers for this disease. We selected 28 patients with a diagnosis of NB and 140 children free of neoplasia and the samples were genotyped by conventional PCR (polymerase chain reaction) for the polymorphism rs333 of the CCR5 gene and by PCR followed by analysis of the fragment length of restriction for the CXCL12 gene polymorphism. Next, it was verified whether these allelic variants were associated with NB. A significant difference ($p = 0,0004$) was observed for the D32 (polymorphic deletion in the CCR5) and for CXCL12 there was a statistically significant difference for the 3'A / 3'A genotype ($p = 0,0001$) and for allelic frequency ($p = 0,0001$) in relation to NB susceptibility. The influence of polymorphic variants on NB prognostic parameters did not show significant results for the two genes: CCR5 - lymph node involvement and / or metastasis ($p = 0.82$), tumor staging ($p = 0.86$) and death ($p = 0.66$); CXCL12 lymph node involvement and / or metastasis ($p = 0.23$) tumor staging ($p = 0.34$) and death ($p = 0.14$). The polymorphisms evaluated in CCR5 (rs333) and CXCL12 (rs1801157) may be associated with NB susceptibility, which deserves attention in future investigations involving a larger sample number.

Keywords: Chemokines. Chemokine receptors. Pediatric tumors. Prognosis. Successiveness. CXCL12. CCR5. Neuroblastoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Nomenclatura para as quimiocinas e seus receptores.....	20
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Categorias e subgrupos dos tumores neuroblásticos.....	15
Quadro 2 – Estadiamento do NB: International Neuroblastoma Staging System (INSS)	16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALK	Linfoma Anaplásico Quinase
BARD1	
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCL5	Quimiocina CC Ligante 5
CCR5	Quimiocina CC Receptor 5
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CXCL12	Quimiocina CXC Ligante 12
CXCR4	Quimiocina CXC Receptor 4
CXCR7	Quimiocina CXC Receptor 7
CICI	Classificação Internacional do Câncer Infantil
COG	Grupo Cooperativo Multicêntrico de Oncologia Pediátrica
D32	Polimorfismo Delta 32 (rs333)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ERK1/2	
GN	Ganglioneuroma
GNBi	Ganglioneuroblastoma intermediário
GNBn	Ganglioneuroblastoma nodular
HCL	Hospital do Câncer de Londrina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMA	Ácido Homovanílico
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de Confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
INPC	Comitê Internacional de Patologia do Neuroblastoma
INSS	Sistema Internacional de Estadiamento do Neuroblastoma
LDH	Desidrogenase Láctica
MYCN	
NB	Neuroblastoma
NK	Natural Killer

OR	Odds Ratio
PBSF	Fator Estimador de Crescimento de Células B
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RFLP	
PHOX2B	
PROPPG	Programa de Pós-Graduação
RCBP	Registros de Câncer de Base Populacional
SAME	
SDF1	Fator Derivado de Células Estromais 1
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF – alfa	Fator de Necrose Tumoral alfa
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VMA	Ácido Vanilmandélico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Neuroblastoma	13
1.2	Quimiocinas	18
1.3	Receptor CCR5	20
1.4	Quimiocina CXCL12	23
1.5	Envolvimento do CCR5 e CXCL12 no neuroblastoma	25
2	OBJETIVO	28
2.1	Objetivo Geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	METODOLOGIA	29
3.1	Aspectos éticos	29
3.2	Seleção e caracterização da amostra	29
3.3	Extração de DNA	30
3.4	Genotipagem do polimorfismo do <i>CCR5</i> (rs333)	30
3.5	Genotipagem do polimorfismo do <i>CXCL12</i> (rs1801157)	31
3.6	Análise estatística	31
4	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	32
5	CONCLUSÃO	46
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
7	REFERÊNCIAS	48
8	ANEXOS	60
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos	60
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	65

1 INTRODUÇÃO

O câncer em crianças e adolescentes (faixa etária entre 0 a 19 anos) corresponde à um grupo heterogêneo de doenças, apresentando características próprias tanto em relação à sua histologia quanto ao seu comportamento clínico (LITTLE, J., 1999). Quando comparado ao câncer em adultos, sua incidência é rara, correspondendo entre 2% a 3% de todas neoplasias malignas registradas no Brasil (INCA, 2017).

Em relação às suas características, diferem dos tumores malignos em adultos por apresentarem locais primários, origem histológica e sinais clínicos distintos, sendo que seu estudo deve ser individualizado. Grande parte dos tumores na infância e adolescência apresentam características histológicas semelhantes aos tecidos fetais em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo considerados tumores embrionários, gerando grande diversidade morfológica devido às constantes transformações e diferenciações celulares (SAÚDE, M. D., 2017).

O câncer infantojuvenil torna-se de difícil diagnóstico devido à sua grande variedade de apresentações clínicas, muitas vezes apresentando sinais e sintomas inespecíficos, comuns a outras doenças benignas, como febre prolongada, vômitos, emagrecimento, sangramentos, adenomegalias generalizadas, dor óssea inespecífica e palidez, o que dificulta sua localização. Devido a tais características, torna-se importante o desenvolvimento de programas de diagnóstico precoce do câncer infantil, por meio de estratégias de programas de Saúde da Família na atenção básica (SAÚDE, M. D., 2017).

A Classificação Internacional do Câncer Infantil (CICI), devido a diferenças morfológicas nos tumores infantis, divide o câncer infantojuvenil em 12 grupos e seus respectivos subgrupos: I) leucemias, doenças mieloproliferativas e doenças mielodisplásicas; II) linfomas e neoplasias reticuloendoteliais; III) tumores do sistema nervoso central (SNC) e miscelânea de neoplasias intracraniais e intraespinhais; IV) tumores do sistema nervoso simpático; V) retinoblastoma; VI) tumores renais; VII) tumores hepáticos; VIII) tumores ósseos malignos; IX) sarcomas de partes moles; X) neoplasias de células germinativas, trofoblásticas e outras gonadais; XI) carcinomas e outras neoplasias malignas epiteliais; XII) outros tumores malignos não especificados (INCA, 2017).

A estimativa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da

Silva (INCA), para o Brasil, era que em 2016 houvesse a ocorrência de 12.600 novos casos de câncer em crianças e adolescentes até 19 anos, sendo as regiões Sudeste e Nordeste apresentando os maiores números de casos novos (6050 e 2750, respectivamente), seguidas pelas regiões Sul (1320 casos novos), Centro Oeste (1270 casos novos) e Norte (1210 casos novos).

De acordo com informações dos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), o percentual de neoplasias foi de 2% na população de zero a 14 anos e de 3% quando se levou em consideração a população de zero a 19 anos. A maior frequência foi de leucemia em ambos os grupos (33,2% e 25,6%, respectivamente). Na faixa etária de 0 a 14 anos, os tumores de SNC representam a segunda posição (16%), seguido dos linfomas (13,7%). Já entre a faixa etária de 0 a 19 anos, os tumores do grupo XI da CICI (outras neoplasias malignas epiteliais) ocupam a segunda posição com 14,1%, seguido pelos linfomas e tumores do SNC (13,6% e 13,3%, respectivamente) (SAÚDE, M. D., 2017)

Em relação a sua mortalidade, as neoplasias infantis ocuparam a segunda posição de óbitos em crianças e adolescentes de 0 a 19 anos no Brasil em 2014 (7%), somente sendo ultrapassada por mortes por causas externas, sendo a doença que mais matou nessa faixa etária (SAÚDE, M. D., 2016)

Os tumores embrionários, como os retinoblastomas, NB e nefroblastomas, são responsáveis por cerca de 20% de todos os tumores infantojuvenis, quase nunca acometendo outras faixas etárias (INCA, 2017).

Os tumores do sistema nervoso simpático (grupo IV), de acordo com a CICI, classificam-se em: IVa) NB e ganglioneuroblastoma; IVb) outros tumores de células nervosas periféricas. No Brasil, esses tumores representaram 4,3% das neoplasias malignas infantojuvenis, sendo o NB o tumor sólido extracraniano mais frequente, com seu pico etário em menores de 4 anos (INCA, 2017).

1.1 Neuroblastoma

NB são tumores do sistema nervoso simpático, provenientes de tecidos neurais derivados da crista neural e que se mantiveram indiferenciados ou se tornaram indiferenciados após atingir sua localização periférica. Logo, são células nervosas indiferenciadas, que originam a parte medular da glândula adrenal e todo os gânglios e plexos simpáticos. Podem se desenvolver, em ordem decrescente de

incidência, na adrenal, região paravertebral do retroperitônio, mediastino posterior, pelve e pescoço. A variedade de localização e as diferenças entre os graus de diferenciação histopatológico, faz com que o NB apresente muitas características clínicas e patológicas (GROSFELD, J. L., 1998).

Em neonatos e em crianças menores de 18 meses, pode ter um bom prognóstico e até remissão espontânea, mesmo em tumores metastáticos. Contudo, em crianças maiores de 18 meses, apresenta uma biologia desfavorável (FISHER, J. P. H. e TWEDDLE, D. A., 2012). Possui uma prevalência maior em crianças menores de 4 anos (85%), seguido de 8% em crianças até 9 anos e 1,5% após os 15 anos de idade (NAVALKELE, P. *et al.*, 2011). Aproximadamente 45% são classificados de alto risco, sendo metastáticos ao diagnóstico (LONDON, W. B. *et al.*, 2005)

Os sintomas do NB refletem sua localização primária no paciente, assim como a extensão de sua doença e metástases. Pacientes com tumores localizados podem ser assintomáticos, porém aqueles com doença avançada podem apresentar sintomas sistêmicos, muitas vezes inespecíficos. Entre os sintomas, podem incluir: massa abdominal (retroperitoneal e hepática), dor abdominal e constipação, proptose, equimose periorbital (“olhos de guaxinin”), síndrome de Horner (miose, ptose e anidrose), dor lombar associado à fraqueza (compressão espinhal), escoliose, disfunção vesical, nódulos subcutâneos palpáveis, síndrome de Opsoclonus-Mioclonus (caracterizado por movimentos oculares rápidos, irregulares e descontrolados dos olhos – opsoclonia - e dos músculos – mioclonia), diarreia secretória inexplicada (devido à liberação de polipeptídeo instestinal vasoativo), dor óssea, anemia, heterocromia de íris, hipertensão arterial, obstrução nasal unilateral e sintomas sistêmicos, como febre e perda de peso (GOLDEN, C. B. e FEUSNER, J. H., 2002)

A classificação patológica dos tumores neuroblásticos, primeiramente descrita por Shimada e colaboradores e revista posteriormente pelo Comitê Internacional de Patologia do Neuroblastoma (INPC), divide o NB em 4 categorias (tabela 1): NB – tumor pobre em estroma de Schwann, ganglioneuroblastoma intermediário (GNBi) – tumor rico em estroma de Schwann, ganglioneuroma (GN) – tumor com predomínio de estroma de Schwann e ganglioneuroblastoma nodular (GNBn) – tumor composto: parte tipo NB e parte tipo ganglioneuroma ou ganglioneuroblastoma intermediário (Quadro 1) (SHIMADA, H. *et*

al., 2001).

Evolução ganglioneuromatosa (células de Schwann)	Classificação – INPC (*)	
	Classificação – Shimada	Categorias e subtipos
Nenhuma → mínima Nenhuma a < 50% do tecido tumoral > 50% do tecido tumoral	Estroma-pobre Indiferenciado Pobremente diferenciado Em diferenciação	Neuroblastoma (Estroma de células de Schwann: pobre)
	Estroma-rico Intermediário	Ganglioneuroblastoma, intermediário (Estroma de células de Schwann: rico)
Dominante Proporção variável entre áreas com estroma de células de Schwann rico / dominante / pobre (nodular)	Estroma-rico Bem diferenciado Ganglioneuroma	Ganglioneuroma (Estroma de células de Schwann: dominante)
	Estroma-rico Nodular	Ganglioneuroblastoma, nodular (Estroma de células de Schwann: composto [rico, dominante e pobre])

Quadro 1 – Categorias e subgrupos dos tumores neuroblásticos

Fonte: SHIMADA, H. *et al.* (2001)

O estadio do NB (1, 2A, 2B, 3, 4 e 4S) depende do tamanho do tumor primário, da possibilidade de ressecção cirúrgica, do envolvimento de gânglios regionais e da presença de metástase à distância (CASTLEBERRY, R. P. *et al.*, 1997). No quadro 2 temos os estadios clínicos aceitos pelo Sistema Internacional de Estadio do NB – INSS (BRODEUR, G. M. *et al.*, 1993), sendo que no estadio 4S, o “S” representa a palavra “especial” (“special” em inglês), representando a grande maioria dos tumores de regressão espontânea, ocorrendo em crianças menores de 1 ano, mesmo para os tumores de grande volume, assim como para apresentações metastáticas para pele, fígado e medula óssea (D'ANGIO, G. J., EVANS, A. E. e KOOP, C. E., 1971).

Quadro 2 – Estadiamento do NB: *International Neuroblastoma Staging*

Estádios	Caracterização
1	Tumor localizado, confinado à área de origem; remoção macroscopicamente completa, com ou sem doença residual microscópica; linfonodos ipsi e contralaterais identificados livres de comprometimento neoplásico
2^A	Tumor unilateral com remoção macroscopicamente incompleta; linfonodos ipsi e contralaterais identificados livres de comprometimento neoplásico
2B	Tumor unilateral com remoção macroscopicamente completa ou incompleta; linfonodos ipsilaterais comprometidos; linfonodos contralaterais identificados livres de comprometimento neoplásico
3	Tumor infiltrando-se através da linha mediana, com ou sem envolvimento regional de linfonodos; ou tumor unilateral, com envolvimento contralateral de linfonodos; ou ainda, tumor de linha média, com envolvimento bilateral de linfonodos
4	Disseminação do tumor a linfonodos distantes, ossos, medula óssea, fígado ou outros órgãos (exceto como definido em 4S)
4S	Tumor primário localizado conforme definido para estádios 1 ou 2, com disseminação metastática limitada a fígado, pele e medula óssea (infiltração ≤ 10% das células neoplásicas)

System (INSS)

Fonte: BRODEUR, G. M. *et al.* (1993)

Porém, elementos clínicos e o estadiamento tumoral não são suficientes para determinar aqueles tumores de prognóstico ruim. Os que tem doença progressiva e morte, independente da quimioterapia instituída, revelaram amplificação do oncogene MYCN, que não representa o padrão biológico dos estágios 4S (GARVIN, J. J., BENDIT, I. e NISEN, P. D., 1990; SCHMIDT, M. L. *et al.*, 2000). A amplificação do oncogene MYCN (localizado no braço curto do cromossomo 2 – 2p24) codifica um fator de transcrição que provoca um atraso na diferenciação celular, promovendo a replicação e a apoptose, com um balanço final que favorece a replicação (SCHWAB, M. *et al.*, 1983). Brouder e colaboradores demonstraram a correlação da amplificação do MYCN, com os estádios mais avançados da doença, apresentando rápida progressão tumoral associada a mau prognóstico, mesmo nos pacientes com baixa idade e para tumores não metastáticos (BRODEUR, G. *et al.*, 1984).

A deleção do braço curto do cromossomo 1 (incluindo 1p36), é uma anomalia genética congênita comum no NB e apresenta-se com maior frequência

em crianças com a forma avançada da doença e pior evolução dos casos. É controverso seu valor como variável independente do prognóstico da doença, uma vez que está muito relacionado com a amplificação do MYCN. Porém, apesar desta correlação entre a deleção 1p36 e a presença da amplificação, sua associação não foi rigorosamente comprovada (CARON, H. *et al.*, 1996).

Os NBs estão associados com a presença de vários marcadores, com importância na detecção de doença ativa e verificação de seu controle. Os mais importantes são as catecolaminas (dopamina e norepinefrina) e seus metabólitos (ácidos vanilmandélico - VMA e homovanílico - HMA). Crianças maiores de 12 meses ao diagnóstico, estadio 4 e tipo histológico mais agressivo, estão relacionados com altos níveis urinários de dopamina e norepinefrina e seus metabólitos, sugerindo associação com a possibilidade de bloqueio do metabolismo da dopamina nesses casos (ZAMBRANO, E. e REYES-MÚGICA, M., 2002). A relação entre as dosagens de VMA/HMA > 1, demonstra um prognóstico mais favorável com a síntese de catecolamina mais madura, associado a tumores de provável origem congênita, idades menores e estadios limitados (EVANS, A., 2000).

Idade acima de 1 ano ao diagnóstico e doença disseminada para medula óssea são fatores que indicam pior prognóstico. O grau de risco representado por esses dois fatores é tão importante quanto outros fatores como a amplificação do oncogene MYCN, classificação histológica de Shimada, níveis séricos de ferritina, desidrogenase láctica sérico (LDH) e ácidos vanilmandélico e homovanílico (SCHMIDT, M. L. *et al.*, 2000).

Uma das limitações no estadiamento do NB em países de baixa e média renda, é a dificuldade em avaliar a amplificação do MYCN. Levando-se em consideração esta dificuldade, pode-se considerar o uso de LDH e ferritina séricos, como marcadores associados à amplificação nos estadios 3 e 4, sendo recomendado a intensificação do tratamento para valores de LDH > 750UI/L e de ferritina > 120ng/mL (PARIKH, N. S. *et al.*, 2015).

Apesar dos estudos sobre a origem genética do NB nas últimas décadas, ainda se tem pouco conhecimento sobre os eventos que induzem sua gênese tumoral. Alguns fatores de transcrição têm sido envolvidos na patogênese do NB pelo aumento de proliferação celular. Estes incluem o fator kappa-light-chain-enhancer das células B ativadas (NF-κB), paired-like homeobox 2b (PHOX2B), TP53 e MYCN (STAFMAN, L. L. e BEIERLE, E. A., 2016).

Assim como outras neoplasias malignas, o NB pode ter características familiares ou esporádicas. Em relação aos casos familiares, mutações que ativam a tirosinoquinase associada ao oncogene de linfomas anaplásicos (ALK), estão correlacionadas com a maioria dos casos hereditários da doença. Estas mutações germinativas codificadas pela substituição de bases em regiões chave de quinases, resultam em ativações dessas quinases, levando a um estado pré-maligno (MOSSÉ, Y. P. *et al.*, 2008).

Nos casos de doenças esporádicas, o grupo cooperativo multicêntrico de oncologia pediátrica (COG) tem demonstrado que polimorfismos comuns isolados dentro dos genes FLJ22536, BRCA1-associated RING domain protein 1 (BARD1) e NBPF23, aumentam a suscetibilidade da doença, porém o número de loci de suscetibilidade não é conhecido e nem se estes polimorfismos atuam de modo aditivo ou sinérgico (epistático) (MARIS, J. M., 2010).

Sabe-se que a patogênese do câncer é iniciada e modulada pela interação entre a transformação das células malignas, o estroma e a resposta inata e adquirida do sistema imunológico. Estas interações são complexas e os componentes do sistema imune atuam tanto na defesa quanto na contribuição da iniciação, crescimento, potencial invasivo e desenvolvimento de metástase (YAQUB, S. e AANDAHL, E. M., 2009).

O microambiente tumoral é complexo e difícil de ser decifrado, mas sua compreensão é fundamental para o desenvolvimento de novos marcadores e estratégias terapêuticas (FRIDMAN, W. H. *et al.*, 2011)

1.2 Quimiocinas

Os mecanismos que interrelacionam os processos inflamatórios, a imunidade e o câncer têm sido discutidos. Mediadores solúveis produzidos pelas células tumorais recrutam e ativam células inflamatórias que estimulam a progressão tumoral. Importantes componentes nesta integração são as citocinas produzidas pelas células ativadas do sistema imune inato ou adaptativo, que estimulam o crescimento tumoral e a progressão do câncer (CHENSUE, S. W., 2001; LIN, W.-W. e KARIN, M., 2007). Estudos sobre os aspectos imunológicos que envolvem o microambiente tumoral dos NB ainda são limitados na literatura, o que ressalta a importância de novos estudos.

As quimiocinas ganharam destaque científico nas últimas décadas, uma vez que desempenham funções cruciais no desenvolvimento de diferentes doenças e processos patológicos, incluindo a inflamação, doenças autoimunes, doenças infecciosas como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) causada pelo HIV, e no câncer, onde particularmente regulam o processo de metástase (ZLOTNIK, A., 2006).

Desde as décadas de 60-70, foram caracterizadas mais de 50 quimiocinas humanas e muitos homólogos em murinos. O termo quimiocina foi aplicado a estas moléculas, pois se acreditava que sua principal atividade biológica era de quimiotaxia, ou seja, direcionar o movimento de outras células durante os processos inflamatórios. Posteriormente tornou-se evidente que seus efeitos se estendem muito além de atrair leucócitos aos sítios de inflamação. Evidências indicaram que as quimiocinas participam do desenvolvimento dos órgãos, na angiogênese, na recirculação dos leucócitos e na regulação imunológica (BAGGIOLINI, M., DEWALD, B. e MOSER, B., 1994; CHENSUE, S. W., 2001; LUSTER, A. D., 1998; LUSTER, A. D., GREENBERG, S. M. e LEDER, P., 1995; SARAFI, M. N. *et al.*, 1997; WALZ, A. *et al.*, 1989; YOSHIMURA, T. *et al.*, 1987).

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas (~8-14kDa) com função de mensageiros intercelulares, as quais carregam sinais regulatórios de célula para célula. Produzidas por vários tipos celulares, tanto constitutivamente quanto após indução, exercem seus efeitos de maneira autócrina ou parácrina e agem via receptores em heptahélice acoplados à proteína G (BAGGIOLINI, M., 2001). São proteínas constituídas de 70 a 130 aminoácidos com quatro resíduos de cisteína conservados (BAGGIOLINI, M., DEWALD, B. e MOSER, B., 1994). Como proteínas secretórias, são sintetizadas com uma sequência guia de 20-25 aminoácidos, a qual é retirada antes de sua liberação (BAGGIOLINI, M., 2001).

Duas famílias principais, CXC e CC, também conhecidas como α e β quimiocinas respectivamente, são distinguidas de acordo com a posição dos dois primeiros resíduos de cisteína, os quais são separados por um aminoácido variável (CXC) ou são adjacentes (CC). As cisteínas formam duas pontes dissulfeto (Cys1 \rightarrow Cys3 e Cys2 \rightarrow Cys4), o que confere às quimiocinas sua estrutura tridimensional. As pontes dissulfeto mantêm as regiões amino terminais juntas, o que é essencial para sua atividade biológica (BAGGIOLINI, M., 2001).

Uma nomenclatura sistemática para as quimiocinas e para seus

receptores tornou-se necessária com a descoberta de muitas moléculas novas. Esta classificação baseia-se no princípio estabelecido para os receptores na Conferência Gordon em Citocinas Quimiotáticas de 1966. Os receptores são definidos como CXC, CC, XC e CX3C, seguidos pela letra R (receptor) e um número. As quimiocinas são definidas seguindo o mesmo padrão, baseado em sua estrutura, seguidas pela letra L (ligante) e pelo número de seu gene (PELUS, L. M. *et al.*, 2002), como demonstrado na Figura 1.

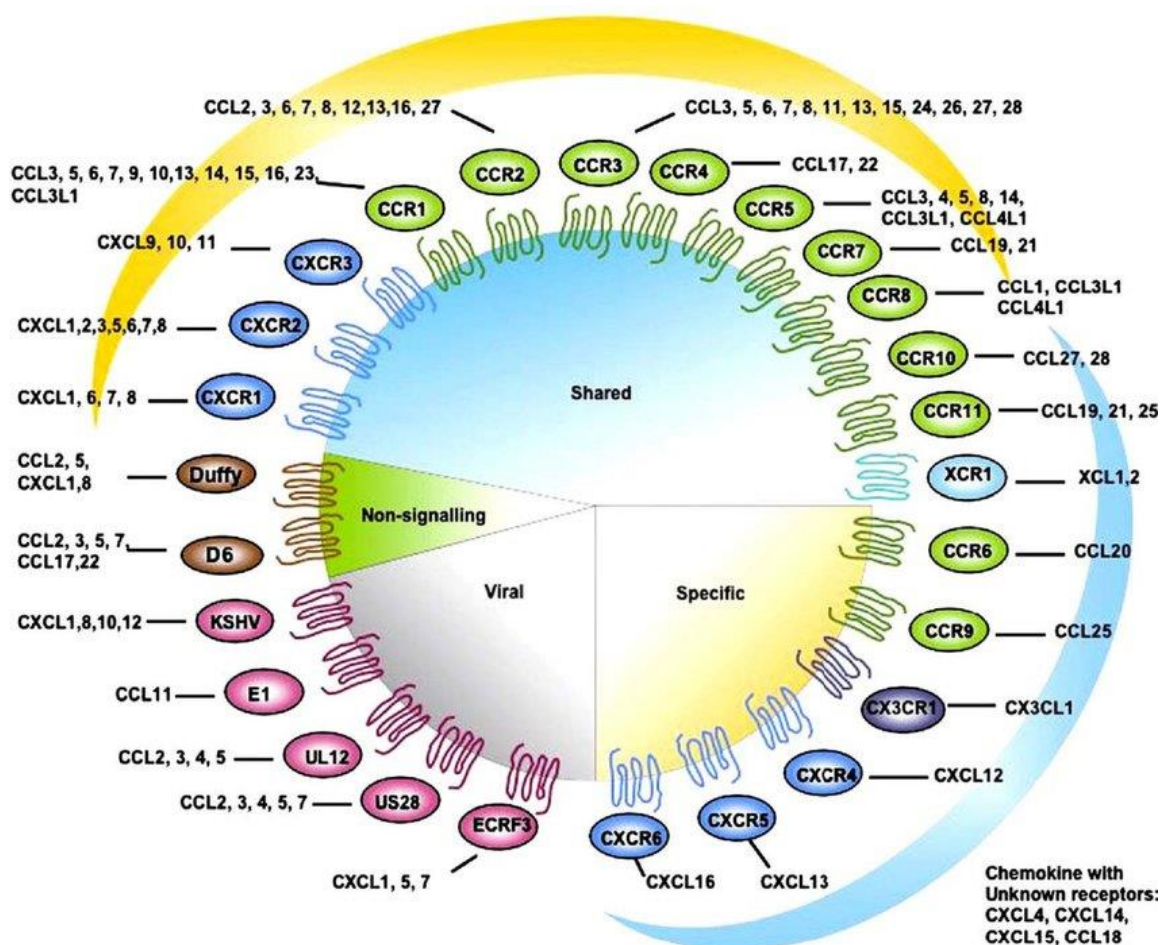


Figura 1– Nomenclatura para as quimiocinas e seus receptores

Fonte: (BALKWILL, F. (2004); SLETTENAAR, V. I. e WILSON, J. L. (2006)); modificada pelo próprio autor.

1.3 Receptor CCR5

Quimiocinas quando ligadas aos seus receptores podem induzir uma série de reações em cascata intracelulares que podem regular a migração de

células. Alguns relatos indicam que a expressão de receptores de quimiocinas em muitas células tumorais não é aleatória e pode ter um papel no processo de metástase (ZLOTNIK, A., 2006).

Tem sido discutido que o receptor CCR5 pode, também, apresentar um efeito indireto sobre a progressão de tumores, por meio do controle de uma resposta imune antitumoral (MANES, S. *et al.*, 2003), e que a retenção de células T no local do tumor parece ser mediada por mecanismos dependentes de CCR5 da célula imune e do tumor.

VAN DEVENTER, H. W. *et al.* (2005) mostraram que camundongos com metástase pulmonar de melanoma, que expressam CCR5, apresentam crescimento tumoral e resposta inadequada à terapia, quando comparados com camundongos knockout para CCR5. Os autores demonstraram que a expressão de CCR5 em células estromais contribuiu para o processo de metástase.

Com relação a importância do eixo CCL5/CCR5 na carcinogênese mamária, foi demonstrado que células endoteliais progenitoras, derivadas da medula óssea, requerem o receptor CCR5 para promoção de angiogênese. Nesse estudo, a supressão do eixo CCL5/CCR5, na medula óssea, levou a diminuição do crescimento tumoral. Surpreendentemente, a restauração deste na medula óssea, não reverteu o crescimento tumoral. Tais achados sugerem que as células endoteliais do microambiente tumoral necessitam de CCL5 produzido diretamente pelas células tumorais para promover angiogênese (SAX, M. J. *et al.*, 2016).

O CCR5 também está envolvido na metastatização de condrossarcomas (TANG, X. Y. *et al.*, 2010) e de células de tumor oral (CHUANG, J. Y. *et al.*, 2009), bem como no contexto hematopoiético, a expressão de CCR5 correlaciona-se com a capacidade agressiva das doenças linfoproliferativas tipo NK-cell, tanto para se infiltrar em múltiplos órgãos (MAKISHIMA, H. *et al.*, 2007), bem como contribuindo para o crescimento de células do mieloma múltiplo (MENU, E. *et al.*, 2006).

A interação entre CCL5/CCR5 pode favorecer o desenvolvimento tumoral de várias maneiras: agindo como fator de crescimento, estimulando a angiogênese, modulando a matriz extracelular, induzindo o recrutamento de células inflamatórias e estromais adicionais, e fazendo parte de mecanismos de evasão imune (KERSHAW, M. H., WESTWOOD, J. A. e DARCY, P. K., 2013).

Um polimorfismo no gene CCR5 foi identificado, consistindo na

deleção de 32 pares de bases, sendo denominado de CCR5-delta32 (rs333) (LIU, R. *et al.*, 1996). Esta variante resulta em uma forma não funcional de receptor, impedindo sua interação com suas quimiocinas ligantes (SIDOTI, A. *et al.*, 2005; SMITH, M. W. *et al.*, 1997).

A variante delta32 é comum entre Europeus caucasóides (frequência alélica variando entre 0,05 - 0,15), porém rara ou ausente na maioria dos outros grupos étnicos, como nativos africanos e ameríndios (MARTINSON, J. J. *et al.*, 1997; MCNICHOLL, J. M. *et al.*, 1997). A ausência desta variante também foi relatada na população nativa da América do Sul, como populações nativas da Amazônia Brasileira (CHIES, J. A. B. e HUTZ, M. H., 2003; LEBOUTE, A. P., DE CARVALHO, M. W. e SIMOES, A. L., 1999), e em Asiáticos (CHANG, H. Y. *et al.*, 2005; O'BRIEN, S. J. e MOORE, J. P., 2000; WANG, F.-S. *et al.*, 2003).

Estudos sustentam que a deleção poderia estar associada à resistência à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana - HIV (DEAN, M. *et al.*, 1996; SAMSON, M. *et al.*, 1996; ZUNIGA, J. A. *et al.*, 2003), e que pacientes portadores desse alelo poderiam ter melhor prognóstico na leishmaniose (BRAJAO DE OLIVEIRA, K. *et al.*, 2007), na esclerose múltipla (KAIMEN-MACIEL, D. R. *et al.*, 2007), no lúpus eritematoso sistêmico (BALTUS, T. H. L. *et al.*, 2016) na asma em crianças com infecção por *Mycoplasma pneumoniae* (UNGVARI, I. *et al.*, 2007) e na rejeição de enxerto renal em modelos animais (KRÜGER, B. *et al.*, 2007).

De um modo geral, a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares da patogênese do câncer é extremamente importante para o desenvolvimento de novas abordagens e para o tratamento desta doença. Estudos mostram que as células e seus receptores desempenham um papel essencial em processos moleculares e fisiológicos (AOKI, M. N. *et al.*, 2009; DO VAL CARNEIRO, J. L. *et al.*, 2009). Assim, o câncer é uma doença complexa, onde muitas alterações merecem uma abordagem molecular aprofundada. A interação entre quimiocinas e seus receptores depende da interação com moléculas de sinalização por células do sistema imunológico e não imunológico, e este pode ser modificado por alterações genéticas relacionadas a polimorfismos, expressão gênica e proteica. O CCR5 no câncer poderia influenciar na progressão, formação tumoral e prognóstico, mas essa influência ainda não está elucidada.

Com base no que foi relatado e frente ao fato de que recentemente tem sido explorado o papel do receptor CCR5 no microambiente tumoral, neste

estudo, pretende-se investigar sua relação à suscetibilidade e ao prognóstico do NB.

1.4 Quimiocina CXCL12

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

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

Tanto CXCL12 α quanto CXCL12 β possuem afinidade comparável ao receptor CXCR4. Este receptor encontra-se altamente expresso em células de progenitores hematopoiéticos na medula óssea e também na superfície de monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos B e T. Além das células, CXCR4 é também detectado nas células do endotélio vascular e de órgãos como cérebro, pulmão, e muitos outros (RATAJCZAK, M. Z. *et al.*, 2006). Estudos com animais knockout têm estabelecido a importante função de CXCL12 e CXCR4 na embriogênese, pois apresentam defeito significativo na colonização da medula

óssea embrionária por células estaminais, além de apresentarem defeitos no desenvolvimento do coração, cérebro e grandes vasos (LAZARINI, F. *et al.*, 2003; TACHIBANA, K. *et al.*, 1998; YU, L. *et al.*, 2006).

A interação CXCL12/CXCR4 ativa vários sinais intracelulares, incluindo a mobilização de cálcio e ativação de quinases (ERK1/2), que são reguladas por sinais extracelulares via p44/p42; e como resultado final, essa interação leva à quimiotaxia celular (ROLAND, J. *et al.*, 2003). Acreditava-se que a interação CXCL12/CXCR4 era exclusiva, até que outro receptor, CXCR7, foi descrito com uma forte afinidade à CXCL12 (BALABANIAN, K. *et al.*, 2005). A ausência de CXCR7 em animais knockouts é também letal para o embrião, porém, diferente do que ocorre na deficiência de CXCR4, não foi observado nenhum comprometimento no sistema de células hematopoiética fetal (SIERRO, F. *et al.*, 2007). Apesar da identificação deste novo receptor, a importância da interação CXCR4/CXCL12 no homing, mobilização e estabelecimento do microambiente da medula óssea permanece evidente (GEORGIU, K. R., FOSTER, B. K. e XIAN, C. J., 2010).

Além da importante função do eixo CXCL12/CXCR4 na regulação do tráfego de células hematopoiéticas, esta quimiocina e seu receptor estão associados à patogênese de diversas malignidades, como o câncer de mama (BOIMEL, P. J. *et al.*, 2012), de pâncreas (WU, P. F. *et al.*, 2013), de próstata (SINGH, S., SADANANDAM, A. e SINGH, R. K., 2007) e também em malignidades hematológicas como as leucemias (DE OLIVEIRA, C. E. *et al.*, 2007; PELED, A. e TAVOR, S., 2013).

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

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

resposta antitumoral da imunidade inata e adaptativa (GIL, M. *et al.*, 2013).

A análise de sequências do gene *CXCL12* humano (número de acesso do *GenBank* L36033) revelou uma variante comum contendo uma transição G para A num segmento evolutivamente conservado da região 3' UTR não traduzida (3'-UTR). Este polimorfismo foi designado como CXCL12-3'A (SDF1-3'A, rs1801157). O alelo CXCL12-3'A pode desempenhar um papel regulador importante aumentando a produção de CXCL12 (WINKLER, C. *et al.*, 1998).

Estudos já descrevem o eixo CXCL12/CXCR4 como um candidato promissor a marcador tumoral, especialmente no processo metastático (DOMANSKA, U. M. *et al.*, 2013). MEIER, R. *et al.* (2007) investigaram a contribuição do CXCR4 em relação a progressão do NB in vivo e in vitro e demonstraram que a superexpressão do CXCR4 poderia promover tumores primários e secundários, porém não conseguiram demonstrar sua influência no poder de invasão do NB. Além disso, também já foi demonstrada a participação do eixo CXCR4/CXCL12 em neoplasias, incluindo no desenvolvimento do meduloblastoma (OZAWA, P. M. M. *et al.*, 2016). No entanto há necessidade de estudos adicionais, visto seu potencial clínico nesse tipo de câncer pediátrico específico, sendo útil a verificação de alguns parâmetros ligados ao polimorfismo e à expressão das moléculas desse eixo.

Dentro deste contexto, a quimiocina CXCL12 no câncer poderia influenciar a progressão, formação tumoral e prognóstico, mas essa influência ainda não está elucidada. Assim, a compreensão de seu papel no microambiente tumoral poderá sugerir esta molécula como um novo marcador para o prognóstico, e até mesmo para o tratamento do NB.

1.5 Envolvimento do CCR5 e CXCL12 no neuroblastoma

É conhecido que as quimiocinas e seus receptores apresentam envolvimento como mediadores da neuroinflamação e têm um papel neurofisiológico, particularmente no controle da migração neuronal durante o desenvolvimento cerebral (Zou *et al.*, 1998). É importante salientar que uma determinada quimiocina pode estimular respostas diferentes, dependendo do receptor ao qual ela se liga, bem como das células nas quais esses receptores são expressos (LEGLER, D. F. e THELEN, M., 2018).

O CCL5, um ligante do CCR5, pode induzir a migração e a diferenciação de células do eixo dorsal embrionário (BOLIN, L. M. *et al.*, 1998), indicando que esse receptor pode mediar os efeitos tróficos nos neurônios.

Há o entendimento que a sinalização de quimiocinas desempenham papel importante no embrião em desenvolvimento. CARTIER, L. *et al.* (2003) estudaram exclusivamente o efeito da ativação de CCR5 em uma população homogênea de células e relataram pela primeira vez a apoptose induzida por CCR5 em células neuronais. Seus resultados sugerem que o CCR5 possa desempenhar um papel duplo na neurodegeneração inflamatória. Sua regulação positiva na microglia ativada leva ao aumento da inflamação e, junto com a secreção de ligantes do CCR5 pela microglia, originando uma alça de controle positivo autócrino. No entanto, além dessa amplificação da resposta inflamatória, os ligantes de CCR5 secretados pela microglia (juntamente com outros produtos da microglia, como espécies reativas de oxigênio e TNF-alfa) também contribuem diretamente para a morte celular.

Uma observação interessante é que os receptores de quimiocinas demonstraram ser expressos em células cerebrais humanas de tecidos adultos ou fetais (MENNICKEN, F. *et al.*, 1999). Isso nos levou a investigar se esse polimorfismo estaria associado ao NB, o qual é um tumor de origem embrionária.

GROSS, N. e MEIER, R. (2009) relataram que a quimiocina CXCL12 e seus receptores CXCR4 e CXCR7 participam da progressão e sobrevivência dos tumores neuroectodérmicos, com ênfase particular no NB, considerado o enigmático tumor neuroectodérmico da infância.

MÜHLETHALER-MOTTET, A. *et al.* (2015) realizaram investigações no homing state particular da disseminação metastática das células do NB, onde ocorre o envolvimento dos receptores CXCR4 e CXCR7 que tem CXCL12 como um ligante. Os autores mostraram que os receptores CXCR4 e CXCR7 influenciam a migração de células do NB de maneira complexa. O CXCR4 favorece o implante de células do NB no pulmão e no fígado, enquanto o CXCR7 aumenta a disseminação para o fígado e a glândula adrenal, e ambos os receptores aumentam a infiltração tumoral na medula óssea.

Curiosamente, a sinalização de CCR5 poderia regular as respostas induzidas por CXCL12 de células progenitoras B em medula óssea humana por dessensibilização do receptor de quimiocina CXCR4 (HONCZARENKO, M. *et al.*,

2002).

Dentro do que foi aqui exposto, fica clara a importância da quimiocina CXCL12 e do receptor CCR5 no contexto dos NB e, portanto, o objetivo deste estudo foi verificar se polimorfismos nos genes CCR5 e CXCL12 estão associados à suscetibilidade e/ou prognóstico destes tumores malignos na infância.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Verificar se polimorfismos nos genes CCR5 (rs333) e CXCL12 (rs181157) estão associados à suscetibilidade e/ou prognóstico do neuroblastoma na população infantojuvenil.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o polimorfismo genético rs333 do CCR5 em pacientes com NB e em um grupo controle livre de neoplasias em um estudo de associação do tipo caso-controle.
- Analisar o polimorfismo genético rs1801157 do CXCL12 em pacientes com NB e grupo controle livre de neoplasias em um estudo de associação do tipo caso-controle.
- Realizar análise de correlação entre estas variantes alélicas selecionadas e parâmetros prognósticos dos pacientes com NB, na busca por possíveis marcadores de prognóstico.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O presente projeto foi cadastrado na Plataforma Brasil e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP/UEL 189/2013 – CAAE Nº 73557317.0.0000.5231). Todos os responsáveis legais dos indivíduos do estudo foram orientados e somente foram utilizadas amostras de pacientes autorizados por seus responsáveis mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 Seleção e caracterização da amostra

Este é um estudo caso controle, com amostra de conveniência.

Foram coletados 5 mL do sangue periférico de 8 pacientes e analisados 20 blocos de parafina de pacientes de 0 a 19 anos diagnosticados com NB atendidos no Hospital do Câncer de Londrina (HCL) e no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU – UEL) e 140 controles com faixa etária similar ao grupo caso, que foram coletados no HU – UEL.

O convite aos responsáveis pelos pacientes NB para participarem deste projeto foi realizado durante seu atendimento clínico no Serviço de Oncopediatria do HCL, sendo os diagnósticos fornecidos pelo Laboratório de Anatomia Patológica do HCL e também foi realizada análise retrospectiva de blocos de parafina fornecidos pelo Laboratório de Patologia do HU - UEL, e os dados clínicos-patológicos foram provenientes pelo SAME-HU.

Os doadores para o grupo controle foram provenientes de crianças da região de Londrina provenientes do HU - UEL e como critério de inclusão foram selecionados doadores sem história de neoplasia atual e processos inflamatórios, com testes bioquímicos e imunológicos normais, realizados no Laboratório de Análises Clínicas – HU – UEL.

3.3 Extração de DNA

A partir do sangue periférico das amostras dos controles e pacientes, coletados em tubo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), foi extraído o DNA utilizando o kit comercial *Biopur MiniSpin Plus Kit* (*Biometrix Diagnostica*, Curitiba, Brasil), segundo as especificações do fabricante. O DNA extraído foi eluído em 50 µL de tampão de eluição e quantificado por espectrofotometria em aparelho *NanoDrop 2000c®* (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, DE, EUA).

As amostras de 20 pacientes foram coletadas em bloco de parafina e o DNA foi extraído através do kit *innuPREP DNA Mini* (*Analytik Jena*, Jena, Germany).

As absorvâncias, no comprimento de onda de 260 nm, foram utilizadas para determinar a concentração de ácidos nucleicos e a razão para determinar o grau de pureza em relação a proteínas foi entre as absorvâncias 260 e 280 nm.

3.4 Genotipagem do polimorfismo do *CCR5* (rs333)

Os *primers*, para o gene *CCR5* foram sintetizadas de acordo com as sequências depositadas no *GenBank*, sob número de acesso AF009962, e o protocolo das reações de PCR foram descritas por AOKI, M. N. *et al.* (2009).

As reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador Master cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) e consistiram de um ciclo com uma temperatura inicial de 94°C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de um minuto a 94°C para desnaturação, um minuto a 57°C para anelamento e um minuto a 72°C para extensão das fitas, e por fim uma temperatura de 72°C durante 10 minutos para uma extensão final. Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a não contaminação com ácidos nucleicos, e com um controle positivo, no qual se utilizou DNA de amostra previamente testada e positiva para a deleção.

3.5 Genotipagem do polimorfismo do *CXCL12* (rs1801157)

O polimorfismo do *CXCL12* (rs1801157, G/A) foi identificado pelo ensaio de PCR seguida pela análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP). A reação foi realizada em um volume final de 25µL usando 1X PCR buffer, dNTP (0,1 mM), 0,2 µM de cada primer: *sense* 5'-CAGTCAACCTGGGCAAAGCC-3' e *antisense* 5'CCTGAGAGTCCTTTTGCGG-3' (número de acesso do GenBank L36033), MgCl₂ 1,5 mM, 1,25U Taq polimerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) e 100 ng de DNA genômico. As condições de PCR foram: 5 min de desnaturação a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C e 10 min de alongamento a 72°C. Os amplicons contendo a região polimórfica do *CXCL12* foram digeridos com a enzima de restrição MspI (Promega, Madison, WI, EUA) por 3h a 37°C.

Todos os produtos de amplificação para *CCR5* e *CXCL12* e os fragmentos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de acrilamida (10%), detectados por coloração de prata.

3.6 Análise estatística

As variáveis categóricas foram expressas em números absolutos e os genótipos e as frequências alélicas foram determinadas pelo teste exato de Fisher. Odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram determinados para avaliar o estudo de associação caso-controle. Um p bilateral foi considerado significativo. Análises de correlação envolvendo a variante alélica e os parâmetros prognósticos foram realizadas pelo teste Tau b de Kendall (SPSS 20.0 Inc., Chicago, IL, EUA). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

4 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

CCR5 AND CXCL12 ALLELIC VARIANTS: ASSOCIATION WITH CHILDHOOD NEUROBLASTOMA SUSCEPTIBILITY

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is a heterogeneous and particularly malignant childhood neoplasm in its higher stages, prone to form metastasis in selected organs and for which there is still no efficient treatment available beyond surgery. Evidence indicates that chemokines and their receptors present involvement as mediators of neuroinflammation and have a neurophysiological role. In the present study, we aimed to verify if CCR5 (rs333) and CXCL12 (rs1801157) allelic variants were associated with NB. For CCR5 (rs333) D32 carriers (OR: 5.96, IC: 2.21 -16.06) and for CXCL12 genotype 3'A/3'A (OR:26.18, IC:6.15-111.4) there were statistically significant difference as well to allelic frequency (OR:4.20, IC: 2.19-8.03). Although no correlation was verified regarding prognostic parameters for both CCR5 and CXCL12 regarding polymorphic variants, these polymorphisms may be associated with NB susceptibility which deserve attention for future investigations.

Keywords: Neuroblastoma; CCR5; CXCL12; genetic polymorphism.

INTRODUCTION

Neuroblastomas (NB) are tumors originated from undifferentiated nerve cells of the neural crest, that originate the medular adrenal gland and all the sympathetic ganglia and plexuses, that can justify not only the preferential site but also its wide distribution through the body. NB is the neural tissue derived from the neural crest that remains or becomes undifferentiated after reaching its peripheral location (Grosfeld 1998). It is more prevalent in children younger than 4 years (85%), falling to 8% in children up to 9 years and 1.5% after 15 years old (Navalkele, O'Dorisio et al. 2011). Approximately 45% are classified as high risk, being metastatic when diagnosed (London, Castleberry et al. 2005).

It is known that chemokines and their receptors present involvement as mediators of neuroinflammation and have a neurophysiological role, particularly in the control of neuronal migration during brain development (Zou, Kottmann et al. 1998).

The classification of chemokine receptors is based on the type of their ligands. Thus, CXC receptors bind to CXC ligands, while CC receptors bind CC ligands, etc. (Balkwill 2004). It is important to emphasize that a given chemokine can stimulate different responses depending on the receptor to which it binds as well as the cells in which these receptors are expressed (Legler and Thelen 2018).

The CC chemokine receptor 5 (CCR5) is a chemokine-binding receptor, located in the plasmatic membrane through 7 turns and in the cytoplasm, is G protein (Raport, Gosling et al. 1996). This receiver performs its activity via G protein and binds to chemokines RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3) and MIP-1 β (CCL4) (Samson, Labbe et al. 1996).

It is known that the polymorphism rs333 in *CCR5* gene, a common 32-base pair deletion (D32), causes truncation and loss of this receptor on cell surface, with complete retention in the endoplasmic reticulum within homozygous or diminished expression in heterozygous genotype (Chelli and Alizon 2001). An interesting observation is that chemokine receptors have been shown to be expressed in human brain cells from adult or fetal tissues (Mennicken, Maki et al. 1999). This led us to investigate whether this polymorphism would be associated with NB, a tumor of embryonic origin.

Gross and Meier (2009) has reported on CXCL12 chemokine and its CXCR4

and CXCR7 receptors in the progression and survival of neuroectodermal tumors, with emphasis on NB, considered the enigmatic neuroectodermal childhood tumor. Sequence analysis of the human *CXCL12* gene (GenBank accession number L36033) revealed a common variant containing a G to A transition in an evolutionarily conserved segment of the 3' untranslated region (3'-UTR). This polymorphism has been designated as CXC12- 3'A (SDF1-3'A, rs1801157). The *CXCL12*-3'A allele may play an important regulatory role by increasing production of *CXCL12*, which binds to CXCR4 (Winkler, Modi et al. 1998).

Interestingly, *CCR5* signaling could regulate *CXCL12* induced responses of progenitor B cells in human bone marrow by desensitization of the *CXCR4* chemokine receptor (Honczarenko, Le et al. 2002). Therefore, the aim of the present study was to verify if polymorphisms in *CCR5* and *CXCL12* genes are associated with NB susceptibility and/or prognosis.

Materials and methods

Human subjects

Human Ethics Committee of the State University of Londrina, Paraná, Brazil, approved the present study (CAAE 73557317.0.0000.5231). Children's parents were informed in detail regarding the research, and the Consent Term was obtained.

The 28 tissue samples were obtained from NB patients, who had undergone surgery at the Londrina Cancer Hospital (LCH), Parana State, Brazil. As control group, peripheral blood from 140 cancer-free children, from University Hospital (UH) of State University of Londrina, Paraná, Brazil were also collected. Control group were taken from the same geographic region and without personal history of any malignant disease. Prognostic parameters data of NB were kindly provided by LCH. The parameters included: lymph nodes involvement and/or distant metastasis, tumor staging and death.

Genomic DNA extraction

DNA extraction for blood samples was obtained using Biopur Mini Spin kit (Biometrix Diagnostica®, Curitiba, PR, Brazil) and for paraffin embedded tissues the DNA was extracted using the innuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Jena, Germany), following the manufacturer's instructions. All DNA samples were quantified

by a NanoDrop2000® Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) at 260 nm. The 260/280 nm and 260/230 nm absorbance ratios were measured to assess protein and organic compound contamination, respectively.

***CCR5-delta32* polymorphism (rs333)**

CCR5-delta32 was determined by conventional polymerase chain reaction (PCR), using specific primers according GenBank sequences accession AF009962 following PCR conditions from Aoki, da Silva do Amaral Herrera et al. (2009). Genomic DNA (100 ng) was amplified using 1.25 units of Taq polymerase (Invitrogen™, Calsbad, CA, USA) at 25uL of final volume, in a Master Cycler Gradient thermal (Eppendorf, Hamburg, Germany). PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 57°C and 1 min at 72°C and 10 min of elongation at 72°C. Negative controls (without DNA) were employed to make sure that no contaminants were introduced.

***CXCL12* polymorphism (rs1801157)**

For *CXCL12* (rs1801157, G/A) polymorphism the polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) was used. PCR reaction for rs1801157 was performed in a final volume of 25µL using sense 5'-CAGTCAACCTGGGCAAAGCC-3' and antisense 5'CCTGAGAGTCCTTTTGCGG-3' primers (GenBank accession number L36033), using 1.25U *Taq* polymerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) and 100ng of genomic DNA. The PCR conditions were: 5min denaturation at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C, and 10min elongation at 72°C. Amplicons containing polymorphic region of *CXCL12* polymorphism were digested with restriction enzyme *MspI* (Promega, Madison, WI, USA) for 3h at 37°C.

All PCR amplicons and restriction fragments products were analyzed by electrophoresis in acrylamide gels (10%), detected by silver staining, *CXCL12* wild-type alleles (SDF1-wt) yielded 100 and 193 base-pair products, while SDF1-3'A alleles yielded a 293 base-pair product. *CCR5* wild-type alleles (wt/wt) yielded 225 base-pair products, heterozygous (wt/delta32) yields 225-bp and 193bp and homozygous yielded only 193bp.

Statistical analysis

Categorical variables were expressed as absolute numbers and genotypes and allele frequencies were determined using Fisher's exact test. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) were determined to evaluate case-control association study. A two-sided $p < 0.05$ was considered significant. Correlation analyses involving the allelic variant and prognostic parameters were performed by Kendall's Tau b test (SPSS 20.0 Inc., Chicago, IL, USA) and $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

Results

NB patients mean age was 4 years (1 month – 13 years) and for control group was 10 years (1- 18 years) ($p > 0.05$).

CCR5 (rs333) and *CXCL12* (rs1801157) were genotyped in NB patients and in control group. Electrophoretic profiles for *CCR5-delta32* (rs333) and *CXCL12* (rs1801157) are demonstrated in Figures 1 and 2, respectively.

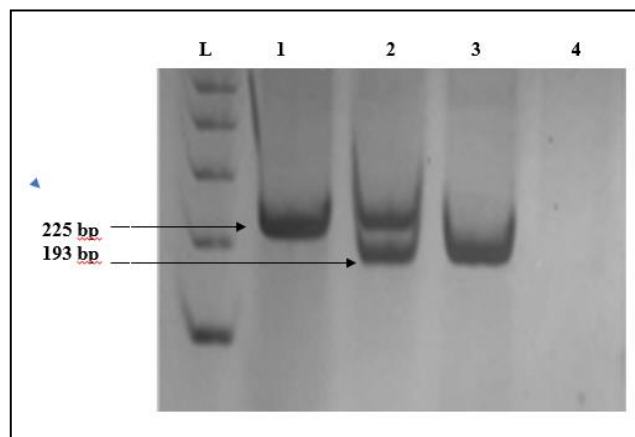


Figure 1. **Electrophoretic profile of *CCR5-delta32* polymorphism.** Lane 1: wild-type homozygous genotype (wt/wt) yields 225-bp; Lane 2: heterozygous genotype (wt/delta32) yields 225-bp and 193-bp; Lane 3: mutated homozygous genotype (delta32/delta32) yielded a 193-bp product. L: 100bp DNA ladder (Invitrogen™, Carlsbad, California, USA); 4: negative control.

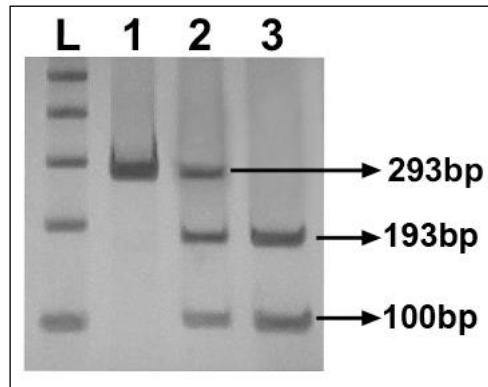


Figure 2. **Electrophoretic profile of CXCL12 (rs1801157) polymorphism.** Lane 1: rare homozygous genotype (3'A/3'A) yielded a 293-bp product; Lane 2: heterozygous genotype (wt/3'A) yields 293-bp, 193-bp and 100-bp; Lane3: prevalent homozygous genotype (wt/wt) yields 193-bp and 100-bp.

CCR5 (rs333) polymorphism were genotyped in 28 NB patients and in 80 control individuals and genotype and allelic frequencies were evaluated.

Table 1 shows genotypes distribution for NB and controls groups. Although biased, genotypes did not differ significantly between controls and NB group (OR: 3.29, IC: 0.99-10.95). For *D32* carriers it was verified significant difference (OR: 5.96, IC: 2.21 -16.06) and a positive association in relation to NB susceptibility (OR: 4.94, CI: 1.63-14.98) was demonstrated in dominant model.

Table 1. *CCR5* (rs333) case control study in NB patients and neoplasia-free controls.

		<i>NB</i> (28)		<i>Control</i> (80)		<i>OR</i> (CI95%)	<i>p value</i> ^a
			%		%		
Genotypes	<i>WT/WT</i>	19	67.86	73	91.25	Reference	
	<i>WT/delta32</i>	06	21.43	07	8.75	3.29 (0.99-10.95)	0.07
	<i>delta32/delta32</i>	03	10.71	00	0		
Allele Frequency	<i>WT</i>	44	78.57	153	95.63	5.96 (2.21 -16.06)	0.0004
	<i>delta32</i>	12	21.43	07	4.37		
Dominant	<i>Delta32/delta32+</i>	9	32.14	7	8.75		
	<i>WT/delta32</i>					4.94 (1.63-14.98)	0.005
	<i>WT/WT</i>	19	67.86	73	91.25		

OR: Odds ratio; CI: confidence interval. ^a Fisher's exact test

NB: neuroblastoma, *WT/WT*: wild-type homozygous genotype, *WT/delta32*: heterozygous genotype, *delta32/delta-32*: mutated homozygous genotype.

The *CXCL12* (rs1801157) polymorphism were analysed in 24 NB patients and in 140 healthy control individuals. There was statistically significant difference for genotypes (OR: 26.18, IC: 6.15-111.4), allelic frequency (OR: 4.20, IC: 2.19-8.03), and for dominant model (OR: 2.58, IC: 1.07-6.2), as showed in Table 2.

Table 2. Case control study of *CXCL12* (rs1801157) polymorphism in NB patients and neoplasia-free healthy controls.

		<i>NB</i> (24)		<i>Control</i> (140)		<i>OR</i> (<i>CI</i> 95%)	<i>p</i> value ^a
			%		%		
<i>Genotypes</i>	wt/wt	11	45.83	96	68.57	Reference	
	wt/ 3'A	04	16.67	41	29.29	0.85 (0.26-2.83)	1.00
	3'A/3'A	09	37.50	3	2.14	26.18 (6.15-111.4)	0.0001
<i>Allele frequency</i>	wt	26	54.17	233	95.63	4.20 (2.19– 8.03)	0.0001
	3'A	22	45.83	47	43.77		
<i>Recessive</i>	3'A/3'A	9	37.50	3	2.14	27.40 (6.68–112.4)	0.0001
	wt/ 3'A+ wt/wt	15	62.50	137	97.86		
<i>Dominant</i>	3'A/3'A+ wt/3'A	13	54.17	44	31.43	2.58 (1.07–6.2)	0.04
	wt/wt	11	45.83	96	68.57		

OR: Odds ratio; CI: confidence interval. ^a Fisher's exact test

NB: neuroblastoma, *WT/WT*: wild-type homozygous genotype, *WT/3'A*: heterozygous genotype, *3'A/3'A*: mutated homozygous genotype.

In this work the correlation between *CCR5* polymorphism and NB prognostic parameters were also evaluated (Table 3). There was no correlation regarding lymph nodes commitment and/or metastasis ($p=0.82$), tumor staging ($p=0.86$) and death ($p=0.66$).

Table 3. *CCR5-delta32* and prognostic parameters in NB patients.

Prognostic Parameters		Number individuals n (%)	<i>CCR5-delta32</i> genotypes	
			wt/wt n (%)	wt/delta32+ delta32/delta32 n (%)
Lymph nodes commitment and/or metastasis (n = 28)	Absent	9 (32.14)	5 (17.86)	4 (14.28)
	Present	19 (67.86)	14 (50.0)	5 (17.86)
		$\tau = -0.04$		$p = 0.82$
Tumor staging (n =28)	1	8 (28.58)	4 (14.29)	4 (14.29)
	3	5 (17.85)	3 (10.71)	2 (7.14)
	4	15 (53.57)	12 (42.86)	3 (10.71)
		$\tau = -0.34$		$p = 0.86$
Death (n =28)	No	24 (85.71)	16 (57.14)	8 (28.57)
	Yes	4 (14.29)	3 (10.71)	1 (3.58)
		$\tau = -0.08$		$p = 0.66$

Tau_b Kendall, $p < 0.05$ values were considered statistically significant

WT/WT: wild-type homozygous genotype, *WT/delta32*: heterozygous genotype, *delta32/delta-32*: mutated homozygous genotype

In this context, prognostic parameters for *CXCL12* (*rs1801157*) was also analyzed and there was no correlation for lymph nodes commitment and/or metastasis ($p=0.23$) tumor staging ($p=0.34$) and death ($p=0.14$) (Table 4).

Table 4. *CXCL12* (*rs1801157*) and prognostic parameters in NB patients.

Prognostic Parameters		Number individuals n (%)	<i>CXCL12</i> genotypes	
			wt/wt n (%)	wt/3'A+ 3'A/3'A n (%)
Lymph nodes commitment and/or metastasis (n = 24)	Absent	8 (33.34)	3 (12.5)	5 (20.84)
	Present	16 (66.66)	8 (33.33)	8 (33.33)
		$\tau = -0.24$	$p = 0.23$	
Tumor staging (n =24)	1	7 (29.17)	3 (12.5)	4 (16.67)
	3	4 (16.67)	3 (12.5)	1 (4.16)
	4	13 (54.16)	5 (20.84)	8 (33.33)
		$\tau = -0.17$	$p = 0.34$	
Death (n =24)	No	22 (91.66)	9 (37.5)	13 (54.16)
	Yes	2 (8.34)	2 (8.34)	0
		$\tau = -0.29$	$p = 0.14$	

Tau_b Kendall, $p < 0.05$ values were considered statistically significant

When it was analyzed both polymorphisms together, no statistically significant difference was observed when comparing genotypes nor even both in relation to clinical parameters (data not show).

Discussion

This work evaluated *CCR5* and *CXCL12* gene polymorphisms in NB regarding susceptibility and/or prognosis. Although there was no difference in prognosis, for the first time, it was verified that there is an association between genetic polymorphisms of *CCR5* and *CXCL12* with NB susceptibility.

NB is an embryonal malignant tumor of neural crest origin that most commonly arises in the adrenal gland. In children with localized disease or before 1 year of age, the disease is often curable. However, older children with disseminated disease have a poor outcome (Seeger, Reynolds et al. 2000). Navalkele, O'Dorisio et al. (2011) reported the prevalence of NB in children younger than 4 years, In the presente study the mean age for NB patients was 4 years and 67.86% presented involvement of lymph nodes or metástases and 54.16% were included in stage 4, demonstrating a characteristic profile of poor prognosis and tumor aggressiveness.

Our research group has investigated *CCR5* rs333 in a Brazilian healthy control subjects and comparing with leishmaniasis (Brajao de Oliveira, Reiche et al. 2007), breast cancer (Banin-Hirata, Losi-Guembarovski et al. 2016) and acute lymphoblastic leukemia (de Oliveira, Amarante et al. 2014) and no significant differences were detected for the D32 carrier or genotype in these case-control studies. It is noteworthy that none of these was an embryonic neoplasm. Beside this, the healthy donors also present the same distribution of D32 carriers (Muxel, Borelli et al. 2008) and D32 the carrier does not exceed 11%.

In the present study, for *CCR5* rs333, in Dominant model, demonstrated a positive association in relation to NB (OR:4.94, CI:1.63-14.88). It is known that NB is the most common extracranial childhood solid tumor which derives from embryonic neural crest cells (Malkin 1997). The CCL5, a ligand for *CCR5*, can induce migration and differentiation of embryonic dorsal root ganglia cells (Bolin et al., 1998), indicating that this receptor might mediate trophic effects on neurons. Following this line of reasoning it could suggest that in the case of the D32 *CCR5* carrier, there is a possibility of nonfunctional receptor occurrence leading to some abnormality in the neuronal development, hypothesizing a possible neoplasia.

The chemokines are a family of small secreted proteins that are known to be important regulators of leukocyte trafficking under both normal conditions and during inflammatory responses (Moser, Wolf et al. 2004). Furthermore, it is now known that chemokine signaling has an important role to play in the developing embryo (Tran, Banisadr et al. 2007). Cartier, Dubois-Dauphin et al. (2003) exclusively studied the effect of *CCR5* activation in a homogenous population of cells and reported for the first time that the *CCR5*-induced apoptosis in neuronal cells. Their results have suggested that *CCR5* might play a double role in inflammatory neurodegeneration. Its upregulation on activated microglia leads to increased inflammation and together with the secretion of *CCR5* ligands by microglia to an autocrine positive control loop. However, in addition to this amplification of the inflammatory response, *CCR5* ligands secreted by microglia (together with other microglia products, such as reactive oxygen species and TNF-alpha) will also directly contribute to cell death. We can then hypothesize that, in the absence of an integral receptor for *CCR5*, there is an imbalance with decreased apoptosis favoring cell proliferation. Children with the D32 allele are more susceptible to developing tumor of embryonic origin due to a nonfunctional receptor.

In this work, the *CXCL12* (rs1801157) were also analysed in 24 NB patients and 140 healthy control individuals and there was statistically significant difference for genotype and allelic frequency, and also for dominant (OR:2.58, IC:1.07-6.2) and recessive (OR=27.40, CI=6.68-112.4) models as showed in Table 2. A meta-analysis from Zhu, Jiang et al. (2014) suggested that *CXCL12* G801A polymorphism was associated with an increased risk of cancer but so far there are no studies on NB. However, a case-control study from our reserarch group indicated a significant association for allele A carriers of rs1801157 polymorphism in relation to Wilms' tumor susceptibility (Ozawa, Ariza et al. 2016). It is known that the Wilms' tumor develops from nephroblastic remnants, and it is characterized as an embryonal tumor (Beckwith 1994).

The combined effects of *CXCL12* on adhesion and reduced *CXCR4* expression on the cells may facilitate bone marrow metastases formation and prevent the exit of the tumor cells to other *CXCL12* expressing sites (Geminder, Sagi-Assif et al. 2001). Many of the patients included in this study presented metastasis to bone marrow possibly favored by 3'A carriers which may be related to increase in the *CXCL12* expression (Winkler, Modi et al. 1998).

Muhlethaler-Mottet, Liberman et al. (2015) focused investigations in the homing phase of NB cells metastatic dissemination, where the involvement of *CXCR4* and *CXCR7* receptors which has *CXCL12* as a binder, was specifically investigated. The authors showed that *CXCR4* and *CXCR7* receptors do influence NB cell homing, however, in a complex way. Really, *CXCR4* favors NB cell implantation in the lung and liver, while *CXCR7* enhances seeding to the liver and the adrenal gland, and both receptors increase bone marrow invasion. Thus homozygous 3'A/3'A may be related to increase of *CXCL12* and increases migration to bone marrow. In this context, Geminder, Sagi-Assif et al. (2001) suggested that SH-SY5Y NB cells are contemplated with adequate machinery to support their homing to the bone marrow. Finally, the ability of NB tumors to preferentially to metastize for bone marrow may be influenced by *CXCR4/CXCL12* axis.

Through functional protein association networks database (STRING) it has been verified that *CXCL12* and *CCR5* present first-line interactions and are neighboring genes. Although no correlation was verified regarding prognostic parameters as lymph nodes commitment and/or metastasis, tumor staging and death for both *CCR5* and *CXCL12* in NB, these polymorphisms somehow, were associated

with NB susceptibility, which requires future investigations for its validation and potential application as tumor markers.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Londrina State University Pos-Graduate Coordination (PROPPG-UEL).

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ETHICAL APPROVAL

This study was conducted conforming to the declaration of Helsinki and the research was approved by the institutional ethics committee (CAAE: 73557317.0.0000.523).

INFORMED CONSENT

Informed consent was obtained from each participant before enrolling in this study.

REFERENCES

Aoki, M. N., A. C. da Silva do Amaral Herrera, M. K. Amarante, J. L. do Val Carneiro, M. H. Fungaro and M. A. Watanabe (2009). "CCR5 and p53 codon 72 gene polymorphisms: implications in breast cancer development." *Int J Mol Med* **23**(3): 429-435.

Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." *Nat Rev Cancer* **4**(7): 540-550.

Banin-Hirata, B. K., R. Losi-Guembarovski, J. M. Oda, C. E. de Oliveira, C. Z. Campos, T. L. Mazzuco, S. D. Borelli, J. R. Ceribelli and M. A. Watanabe (2016). "CCR2-V64I genetic polymorphism: a possible involvement in HER2+ breast cancer." *Clin Exp Med* **16**(2): 139-145.

Beckwith, J. (1994). *Renal tumors in the pediatric patient*. Philadelphia, JB Lippincott Company.

Brajao de Oliveira, K., E. M. Reiche, H. Kaminami Morimoto, M. H. Pelegrinelli Fungaro, D. Estevao, R. Pontello, T. Franco Nasser and M. A. Watanabe (2007). "Analysis of the CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis." J Cutan Pathol **34**(1): 27-32.

Cartier, L., M. Dubois-Dauphin, O. Hartley, I. Irminger-Finger and K. H. Krause (2003). "Chemokine-induced cell death in CCR5-expressing neuroblastoma cells." J Neuroimmunol **145**(1-2): 27-39.

Chelli, M. and M. Alizon (2001). "Determinants of the trans-dominant negative effect of truncated forms of the CCR5 chemokine receptor." J Biol Chem **276**(50): 46975-46982.

de Oliveira, C. E., M. K. Amarante, L. Perim Ade, P. M. Ozawa, C. Hiroki, G. A. Freire Vitiello, R. Losi Guembarovski and M. A. Watanabe (2014). "Absence of Association between CCR5 rs333 Polymorphism and Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia." Adv Hematol **2014**: 924030.

Geminder, H., O. Sagi-Assif, L. Goldberg, T. Meshel, G. Rechavi, I. P. Witz and A. Ben-Baruch (2001). "A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma." J Immunol **167**(8): 4747-4757.

Grosfeld, J. (1998). Neuroblastoma. St. Louis: Mosby.

Gross, N. and R. Meier (2009). "Chemokines in neuroectodermal cancers: the crucial growth signal from the soil." Semin Cancer Biol **19**(2): 103-110.

Honczarenko, M., Y. Le, A. M. Glodek, M. Majka, J. J. Campbell, M. Z. Ratajczak and L. E. Silberstein (2002). "CCR5-binding chemokines modulate CXCL12 (SDF-1)-induced responses of progenitor B cells in human bone marrow through heterologous desensitization of the CXCR4 chemokine receptor." Blood **100**(7): 2321-2329.

Legler, D. F. and M. Thelen (2018). "New insights in chemokine signaling." F1000Res **7**: 95.

London, W. B., R. P. Castleberry, K. K. Matthay, A. T. Look, R. C. Seeger, H. Shimada, P. Thorner, G. Brodeur, J. M. Maris, C. P. Reynolds and S. L. Cohn (2005). "Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group." J Clin Oncol **23**(27): 6459-6465.

Malkin, D. (1997). Cancer: principles and practice of oncology. Lippincott-Raven, New York.

Mennicken, F., R. Maki, E. B. de Souza and R. Quirion (1999). "Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning." Trends Pharmacol Sci **20**(2): 73-78.

Moser, B., M. Wolf, A. Walz and P. Loetscher (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." Trends Immunol **25**(2): 75-84.

Muhlethaler-Mottet, A., J. Liberman, K. Ascencao, M. Flahaut, K. Balmas Bourloud, P. Yan, N. Jauquier, N. Gross and J. M. Joseph (2015). "The CXCR4/CXCR7/CXCL12 Axis Is Involved in a Secondary but Complex Control of Neuroblastoma Metastatic Cell Homing." PLoS One **10**(5): e0125616.

Muxel, S. M., S. D. Borelli, M. K. Amarante, J. C. Voltarelli, M. N. Aoki, C. E. de Oliveira and M. A. Ehara Watanabe (2008). "Association study of CCR5 delta 32 polymorphism among the HLA-DRB1 Caucasian population in Northern Parana, Brazil." J Clin Lab Anal **22**(4): 229-233.

Navalkele, P., M. S. O'Dorisio, T. M. O'Dorisio, G. K. Zamba and C. F. Lynch (2011). "Incidence, survival, and prevalence of neuroendocrine tumors versus neuroblastoma in children and young adults: nine standard SEER registries, 1975-2006." Pediatr Blood Cancer **56**(1): 50-57.

Ozawa, P. M., C. B. Ariza, R. Losi-Guembarovski, A. L. Guembarovski, C. E. de Oliveira, B. K. Banin-Hirata, M. O. Kishima, D. L. Petenuci and M. A. Watanabe (2016). "Wilms' tumor susceptibility: possible involvement of FOXP3 and CXCL12 genes." Mol Cell Pediatr **3**(1): 36.

Raport, C. J., J. Gosling, V. L. Schweickart, P. W. Gray and I. F. Charo (1996). "Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha." J Biol Chem **271**(29): 17161-17166.

Samson, M., O. Labbe, C. Mollereau, G. Vassart and M. Parmentier (1996). "Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene." Biochemistry **35**(11): 3362-3367.

Seeger, R. C., C. P. Reynolds, R. Gallego, D. O. Stram, R. B. Gerbing and K. K. Matthay (2000). "Quantitative tumor cell content of bone marrow and blood as a predictor of outcome in stage IV neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study." J Clin Oncol **18**(24): 4067-4076.

Tran, P. B., G. Banisadr, D. Ren, A. Chenn and R. J. Miller (2007). "Chemokine receptor expression by neural progenitor cells in neurogenic regions of mouse brain." J Comp Neurol **500**(6): 1007-1033.

Winkler, C., W. Modi, M. W. Smith, G. W. Nelson, X. Wu, M. Carrington, M. Dean, T. Honjo, K. Tashiro, D. Yabe, S. Buchbinder, E. Vittinghoff, J. J. Goedert, T. R. O'Brien, L. P. Jacobson, R. Detels, S. Donfield, A. Willoughby, E. Gomperts, D. Vlahov, J. Phair and S. J. O'Brien (1998). "Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC)." Science **279**(5349): 389-393.

Zhu, K., B. Jiang, R. Hu, Y. Yang, M. Miao, Y. Li and Z. Liu (2014). "The CXCL12 G801A polymorphism is associated with cancer risk: a meta-analysis." PLoS One **9**(9): e108953.

Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi and D. R. Littman (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-599.

5 CONCLUSÃO

- Os genótipos não diferiram significativamente entre o grupo controle e o grupo NB para o polimorfismo CCR5-Delta32, embora essa diferença tenha sido marginal (OR= 3,29, IC= 0,99-10,95). Para os portadores deste polimorfismo, verificou-se diferença significativa (OR= 5,96, IC= 2,21-16,06) e no modelo dominante foi demonstrada uma associação positiva em relação à suscetibilidade ao NB (OR= 4,94; IC= 1,63-14,88).

- O polimorfismo *CXCL12* (rs1801157) foi analisado em 24 pacientes com NB e em 140 controles saudáveis. Houve diferença estatisticamente significativa para os genótipos (OR: 26,18, IC: 6,15-111,4), frequência alélica (OR= 4,20, IC= 2,19-8,03), e para os modelos dominantes (OR= 2,58, IC= 1,07-6,2) e recessivos (OR= 27,40, IC= 6,68-112,4).

- Em relação ao polimorfismo do *CCR5* e os parâmetros prognósticos do NB não foi evidenciada correlação quanto ao comprometimento de linfonodos e/ou metástases ($p= 0,82$), estadiamento do tumor ($p= 0,86$) e óbito ($p= 0,66$).

- Adicionalmente em relação ao *CXCL12* (rs1801157), também não apresentou correlação para comprometimento de linfonodos e/ou metástase ($p= 0,23$), de estadiamento tumoral ($p= 0,34$) e óbito ($p= 0,14$).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que os dois polimorfismos estudados, *CCR5* e *CXCL12*, apresentaram uma associação com a susceptibilidade ao NB, embora nenhuma correlação com o prognóstico tenha sido evidenciada. Novos estudos deverão ser conduzidos para melhor compreensão desses mecanismos.

7 REFERÊNCIAS

AOKI, M. N. et al. CCR5 and p53 codon 72 gene polymorphisms: implications in breast cancer development. **Int J Mol Med**, v. 23, n. 3, p. 429-435, Mar 2009. ISSN 1107-3756 (Print) 1107-3756 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19212663> >.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J Intern Med**, v. 250, n. 2, p. 91-104, Aug 2001. ISSN 0954-6820 (Print) 0954-6820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489059> >.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. **Adv Immunol**, v. 55, p. 97-179, 1994. ISSN 0065-2776 (Print) 0065-2776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304236> >.

BALABANIAN, K. et al. The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 42, p. 35760-35766, October 21, 2005 2005. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/280/42/35760.abstract> >.

BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 7, p. 540-550, Jul 2004. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229479> >.

BALTUS, T. H. L. et al. CCR5 Δ 32 (rs333) polymorphism is associated with the susceptibility to systemic lupus erythematosus in female Brazilian patients. **Rheumatology International**, v. 36, n. 1, p. 7-15, January 01 2016. ISSN 1437-160X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00296-015-3308-z> >.

BOIMEL, P. J. et al. Contribution of CXCL12 secretion to invasion of breast cancer cells. **Breast Cancer Res**, v. 14, n. 1, p. R23, Feb 7 2012. ISSN 1465-542X (Electronic) 1465-5411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22314082> >.

BOLIN, L. M. et al. Primary sensory neurons migrate in response to the chemokine RANTES. **J Neuroimmunol**, v. 81, n. 1-2, p. 49-57, Jan 1998. ISSN 0165-5728 (Print) 0165-5728 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521605> >.

BRAJAO DE OLIVEIRA, K. et al. Analysis of the CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis. **J Cutan Pathol**, v. 34, n. 1, p. 27-32, Jan 2007. ISSN 0303-6987 (Print) 0303-6987 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17214851> >.

BRODEUR, G. et al. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. **Science**, v. 224, n. 4653, p. 1121-1124, 1984. Disponível em: < <https://science.sciencemag.org/content/sci/224/4653/1121.full.pdf> >.

BRODEUR, G. M. et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. **J Clin Oncol**, v. 11, n. 8, p. 1466-1477, Aug 1993. ISSN 0732-183X (Print) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8336186> >.

CARON, H. et al. Allelic Loss of Chromosome 1p as a Predictor of Unfavorable Outcome in Patients with Neuroblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 4, p. 225-230, 1996. Disponível em: < <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199601253340404> >.

CARTIER, L. et al. Chemokine-induced cell death in CCR5-expressing neuroblastoma cells. **J Neuroimmunol**, v. 145, n. 1-2, p. 27-39, Dec 2003. ISSN 0165-5728 (Print) 0165-5728 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644028> >.

CASTLEBERRY, R. P. et al. The International Neuroblastoma Risk Groups (INRG): a preliminary report. **Eur J Cancer**, v. 33, n. 12, p. 2113-2116, Oct 1997. ISSN 0959-8049 (Print) 0959-8049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516864> >.

CHANG, H. Y. et al. [Association between CCR5 promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection]. **Korean J Hepatol**, v. 11, n. 2, p. 116-124, Jun 2005. ISSN 1738-222X (Print) 1738-222x.

CHENSUE, S. W. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 821-835, table of contents, Oct 2001. ISSN 0893-8512 (Print) 0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585787> >.

CHIES, J. A. B.; HUTZ, M. H. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 71-75, 2003. ISSN 0100-879X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2003000100010&nrm=iso >.

CHUANG, J. Y. et al. CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells. **J Cell Physiol**, v. 220, n. 2, p. 418-426, Aug 2009. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19334035> >.

D'ANGIO, G. J.; EVANS, A. E.; KOOP, C. E. Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. **Lancet**, v. 1, n. 7708, p. 1046-1049, May 22 1971. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4102970> >.

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**, v. 21, n. 1, p. 49-54, 2007. ISSN 0887-8013 (Print) 0887-8013 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17245764> >.

DEAN, M. et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. **Science**, v. 273, n. 5283, p. 1856-1862, Sep 27 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8791590> >.

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**, v. 135, n. 8, p. 997-1004, Aug 2009. ISSN 1432-1335 (Electronic) 0171-5216 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19125297> >.

DOMANSKA, U. M. et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 1, p. 219-230, 2013/01/01/ 2013. ISSN 0959-8049. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804912004030> >.

DOMMANGE, F. et al. CXCL12 polymorphism and malignant cell dissemination/tissue infiltration in acute myeloid leukemia. **FASEB J**, v. 20, n. 11, p. 1913-1915, Sep 2006. ISSN 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818471> >.

EVANS, A. Neuroblastoma: a historical perspective 1864-1998. **Elsevier Science**, p. 1-7, 2000.

FISHER, J. P. H.; TWEDDLE, D. A. Neonatal neuroblastoma. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 17, n. 4, p. 207-215, Aug 2012. ISSN 1878-0946 (Electronic) 1744-165X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22673527> >.

FRIDMAN, W. H. et al. Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 344, p. 1-24, 2011.

GARVIN, J. J.; BENDIT, I.; NISEN, P. D. N-myc oncogene expression and amplification in metastatic lesions of stage IV-S neuroblastoma. **Cancer**, v. 65, n. 11, p. 2572-2575, Jun 1 1990. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1692506> >.

GEORGIU, K. R.; FOSTER, B. K.; XIAN, C. J. Damage and recovery of the bone marrow microenvironment induced by cancer chemotherapy - potential regulatory role of chemokine CXCL12/receptor CXCR4 signalling. **Curr Mol Med**, v. 10, n. 5, p. 440-453, Jul 2010. ISSN 1875-5666 (Electronic) 1566-5240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20540706> >.

GIL, M. et al. Targeting CXCL12/CXCR4 signaling with oncolytic virotherapy disrupts tumor vasculature and inhibits breast cancer metastases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 14, p. E1291-1300, Apr 2 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23509246> >.

GOLDEN, C. B.; FEUSNER, J. H. Malignant abdominal masses in children: quick guide to evaluation and diagnosis. **Pediatr Clin North Am**, v. 49, n. 6, p. 1369-1392, viii, Dec 2002. ISSN 0031-3955 (Print) 0031-3955 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12580370> >.

GROSFELD, J. L. Neuroblastoma. **Pediatric Surgery**, 1998.

GROSS, N.; MEIER, R. Chemokines in neuroectodermal cancers: the crucial growth signal from the soil. **Semin Cancer Biol**, v. 19, n. 2, p. 103-110, Apr 2009. ISSN 1096-3650 (Electronic) 1044-579X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015030> >.

HONCZARENKO, M. et al. CCR5-binding chemokines modulate CXCL12 (SDF-1)-induced responses of progenitor B cells in human bone marrow through heterologous desensitization of the CXCR4 chemokine receptor. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2321-2329, 2002. Disponível em: < <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/100/7/2321.full.pdf> >.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. Rio de Janeiro 2017.

JANOWSKI, M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. **Cell Adh Migr**, v. 3, n. 3, p. 243-249, Jul-Sep 2009. ISSN 1933-6926 (Electronic) 1933-6918 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287206> >.

KAIMEN-MACIEL, D. R. et al. CCR5-Delta32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis. **Int J Mol Med**, v. 20, n. 3, p. 337-344, Sep 2007. ISSN 1107-3756 (Print) 1107-3756 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671738> >.

KERSHAW, M. H.; WESTWOOD, J. A.; DARCY, P. K. Gene-engineered T cells for cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 8, p. 525-541, Aug 2013. ISSN 1474-1768 (Electronic) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23880905> >.

KRÜGER, B. et al. RANTES/CCL5 polymorphisms as a risk factor for recurrent acute rejection. **Clinical Transplantation**, v. 21, n. 3, p. 385-390, 2007. ISSN 0902-0063. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-0012.2006.00654.x> >.

LAZARINI, F. et al. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. **Glia**, v. 42, n. 2, p. 139-148, Apr 15 2003. ISSN 0894-1491 (Print) 0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12655598> >.

LEBOUTE, A. P.; DE CARVALHO, M. W.; SIMOES, A. L. Absence of the deltaccr5 mutation in indigenous populations of the Brazilian Amazon. **Hum Genet**, v. 105, n. 5, p. 442-443, Nov 1999. ISSN 0340-6717 (Print) 0340-6717 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10598810> >.

LEGLER, D. F.; THELEN, M. New insights in chemokine signaling. **F1000Res**, v. 7, p. 95, 2018. ISSN 2046-1402 (Print) 2046-1402 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29416853> >.

LIN, W.-W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 5, p. 1175-1183, 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476347> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1857251/> >.

LITTLE, J. Epidemiology of childhood cancer. **IARC Sci Publ**, n. 149, p. 1-386, 1999. ISSN 0300-5038 (Print) 0300-5038 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10370893> >.

LIU, R. et al. Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367-377, 1996/08/09/ 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400801105> >.

LONDON, W. B. et al. Evidence for an Age Cutoff Greater Than 365 Days for Neuroblastoma Risk Group Stratification in the Children's Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 27, p. 6459-6465, 2005. Disponível em: < <https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2005.05.571> >.

LUSTER, A. D. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 7, p. 436-445, 1998. Disponível em: < <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199802123380706> >.

LUSTER, A. D.; GREENBERG, S. M.; LEDER, P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. **J Exp Med**, v. 182, n. 1, p. 219-231, Jul 1 1995. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790818> >.

MAKISHIMA, H. et al. Chemokine system and tissue infiltration in aggressive NK-cell leukemia. **Leuk Res**, v. 31, n. 9, p. 1237-1245, Sep 2007. ISSN 0145-2126 (Print) 0145-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17123604> >.

MANES, S. et al. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. **J Exp Med**, v. 198, n. 9, p. 1381-1389, Nov 3 2003. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597737> >.

MARIS, J. M. Recent Advances in Neuroblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 23, p. 2202-2211, 2010. Disponível em: < <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra0804577> >.

MARTINSON, J. J. et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nat Genet**, v. 16, n. 1, p. 100-103, May 1997. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9140404> >.

MCNICHOLL, J. M. et al. Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. **Emerg Infect Dis**, v. 3, n. 3, p. 261-271, Jul-Sep 1997. ISSN 1080-6040 (Print) 1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9284370> >.

MEIER, R. et al. The Chemokine Receptor CXCR4 Strongly Promotes Neuroblastoma Primary Tumour and Metastatic Growth, but not Invasion. **PLOS ONE**, v. 2, n. 10, p. e1016, 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001016> >.

MENNICKEN, F. et al. Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. **Trends Pharmacol Sci**, v. 20, n. 2, p. 73-78, Feb 1999. ISSN 0165-6147 (Print) 0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10101968> >.

MENU, E. et al. Role of CCR1 and CCR5 in homing and growth of multiple myeloma and in the development of osteolytic lesions: a study in the 5TMM model. **Clin Exp Metastasis**, v. 23, n. 5-6, p. 291-300, 2006. ISSN 0262-0898 (Print) 0262-0898 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17086356> >.

MOSSÉ, Y. P. et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. **Nature**, v. 455, p. 930, 08/24/online 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nature07261> >.

MÜHLETHALER-MOTTET, A. et al. The CXCR4/CXCR7/CXCL12 Axis Is Involved in a Secondary but Complex Control of Neuroblastoma Metastatic Cell Homing. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125616, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125616> >.

NAGASAWA, T. et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. **Nature**, v. 382, n. 6592, p. 635-638, Aug 15 1996. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757135> >.

NAVALKELE, P. et al. Incidence, survival, and prevalence of neuroendocrine tumors versus neuroblastoma in children and young adults: nine standard SEER registries, 1975-2006. **Pediatr Blood Cancer**, v. 56, n. 1, p. 50-57, Jan 2011. ISSN 1545-5017 (Electronic) 1545-5009 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21108439> >.

O'BRIEN, S. J.; MOORE, J. P. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. **Immunological Reviews**, v. 177, n. 1, p. 99-111, 2000. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1034/j.1600-065X.2000.17710.x> >.

ORIMO, A. et al. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. **Cell**, v. 121, n. 3, p. 335-348, 2005/05/06/ 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867405002370> >.

OZAWA, P. M. M. et al. Wilms' tumor susceptibility: possible involvement of FOXP3 and CXCL12 genes. **Molecular and Cellular Pediatrics**, v. 3, n. 1, p. 36, November 10 2016. ISSN 2194-7791. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s40348-016-0064-4> >.

PARIKH, N. S. et al. SIOP-PODC adapted risk stratification and treatment guidelines: Recommendations for neuroblastoma in low- and middle-income settings. **Pediatr Blood Cancer**, v. 62, n. 8, p. 1305-1316, Aug 2015. ISSN 1545-5017 (Electronic) 1545-5009 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25810263> >.

PELED, A.; TAVOR, S. Role of CXCR4 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. **Theranostics**, v. 3, n. 1, p. 34-39, 2013. ISSN 1838-7640 (Electronic) 1838-7640 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382784> >.

PELUS, L. M. et al. Peripheral blood stem cell mobilization. A role for CXC chemokines. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 43, n. 3, p. 257-275, Sep 2002. ISSN 1040-8428 (Print) 1040-8428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270782> >.

RATAJCZAK, M. Z. et al. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. **Leukemia**, v. 20, n. 11, p. 1915-1924, Nov 2006. ISSN 0887-6924 (Print) 0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16900209> >.

ROLAND, J. et al. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. **Blood**, v. 101, n. 2, p. 399-406, Jan 15 2003. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12393663> >.

SAMSON, M. et al. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. **Biochemistry**, v. 35, n. 11, p. 3362-3367, Mar 19 1996. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8639485> >.

SARAFI, M. N. et al. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. **J Exp Med**, v. 185, n. 1, p. 99-109, Jan 6 1997. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8996246> >.

SAÚDE, M. D. **Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: Informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade 2016.**

_____. **Protocolo de Diagnóstico Precoce do Câncer Pediátrico 2017.**

SAX, M. J. et al. Cancer cell CCL5 mediates bone marrow independent angiogenesis in breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 51, p. 85437-85449, Dec 20 2016. ISSN 1949-2553 (Electronic) 1949-2553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27863423> >.

SCHMIDT, M. L. et al. Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: A prospective Children's Cancer Group study. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 6, p. 1260-1268, Mar 2000. ISSN 0732-183X (Print) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10715296> >.

SCHWAB, M. et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. **Nature**, v. 305, n. 5931, p. 245-248, Sep 15-21 1983. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6888561> >.

SHIMADA, H. et al. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. **Cancer**, v. 92, n. 9, p. 2451-2461, Nov 1 2001. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745303> >.

SIDOTI, A. et al. Distribution of the mutated delta 32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population. **Int J Immunogenet**, v. 32, n. 3, p. 193-198, Jun 2005. ISSN 1744-3121 (Print) 1744-3121 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932625> >.

SIERRO, F. et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 37, p. 14759-14764, Sep 11 2007. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17804806> >.

SINGH, S.; SADANANDAM, A.; SINGH, R. K. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 26, n. 3-4, p. 453-467, Dec 2007. ISSN 0167-7659 (Print) 0167-7659 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17828470> >.

SLETTENAAR, V. I.; WILSON, J. L. The chemokine network: a target in cancer biology? **Adv Drug Deliv Rev**, v. 58, n. 8, p. 962-974, Oct 1 2006. ISSN 0169-409X (Print) 0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16996642> >.

SMITH, M. W. et al. CCR5-delta 32 gene deletion in HIV-1 infected patients. **Lancet**, v. 350, n. 9079, p. 741; author reply 742, Sep 6 1997. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9291930> >.

STAFMAN, L. L.; BEIERLE, E. A. Cell Proliferation in Neuroblastoma. **Cancers (Basel)**, v. 8, n. 1, Jan 12 2016. ISSN 2072-6694 (Print) 2072-6694 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26771642> >.

SUN, X. et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 4, p. 709-722, Dec 2010. ISSN 1573-7233 (Electronic) 0167-7659 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839032> >.

TACHIBANA, K. et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 591-594, 1998/06/01 1998. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/31261> >.

TANG, X. Y. et al. Overexpression of fatty acid binding protein-7 correlates with basal-like subtype of breast cancer. **Pathol Res Pract**, v. 206, n. 2, p. 98-101, Feb 15 2010. ISSN 1618-0631 (Electronic) 0344-0338 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608352> >.

TEICHER, B. A.; FRICKER, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 11, p. 2927-2931, 2010. Disponível em: < <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/16/11/2927.full.pdf> >.

UNGVARI, I. et al. CCR5 Delta 32 mutation, Mycoplasma pneumoniae infection, and asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 119, n. 6, p. 1545-1547, Jun 2007. ISSN 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17445875> >.

VAN DEVENTER, H. W. et al. C-C chemokine receptor 5 on stromal cells promotes pulmonary metastasis. **Cancer Res**, v. 65, n. 8, p. 3374-3379, Apr 15 2005. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15833871> >.

WALZ, A. et al. Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils. **J Exp Med**, v. 170, n. 5, p. 1745-1750, Nov 1 1989. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2681518> >.

WANG, F.-S. et al. Population Survey of CCR5 Δ 32, CCR5 m303, CCR2b 641, and SDF1 3'A Allele Frequencies in Indigenous Chinese Healthy Individuals, and in HIV-1-Infected and HIV-1-Uninfected Individuals in HIV-1 Risk Groups. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 32, n. 2, p. 124-130, 2003. ISSN 1525-4135. Disponível em: < https://journals.lww.com/jaids/Fulltext/2003/02000/Population_Survey_of_CCR5__32,_CCR5_m303,_CCR2b.2.aspx >.

WINKLER, C. et al. Genetic Restriction of AIDS Pathogenesis by an SDF-1 Chemokine Gene Variant. **Science**, v. 279, n. 5349, p. 389-393, 1998. Disponível em: < <https://science.sciencemag.org/content/sci/279/5349/389.full.pdf> >.

WRIGHT, L. M. et al. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. **Bone**, v. 36, n. 5, p. 840-853, May 2005. ISSN 8756-3282 (Print) 1873-2763 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15794931> >.

WU, P. F. et al. Role of CXCL12/CXCR4 signaling axis in pancreatic cancer. **Chin Med J (Engl)**, v. 126, n. 17, p. 3371-3374, 2013. ISSN 2542-5641 (Electronic) 0366-6999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24033967> >.

YAQUB, S.; AANDAHL, E. M. Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis. **Crit Rev Oncog**, v. 15, n. 1-2, p. 43-63, 2009. ISSN 0893-9675 (Print) 0893-9675 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20136627> >.

YOSHIMURA, T. et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 9233-9237, Dec 1987. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3480540> >.

YU, L. et al. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. **Gene**, v. 374, p. 174-179, Jun 7 2006. ISSN 0378-1119 (Print) 0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16626895> >.

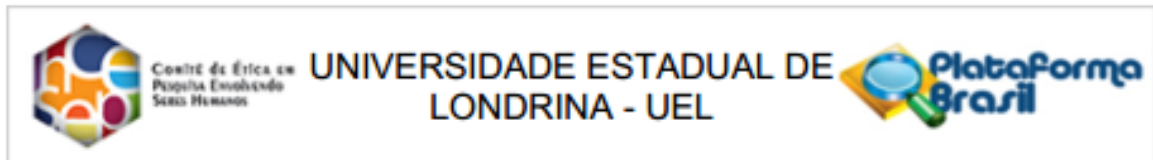
ZAMBRANO, E.; REYES-MÚGICA, M. Hormonal Activity May Predict Aggressive Behavior in Neuroblastoma. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 5, n. 2, p. 190-199, March 01 2002. ISSN 1093-5266. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10024001-0145-8> >.

ZLOTNIK, A. Chemokines and cancer. **Int J Cancer**, v. 119, n. 9, p. 2026-2029, Nov 1 2006. ISSN 0020-7136 (Print) 0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16671092> >.

ZUNIGA, J. A. et al. Biological relevance of the polymorphism in the CCR5 gene in refractory and non-refractory rheumatoid arthritis in Mexicans. **Clin Exp Rheumatol**, v. 21, n. 3, p. 351-354, May-Jun 2003. ISSN 0392-856X (Print) 0392-856X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12846056> >.

8 ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Maria Angelica Ehara Watanabe

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 73557317.0.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de PG em Patologia Experimental

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.297.112

Apresentação do Projeto:

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

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

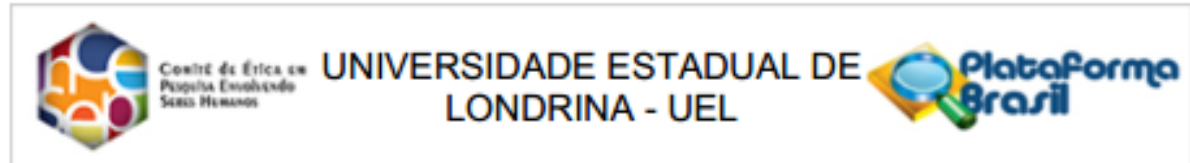
UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.297.112

- 300 Amostras de tecido normal e tumoral de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, câncer de laringe, câncer colorretal, meduloblastoma, neuroblastoma e tumor adrenocortical. a realização do ensaio de imuno-histoquímica. Essas análises serão realizadas no Laboratório de Polimorfismos DNA e Imunologia da UEL.

- 200 Amostras de tecido tumoral e saudável a fresco, de pacientes diagnosticados com cancer de mama, laringe e colorretal, provenientes de cirurgia para excisão do tumor do mesmo hospital para extração de DNA, RNA e sobrenadante.

- 300 Amostras de sangue de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, câncer de laringe e câncer colorretal e tumores pediátricos, que serão coletadas para obtenção de DNA, RNA e plasma para estudos de polimorfismos genéticos, expressão gênica e proteica.

- 50 Amostras de medula de pacientes pediátricos diagnosticados com leucemias agudas (linfóide e mielóide) para extração de RNA e plasma.

- 300 Amostras de sangue periférico e/ou saliva de controles saudáveis, sem histórico de neoplasia, para extração de DNA, RNA e plasma.

Serão realizados análise de PCR-RFLP para estudo das variantes alélicas polimórficas, análise de imunohistoquímica, análise da expressão gênica por PCR quantitativo, análise da Expressão Proteica por ELISA. Os participantes da pesquisa serão convidados a participar do estudo durante o atendimento clínico no Serviço de Oncologia do Hospital do Câncer de Londrina. No grupo caso serão incluídas todos os pacientes que tiverem diagnóstico para câncer de mama, câncer laringe e câncer colorretal e tumores pediátricos. E no grupo controle serão incluídos indivíduos saudáveis sem histórico de neoplasias, doenças autoimunes e infecções. Serão excluídos pacientes com doenças infecciosas ou autoimunes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a presença dos polimorfismos genéticos, expressão gênica e expressão proteica do fator de transcrição FOXP3, das citocinas TGFB1, IL10, IL12A, IL35 IL1B, TNFa e INFg, das quimiocinas CXCL12 e CCL5, das proteínas SMAD, IGF1, CTLA4, dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRII, TRIII, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQO1, GSTT1 e GSTM1, no tecido tumoral e normal, e no sangue periférico dos pacientes com câncer de mama, laringe e colorretal e nos tumores pediátricos.

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

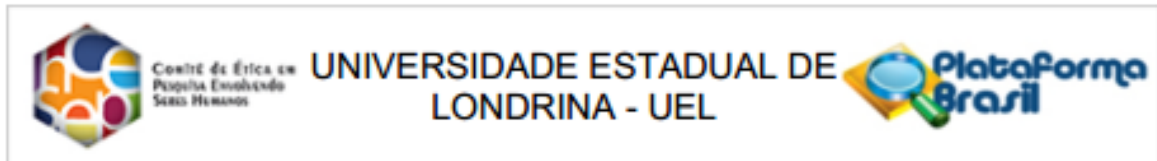
UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.297.112

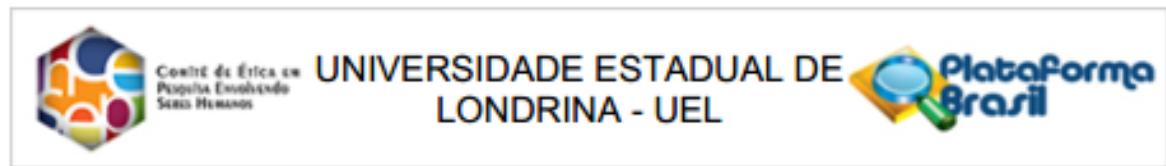
Objetivos Secundários:

- Detectar a presença dos polimorfismos genéticos do FOXP3, TGF, IL10, IL12A, IL35 IL1B, TNF α e INF gama, das quimiocinas CXCL12 e CCL5 dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRII, TRIII, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQO1, GSTT1 e GSTM1 nos DNAs extraídos do câncer de mama, câncer de cólon, tumores de laringe e câncer colorretal e para os tumores pediátricos (tumor de Wilms, meduloblastoma, neuroblastoma, leucemias agudas, linfomas e tumor adrenocortical).
- Avaliar a expressão gênica dos genes acima citados por PCR quantitativo.
- Realizar imunohistoquímica para FOXP3, TGF β 1, IL10, IL12A, IL35 IL1B, CXCL12 CCL5, SMAD, CXCR4, CCR5, p53 nos tecidos tumoral e saudável fixados em formalina tamponada e embebido em parafina, para avaliar a expressão proteica.
- Avaliar a expressão proteica por ELISA dos genes CXCL12, TGF-, FOXP3, CCL5 e INF gama.
- Avaliar a influência dos polimorfismos genéticos na expressão gênica e proteica desses genes.
- Comparar a frequência alélica dos polimorfismos dos genes supracitados e compará-los com os dados clinicopatológicos dos pacientes com os diferentes tipos de câncer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: ccp268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.297.112

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou folha de rosto devidamente assinada pelo Coordenador do Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, cronograma adequado e orçamento detalhado. Apresentou 04 modelos de TCLE adequados em forma de convite (adultos e crianças caso e adulto e crianças controle saudáveis). Apresentou ainda termo de autorização do hospital e declaração de 02 bioquímicas responsáveis pelas coletas das amostras.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Relatoria realizada em reunião ordinária em 25/09/2017

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_963665.pdf	11/08/2017 16:08:50		Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	24/07/2017 16:01:36	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Cronograma	9_cronograma.pdf	18/07/2017 15:57:53	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	8_Projeto_Cancer_2017.pdf	18/07/2017 15:30:16	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	6_Declaracao_HCL.pdf	18/07/2017 15:29:55	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4_TCLE_pacientes_adultos.pdf	18/07/2017 15:28:43	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	3_TCLE_crianças.pdf	18/07/2017 15:28:12	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_TCLE_controles_saudaveis_crianca.pdf	18/07/2017 15:27:11	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

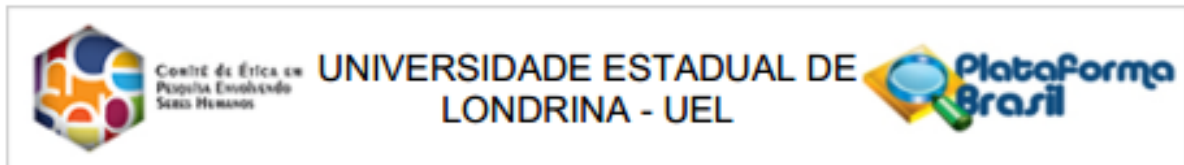
UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.297.112

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	1_TCLE_controles_saudaveis_adultos.pdf	18/07/2017 15:25:12	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	7_Termo_responsabilidade_coleta.pdf	18/07/2017 15:24:58	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	5_Termo_de_Confidencialidade_e_Sigilo.pdf	18/07/2017 15:22:23	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 26 de Setembro de 2017

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

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informações sobre a pesquisa:

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

Procedimentos do Estudo:

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

Confidencialidade da Pesquisa

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

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

Pesquisador Responsável _____

RG:: _____

Consentimento livre esclarecido e informado:

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

Londrina, ____ de _____, 20 ____.

Assinatura do responsável (ou representante legal): _____