



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FRANCIELI DE FATIMA FERREIRA RODRIGUES

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS
DO FATOR TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO BETA 1:
ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES PROGNÓSTICOS NA
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)**

Londrina
2023

FRANCIELI DE FATIMA FERREIRA RODRIGUES

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS
DO FATOR TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO BETA 1:
ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES PROGNÓSTICOS NA
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marla Karine Amarante
Coorientadora: Profa. Dra. Bruna Karina Banin-Hirata

Londrina
2023

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

R696p Rodrigues, Francieli de Fatima Ferreira.
Polimorfismos Genéticos e Níveis Plasmáticos do Fator Transformador de Crescimento Beta 1: : Associação com Marcadores Prognósticos na Leucemia Linfóide Aguda (LLA) / Francieli de Fatima Ferreira Rodrigues. - Londrina, 2023.
57 f. : il.

Orientador: Marla Karine Amarante.
Coorientador: Bruna Karina Banin Hirata.
Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Polimorfismo Genético - Tese. 2. Medula Óssea - Tese. 3. Citocina - Tese. 4. Leucemia Linfóide Aguda - Tese. I. Amarante, Marla Karine. II. Hirata, Bruna Karina Banin. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 616-092

FRANCIELI DE FATIMA FERREIRA RODRIGUES

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DO FATOR
TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO BETA 1:
ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES PROGNÓSTICOS NA LEUCEMIA
LINFOIDE AGUDA**

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de novembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus por me permitir existir e poder desfrutar deste momento.

Gostaria de agradecer a Professora Dr^a Carolina Panis, que foi quem plantou essa semente em meu coração e em especial a Professora Dr^a Marla Amarante, que além de contribuir para o plantio foi quem genuinamente me ajudou em todos os passos desse processo e isso não teria sido possível sem seu incentivo e mais do que isso, sem sua ajuda. Saiba que palavras não expressam minha gratidão.

Agradeço ao meu esposo Salvador por me apoiar e estar presente em todos os momentos, a minha filha Ana Luiza que viveu esse sonho comigo desde o início e aos meus filhos do coração Julia, Isabela e Pedro por estarem sempre presentes.

Aos meus pais (Edna e Decival / Ricardo e Margarete), que mesmo estando distantes não deixaram de me incentivar.

Aos meus amigos que sempre tiveram uma palavra de ânimo e apoio.

E aos pacientes e familiares que contribuíram para que essa pesquisa pudesse ser realizada.

RESUMO

RODRIGUES, Francieli de Fátima Ferreira. Polimorfismos genéticos e níveis plasmáticos do fator transformador de crescimento beta 1: associação com marcadores prognósticos na leucemia linfóide aguda. 52 folhas. Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma neoplasia hematológica que apresenta maior incidência na população pediátrica, sendo caracterizada pela anormalidade das células precursoras das linhagens B, T e NK. Esta doença é considerada de causa desconhecida, porém acredita-se que este processo seja resultado de uma interação entre fatores ambientais e genéticos. Por este motivo, vários estudos de análise genética, como polimorfismos de base única são realizados para tentar encontrar marcadores associados à suscetibilidade à doença ou ao prognóstico. Sabe-se que citocinas estão envolvidas em diversas neoplasias, dentre elas o fator transformador de crescimento beta 1 (TGF-B1) que exerce funções biológicas diversas e pode contribuir para a invasão e a metástase, podendo alterar o microambiente tumoral. Dessa maneira neste estudo foram estudados dois polimorfismos no gene *TGFB1* rs1800468 (G-800A) e rs1800469 (C-509T) em 39 amostras de medula óssea de pacientes infantojuvenis com LLA, bem como mensurado os níveis de TGF-B1 e suas correlações com os dados clínico patológicos. Estes pacientes foram atendidos no Hospital do Câncer de Londrina e a medula óssea foi coletada para extração do DNA genômico. A análise dos polimorfismos foi realizada por método de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP), e os níveis plasmáticos de TGF-B1 foram quantificados por ensaio imunoenzimático ligado a enzima (ELISA). Foi observado que a maioria dos pacientes tinha mediana de idade de 7 anos, sendo 33 pacientes com LLA-B e apenas 6 pacientes com LLA-T. Na análise dos polimorfismos encontramos uma maior frequência do genótipo GG para o rs1800468 e genótipo CT para o rs1800469, porém na análise de expressão de proteína, os polimorfismos não estavam associados a mudanças na concentração plasmática de TGF-B1. No entanto, os pacientes com alto risco apresentaram significativamente maior concentração média de TGF-B1 quando comparados com os pacientes baixo risco ($p=0,0111$). Talvez isto se deva a uma desregulação da via do TGF-B1 que pode estar bloqueada pela própria célula leucêmica; o que pode ser de grande importância na fisiopatologia da leucemia e possível marcador molecular de prognóstico. Portanto, outros estudos devem ser realizados para investigar os níveis plasmáticos de TGF-B1 em pacientes com LLA-T.

Palavras-chave: Citocina; Medula Óssea, LLA.

ABSTRACT

RODRIGUES, Francieli de Fátima Ferreira. Genetic polymorphisms and plasma levels of beta transforming growth factor: association with prognostic markers in acute lymphoid leukemia. 52 pages. Master's Degree in Clinical and Laboratory Pathophysiology - State University of Londrina, Londrina, 2023.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematological neoplasm that has a higher incidence in the pediatric population, being characterized by the abnormality of precursor cells of the B, T and NK lineages. This disease is considered to have an unknown cause, but it is believed that this process is the result of an interaction between environmental and genetic factors. For this reason, several genetic analysis studies such as single-base polymorphisms are carried out to try to find markers associated with disease susceptibility or prognosis. It is known that cytokines are involved in several neoplasms, including transforming growth factor beta 1 (TGF-B1), which exerts diverse biological functions and can contribute to invasion and metastasis, and can alter the tumor microenvironment. Thus, in this study, two polymorphisms in the *TGFB1* gene rs1800468 (G-800A) and rs1800469 (C-509T) were investigated in 39 bone marrow samples from childhood and juvenile patients with ALL, as well as measuring TGF-B1 levels and their correlations with the data. clinicopathological findings (age, sex, risk group, relapse) found in the medical records. These patients were treated at the Londrina Cancer Hospital and the marrow was collected for genomic DNA extraction. Analysis of polymorphisms was performed using the polymerase chain reaction (PCR) method followed by enzymatic restriction (PCR-RFLP), and plasma levels of TGF-B1 were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Regarding the results, most patients had a median age of 7 years, 33 patients with ALLB and only 6 patients with ALL. In the analysis of polymorphisms we found a higher frequency of the GG genotype for rs1800468 and CT genotype for rs1800469; however in the analysis of protein expression, the polymorphisms were not associated with changes in plasma TGF-B1 concentration. However, high-risk patients had a significantly higher mean concentration of TGF-B1 when compared to low-risk patients ($p=0.0111$). Perhaps this is due to a deregulation of the TGB pathway that may be blocked by the leukemic cell itself; which may be of great importance in the pathophysiology of leukemia and a possible molecular marker of prognosis. Therefore, other studies should be carried out to investigate plasma TGF-B1 levels in patients with T-ALL.

Key-words: Citokine; bone marrow; ALL.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição de grupo de risco de LLA segundo Grupo Internacional BFM 2009.....	15
Tabela 2 - Concentrações de reagentes utilizados na reação.....	24
Tabela 3 - Condições utilizadas para a amplificação das regiões do gene <i>TGFB1</i>	24

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - O símbolo yin-yang ilustra o fato de o TGF-B exercer efeitos tanto estimulatórios como inibitórios nas células imunitárias.....17
- Figura 2** - Análise dos polimorfismos da região promotora do *TGFB1*.....25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AgNO ₃	Nitrato de Prata
AR	Alto Risco
BFM	Berlim-Frankfurt-Munique
BMP	Proteína Morfogenética Óssea (<i>Bone Morphogenetic Protein</i>)
BR	Baixo Risco
C	Citosina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DRM	Doença Residual Mensurável
EBV	Vírus Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr Virus</i>)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
G	Guanina
GDF	Fator de Crescimento Diferenciação (<i>Growth Differentiation Factor</i>)
GDNF	Fator Neurotróficos Derivado da Glia (<i>Glia-derived Neurotrophic Factors</i>)
HCL	Hospital do Câncer de Londrina
HSC	Célula-tronco Hematopoiética (<i>Hematopoietic Stem Cell</i>)
HTLV-1	Vírus Linfotrófico de Células T Humana tipo 1 (<i>Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LNH	Linfoma Não-Hodgkin
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MLL	Leucemia de Linhagem Mista (<i>Mixed Lineage Leukemia</i>)
MRD	Doença Residual Mínima (<i>Minimal Residual Disease</i>)
NK	Células <i>Natural Killers</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
pb	Par de Base (<i>Pair Base</i>)
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFB	Fator Transformador de Crescimento Beta (<i>Transforming Growth Factor Beta</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA	12
1.2	FATOR TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO BETA (TGF-B).....	16
1.3	POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>TGFB1</i>	17
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	22
3.2	OBTENÇÃO DE MEDULA ÓSSEA	22
3.3	OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	23
3.4	GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO TGFB-1 POR PCR-RFLP	23
3.5	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TGF-B1	25
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	28
5	CONCLUSÃO	39
6	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS	51
	ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	56

1 1 INTRODUÇÃO

2 O câncer vem se tornando cada vez mais relevante nos últimos anos,
3 transformando-se em um grave problema de saúde pública mundial, sendo
4 considerado uma das quatro principais causas de morte prematura. Fatores como o
5 envelhecimento, o crescimento populacional e as mudanças na prevalência de fatores
6 de risco, principalmente os que estão relacionados ao desenvolvimento
7 socioeconômico, influenciam no aumento da incidência e da mortalidade por câncer
8 (INCA).

9 A estimativa mundial para 2020 mostra 19,3 milhões de novos casos de câncer
10 e 10 milhões de mortes relacionadas (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, a estimativa do
11 Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o triênio 2023-
12 2025 é de 704 mil novos casos de neoplasias malignas ao ano (INCA, 2022).

13 O câncer caracteriza-se pela proliferação descontrolada de células malignas,
14 originadas de alterações no funcionamento celular, que contribuem para o
15 crescimento dos tumores. HANAHAN e WEINBERG (2000) identificaram algumas
16 características presentes nas células cancerígenas, denominadas de marcas
17 registradas do câncer, tais como a manutenção da sinalização proliferativa, a
18 resistência à morte celular, a evasão dos mecanismos supressores de crescimento, a
19 capacidade de replicação ilimitada, a invasão e metástase. Posteriormente, os autores
20 acrescentaram outras características relevantes, entre elas a instabilidade genômica,
21 a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição imune
22 (HANAHAN e WEINBERG, 2011). E mais recentemente, HANAHAN (2022) atribuiu
23 outras características à célula tumoral e ao microambiente, como a plasticidade
24 fenotípica, a reprogramação epigenética e as células senescentes.

25 A etiologia do câncer é multifatorial e genética, embora ela não seja
26 necessariamente hereditária (PERERA, 1997). A maioria dos tipos de câncer humano
27 resulta de mutações somáticas relacionadas a diversos fatores de risco. Estes fatores
28 podem ser intrínsecos ou não-intrínsecos. Os fatores intrínsecos são aqueles
29 decorrentes de mutações espontâneas inevitáveis, resultantes de erros aleatórios na
30 replicação do DNA. Já os fatores não-intrínsecos são fatores externos modificáveis,
31 como a exposição a carcinógenos e uso de xenobióticos; fatores relacionados ao
32 estilo de vida, como tabagismo, sedentarismo, uso de terapias hormonais e consumo
33 de álcool; e fatores relacionados às características individuais, como o metabolismo,

1 níveis de hormônios, sistema imunológico e a resposta a danos no DNA (WU *et al.*,
2 2018).

3 Ainda, os cânceres pediátricos são diferentes dos que ocorrem em adultos, pois
4 estão associados à alterações no DNA que podem surgir antes mesmo do nascimento.
5 Essas alterações não estão relacionadas a fatores ambientais ou estilo de vida. Neste
6 sentido, leucemias são o tipo mais comum de câncer pediátrico diagnosticado,
7 seguido por tumores do sistema nervoso central, neuroblastoma e tumor de Wilms
8 (SOCIETY, 2021).

9 Ao se referir às leucemias, observa-se que estas representam um grupo de
10 doenças hematológicas heterogêneo. Esta heterogeneidade é refletida em diferenças
11 observadas nas características morfológicas, imunofenotípicas, citogenéticas e
12 moleculares que podem ocorrer. Essas características são resultado de vários
13 eventos biológicos que ocorrem durante a transformação maligna e/ou na variação
14 dos níveis da hierarquia hematopoiética, com origem na medula óssea
15 (POLYCHRONAKIS *et al.*, 2013).

16 A medula óssea é caracterizada como tecido líquido-gelatinoso rico em
17 nutrientes e que está localizado no interior de ossos longos como o esterno e os ossos
18 do quadril e possui dois tipos de células tronco, sendo a mesenquimal que dá origem
19 a vasos sanguíneos e linfáticos, e a hematopoética, das quais são formadas as células
20 sanguíneas da medula óssea (MDS Foundation, 2014).

21 A hematopoese é um sistema muito organizado que é responsável pela
22 produção das células sanguíneas. O controle da proliferação, diferenciação e
23 maturação destas células é realizado através de uma complexa interação molecular
24 das células com o microambiente da medula óssea. Em indivíduos adultos, a
25 hematopoese se compartimentaliza na medula óssea de ossos chatos gerando
26 eritrócitos e leucócitos. Neste processo ocorre uma produção celular alta, sendo
27 rigidamente controlada por um microambiente indutivo composto por células e por
28 proteínas de matriz extracelular que formam o chamado estroma medular.

29 O estroma é um tecido complexo, que consiste de uma rede de tecido
30 conjuntivo e uma variedade de tipos celulares, incluindo fibroblastos, macrófagos,
31 adipócitos-*like*, células musculares lisas, células reticulares e endoteliais. Em
32 indivíduos normais a proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas é
33 estritamente controlada. Já nos processos neoplásicos, especialmente nos malignos,
34 ocorrem alterações moleculares induzindo as células a um novo comportamento

1 biológico podendo, inclusive, alterar seus mecanismos de adesão (ANJOS A.R. *et al*,
2 2000).

3 As leucemias são neoplasias hematológicas que surgem a partir das células
4 tronco hematopoiéticas (HSCs) (AZIZIDOOST *et al.*, 2014; KONOPLEVA e JORDAN,
5 2011), e são classificadas de acordo com a linhagem, grau de maturação e forma de
6 acometimento celular na medula óssea. Elas podem ser da linhagem mieloide,
7 incluindo granulócitos, monócitos, eritrócitos, plaquetas e mastócitos, ou da linhagem
8 linfoide, incluindo linfócitos B, T, e as células NK (VARDIMAN *et al.*, 2009).

9 Estas malignidades têm uma característica biológica em comum: a clonalidade.
10 Embora células-alvo suscetíveis ao câncer sejam muitas, as alterações moleculares
11 necessárias para o desenvolvimento da doença são raras (GALLEGOS-ARREOLA *et*
12 *al.*, 2013). O grande desafio é encontrar fatores de exposição, como infecções e
13 inflamações, e variantes genéticas hereditárias relacionadas para descobrir como e
14 quando esses fatores contribuem para o curso das leucemias (GREAVES e
15 WIEMELS, 2003).

16 1.1 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

17 A leucemia linfoide aguda (LLA) é um tipo de desordem maligna que se origina
18 de uma única célula hematopoiética. Esta célula sofreu alterações genéticas em
19 genes responsáveis pela diferenciação, o que resulta no bloqueio da maturação e na
20 proliferação da célula transformada (GRAUX, 2011; PUI *et al.*, 2011). Mundialmente,
21 no ano de 2020 foram estimados 475 mil novos casos de leucemia, com
22 aproximadamente 312 mil óbitos (FERLAY *et al.*, 2020). A Sociedade Americana do
23 Câncer estimou que, nos Estados Unidos, para 2021, houve cerca de 5.690 novos
24 casos de LLA e 1.580 óbitos entre homens e mulheres de todas as idades (SOCIETY,
25 2021). No entanto, 60% dos casos são diagnosticados em indivíduos com menos de
26 20 anos, com crianças sendo a maioria acometida (HUNGER *et al.*, 2012; PUI e
27 HOWARD, 2008). Já no Brasil o número de novos casos para cada ano do triênio
28 (2023 à 2025) é de 11.540, correspondendo a um risco estimado de 5,33 por 100 mil
29 habitantes. Com relação à mortalidade, em 2020, ocorreram, no Brasil, 6.738 óbitos
30 por leucemia (3,18 por 100 mil). Nos homens ocorreram 3.703 óbitos (3,58 por 100
31 mil) e, nas mulheres, 3.035 óbitos (2,80 por 100 mil) (INCA, 2020).

32 As causas desta doença podem ser atribuídas à exposição externa e interna

1 às substâncias prejudiciais, bem como à suscetibilidade genética (INABA, GREAVES
2 e MULLIGHAN, 2013). O envolvimento da radiação ionizante é um dos fatores
3 ambientais mais relacionados com o desenvolvimento de leucemias pediátricas. Estas
4 são, em particular, mais frequentes na LLA e na leucemia mieloide aguda (LMA)
5 (BELSON, KINGSLEY e HOLMES, 2007; JIN *et al.*, 2016). Fatores ambientais como
6 a exposição aos hidrocarbonetos e pesticidas; consumo de álcool, cigarro e drogas
7 ilícitas durante a gestação, foram associados à LLA infantil (HASHIBE *et al.*, 2005;
8 INFANTE-RIVARD *et al.*, 1999; METAYER *et al.*, 2013). Outro fator de risco para LLA
9 é a exposição a agentes biológicos, como o vírus Epstein-Barr (EBV) e o Vírus
10 Linfotrópico das Células T Humano-1 (HTLV-1), que desregulam a resposta
11 imunológica (GREAVES, 2006; INABA, GREAVES e MULLIGHAN, 2013).

12 Grande parte das alterações genéticas nas leucemias são decorrentes de
13 mutações somáticas, mas as alterações na linhagem germinativa também podem
14 influenciar na predisposição ao desenvolvimento do câncer (CROCE, 2008).
15 Anormalidades cromossômicas numéricas e rearranjos estruturais, como as
16 translocações, são frequentemente encontrados na LLA. Em relação às
17 translocações, a mais frequente é a (9;22), conhecida como cromossomo Filadélfia
18 (RIX *et al.*, 2013). Outras translocações também estão associadas a leucemia, como
19 a (4;11), que está relacionada ao gene da leucemia de linhagem mista (MLL),
20 frequente na infância, e associada à leucemia mieloide (ARMSTRONG *et al.*, 2003;
21 ARMSTRONG *et al.*, 2002).

22 A leucemia é gerada a partir de uma célula anormal, com capacidade de se
23 proliferar sem sofrer diferenciação, denominada blasto. Essa célula se espalha e
24 substitui as células hematopoiéticas saudáveis na medula óssea, o que resulta em
25 dano medular (LORENZI *et al.*, 2003). Dessa forma, a maioria dos sintomas
26 observados em pacientes com LLA são resultantes do comprometimento da medula
27 óssea, como anemia, trombocitopenia, leucopenia e pancitopenia (BRIX e ROSTHØJ,
28 2014; TERWILLIGER e ABDUL-HAY, 2017). Os blastos neoplásicos podem ser
29 lançados na corrente sanguínea, infiltrando em alguns órgãos e tecidos, como
30 linfonodos, baço, fígado, gengiva, órbita, sistema nervoso central, testículos e pele
31 (LORENZI *et al.*, 2003).

32 Em decorrência das alterações celulares, os pacientes com LLA geralmente
33 apresentam sintomas súbitos, tais como fadiga, dispneia e sangramento espontâneo.
34 Além disso, outros sintomas comuns incluem letargia, perda de peso, febre e sudorese

1 noturna, linfadenopatia, esplenomegalia e/ou hepatomegalia. Neuropatias cranianas,
2 infiltração testicular e obstrução do fluído do líquido do líquor também podem ser observadas.
3 Outros sintomas relacionados à LLA incluem náusea, vômito, cefaleia, papiledema,
4 dores ósseas, lesões ósseas, osteopenia difusa, dores lombares e artrite assimétrica,
5 assim como hemorragia óssea decorrente da infiltração leucêmica (BORIM *et al.*,
6 2000; CRISTOFANI *et al.*, 2004; FARHI e ROSENTHAL, 2000; HAMERSCHLAK,
7 2008; IKEUTI, BORIM e LUPORINI, 2006; LARSON e ANASTASI, 2020; LOCATELLI
8 *et al.*, 2012).

9 Quanto ao diagnóstico inicial das leucemias, é realizado um exame físico do
10 paciente, seguido de análise detalhada de inúmeros exames, entre eles o
11 hemograma. Inicialmente, a análise quantitativa com a contagem absoluta e relativa
12 dos leucócitos, contagem de eritrócitos e das plaquetas e dosagem de hemoglobina.
13 Através da confecção da extensão sanguínea e coloração são reveladas informações
14 importantes sobre as condições da hematopoese (MCPHERSON e PINCUS, 2011).
15 Para confirmação do diagnóstico são realizadas mielograma, imunofenotipagem e
16 análise citogenética (MANISHA, 2012; PUI, RELLING e DOWNING, 2004).

17 A citometria de fluxo para a imunofenotipagem é um método padrão para o
18 diagnóstico diferencial, classificação, estadiamento e monitoramento da doença
19 residual mensurável (MRD) das leucemias e síndromes mielodisplásicas. Utilizando-
20 se anticorpos monoclonais é possível identificar diferentes linhagens celulares e
21 determinar o grau de maturação celular. Estas ferramentas possibilitam o
22 direcionamento para o tratamento mais eficaz e evitam a falha terapêutica (CRAIG e
23 FOON, 2008; MANISHA, 2012; ORFAO *et al.*, 2004; PUI, RELLING e DOWNING,
24 2004).

25 Estudos para o manejo da Leucemia Linfóide Aguda na criança do Grupo
26 Internacional Berlim-Frankfurt-Munique (BFM), revisado em 2009, estratifica os
27 pacientes em 3 grupos: baixo risco (BR), risco intermediário (RI) e alto risco (AR)
28 (Tabela 1). Essa estratificação leva em consideração não só os parâmetros iniciais
29 hematológicos, linhagens celulares e idade do paciente, como prioriza a resposta
30 terapêutica ao longo do período de indução, representado pelos primeiros 33 dias de
31 tratamento e a doença residual mensurável (DRM) (SCHRAPPE, M., 2009).

32
33
34

1 **Tabela 1:** Distribuição de grupo de risco de LLA segundo Grupo Internacional BFM
 2 2009

Baixo Risco (BR)
1 - Contagem de Blastos no sangue periférico no D8 < 1000 blastos/ μ L
2 - Idade \geq 1 ano e < 6 anos
3 – Contagem Inicial de Leucócitos < 20.000/ μ L
4 – Se houver disponibilidade: DRM/CF < 0,1% ou MO M1/M2 no D15
5 – MO do D33: M1
Todos os critérios deverão ser preenchidos
Alto Risco (AR)
1 – RI com DRM/CF > 10% (se houver disponibilidade) ou MO M3 no D15
2 – BR com DRM/CF > 10% se houver disponibilidade
3 – Contagem de Blasto em sangue periférico > 1000 blastos/ μ L no D8
4 – MO em M2 ou M3 no D33
5 – Translocação t(9;22) [BCR/ABL] ou t(4;11) [MLL/AF4]
6 – Hipodiploidia \leq 44
Somente um desses critérios já classifica como alto risco
Risco Intermediário (RI)
Todos os pacientes que não forem estratificados como BR ou AR

3

4 Legenda: D8, D15, D33: dias de tratamento a partir do primeiro dia de prednisolona; DRM: doença
 5 residual mensurável; CF: citometria de fluxo; MO: medula óssea; status da MO: M1: <5 %, M2: \geq 5 a
 6 <25%, M3: \geq 25% (adaptado pelo autor de SCHRAPPE, M. (2009)

7

8 A DRM é caracterizada como um pequeno número de células leucêmicas, que
 9 não podem ser detectadas por morfologia ou análise citogenética e tem como objetivo
 10 compreender o significado biológico e clínico da leucemia que persiste nos pacientes
 11 com remissão completa patológica (LOGAN, 2022).

12 Em suma, a LLA é um tipo de câncer que demonstra uma complexidade desde
 13 a patogênese até o estabelecimento do diagnóstico e tratamento. Além disso, vários
 14 fatores intrínsecos podem influenciar no curso da doença. Desta maneira, necessário
 15 investigar moléculas, como os fatores de crescimento, para compreender um pouco
 16 da patogênese da LLA e encontrar um biomarcador que possa estar relacionado à
 17 suscetibilidade ou prognóstico.

1 1.2 FATOR TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO BETA (TGF-B)

2 A família dos fatores transformadores de crescimento beta (TGF-B)
3 desempenha um papel fundamental em muitos processos fisiológicos e patológicos,
4 controlando o crescimento e a diferenciação de diversos tipos celulares. Incluída nesta
5 família estão as subfamílias das ativinas e inibinas, das proteínas morfogenéticas
6 ósseas (BMPs), dos fatores de crescimento e diferenciação (GDFs), dos fatores
7 neurotróficos derivados da glia (GDNFs) e dos fatores transformadores de
8 crescimento B (TGF-B) (KUBICZKOVA et al., 2012).

9 A subfamília do TGF-B revela uma alta conservação evolutiva (ZHANG et al.,
10 2006). O gene codifica três isoformas, TGF-B1, TGF-B2 e TGF-B3, e todas elas atuam
11 por meio de vias de sinalização semelhantes (CHEIFETZ et al., 1987; MITTL et al.,
12 1996). No entanto, elas possuem padrões de expressão diferentes durante o
13 desenvolvimento embrionário, produzindo fenótipos únicos em modelos animais com
14 ausência de cada uma delas (CHANG, BROWN e MATZUK, 2002). Entre as três, o
15 TGF-B1 é abundantemente encontrado em praticamente todos os tecidos adultos.

16 O TGF-B1 é secretado por inúmeras células, entre elas linfócitos, macrófagos,
17 plaquetas, neutrófilos e células tumorais (ALLEVA, BURGER e ELGERT, 1994;
18 BRANTON e KOPP, 1999; GROTENDORST, SMALE e PENCEV, 1989; MAEDA *et*
19 *al.*, 1995; PICKUP, NOVITSKIY e MOSES, 2013; SICA *et al.*, 2008; VIGNALI,
20 COLLISON e WORKMAN, 2008). Além disso, o TGF-B desempenha um papel na
21 regulação das HSCs e também interage no microambiente da medula óssea através
22 da ativação de células Schwann, células da glia e megacariócitos (YAMAZAKI *et al.*,
23 2011; ZHAO *et al.*, 2014).

24 A citocina TGF-B1 possui ação multifuncional (Figura 1), podendo regular o
25 crescimento celular, a diferenciação, a apoptose, a motilidade, a invasão, a produção
26 da matriz extracelular, a angiogênese e a resposta imune. No entanto, dependendo
27 do estágio do tumor, o TGF-B1 pode ter efeitos opostos. Nos estágios iniciais do
28 desenvolvimento tumoral, age como um supressor, pois inibe o crescimento do tumor,
29 enquanto nos estágios posteriores, estimula a invasão e disseminação do tumor
30 através da modulação do sistema imune e do microambiente tumoral (SYED, 2016).
31 A citocina TGF-B1 tem a capacidade de regular a proliferação de células epiteliais e
32 hematológicas, fomentando assim a progressão do câncer (KUBICZKOVA *et al.*,
33 2012). Além disso, seu efeito na hematopoiese depende da sua concentração: ora

1 superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo (BALASUBRAMANIAN *et al.*,
2 2004). Os polimorfismos nos genes envolvidos na resposta imune podem resultar em
3 variações na estrutura e na expressão das moléculas (KUBISTOVA, MRAZEK e
4 PETREK, 2009).

5 Estudos realizados na LLA têm buscado marcadores que possam estar
6 associados à suscetibilidade da doença ou influenciar na resposta à quimioterapia (LU
7 *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). Vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)
8 identificados em genes candidatos demonstram que o risco de leucemia, incluindo a
9 LLA, pode estar relacionado a SNPs que desempenham papel no metabolismo de
10 xenobióticos, reparo de DNA e até mesmo no funcionamento normal do sistema
11 imunológico (SCHIFFMAN, 2016).

12 O gene *TGFB1* localizado no cromossomo 19q13.1 foi identificado por possuir
13 diversos polimorfismos genéticos (CAMBIEN *et al.*, 1996). Estes polimorfismos foram
14 amplamente estudados em relação a várias doenças, como asma, doença arterial
15 coronariana, infecção do trato urinário, retinopatia diabética, cirrose hepática, colite
16 ulcerativa e fibrose cística (KIKUCHI *et al.*, 2007; OUESLATI *et al.*, 2015; PAINE *et*
17 *al.*, 2012; SILVERMAN *et al.*, 2004; SYRRIS *et al.*, 1998; SYUKRI *et al.*, 2014;
18 TAMIZIFAR *et al.*, 2007)

19 Um estudo que envolveu 170 pares de gêmeas mostrou que os níveis
20 plasmáticos de TGF-B1 são controlados geneticamente. Foram identificados dois
21 polimorfismos no gene *TGFB1*: um que troca uma guanina (G) por uma adenina (A)
22 no nucleotídeo de número 800 que vem antes do sítio de início da transcrição
23 (rs1800468, G–800A) e outro que troca uma citosina (C) por uma timina (T) no
24 nucleotídeo 509 antes do sítio de início da transcrição (rs1800469, C–509T). Por conta
25 da raridade do alelo A do polimorfismo G-800A, apenas o polimorfismo C-509T foi
26 analisado para verificar a sua influência nos níveis plasmáticos de TGF-B1. Observou-
27 se que o alelo T estaria relacionado ao aumento dos níveis plasmáticos da citocina.
28 No entanto, o polimorfismo G-800A ocorre em um sítio de ligação de uma família de
29 fatores de transcrição denominado de proteína ligante ao elemento de resposta ao 3'
30 5' monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (CREB), sugerindo que este polimorfismo
31 possa ser responsável pelo controle da expressão do gene *TGFB1* de outra forma
32 (GRAINGER *et al.*, 1999).

33 Embora estas variantes genéticas tenham sido associadas ao gene *TGFB1*, de
34 acordo com as sequências depositadas no Genbank, observa-se que o polimorfismo

1 G-800A se localiza no éxon 3 do gene que codifica para a proteína 2 contendo o
2 domínio B9 (*B9D2*), relacionada ao complexo tipo tectônico, localizado na zona de
3 transição dos cílios primários e atuando como barreira que previne a difusão de
4 proteínas transmembrana. Este gene possui papel na síndrome de Meckel tipo 10 e
5 síndrome de Joubert, entretanto, não foram descritos estudos avaliando o impacto
6 deste polimorfismo nestas síndromes.

7 Uma meta-análise foi realizada para investigar os efeitos do polimorfismo C-
8 509T no desenvolvimento de tumores sólidos. Os resultados indicaram que o alelo T
9 do polimorfismo C-509T parecia conferir proteção contra alguns tipos de tumores,
10 como câncer de mama e colorretal (LIU *et al.*, 2012; NIU *et al.*, 2010). Por outro lado,
11 outra meta-análise constatou que o alelo C para C-509T, bem como o alelo A para G-
12 800A, estavam associados a um aumento no risco de desenvolvimento de câncer
13 colorretal (LIU, ZHOU e ZHONG, 2012). Dois estudos de associação realizados na
14 população chinesa corroboraram os resultados, indicando que o alelo T para o
15 polimorfismo C-509T está associado ao risco de desenvolvimento de tumor hepático
16 (MA *et al.*, 2015; WAN *et al.*, 2015). Por outro lado, outro estudo mostrou que o mesmo
17 alelo T desempenharia um papel protetor contra o câncer de pulmão do tipo
18 adenocarcinoma e de células pequenas, sugerindo resultados diferentes (KANG *et al.*,
19 2006).

20 Estudos caso-controle envolvendo crianças e jovens diagnosticados com LLA
21 foram realizados para avaliar o polimorfismo C-509T, porém, não foi possível
22 estabelecer uma associação significativa entre a frequência genotípica ou alélica entre
23 os casos e os controles (DAI *et al.*, 2009; JASMINE, MARIE-HELENE e DANIEL,
24 2009).

25 A influência da secreção do TGF-B1 no câncer é outro parâmetro a ser
26 investigado, além da análise dos polimorfismos do gene. Estudos mostram que o TGF-
27 B1 pode ter um comportamento variável dependendo do tipo de tumor
28 (PAPAGEORGIS e STYLIANOPOULOS, 2015). Em casos de câncer de mama,
29 estudos mostraram um aumento significativo nos níveis plasmáticos de TGF-B1
30 (CIFTCI *et al.*, 2014; IVANOVIĆ *et al.*, 2003). Por outro lado, um estudo de KONG *et*
31 *al.* (1995) descobriu que os níveis plasmáticos desta citocina aumentaram antes da
32 cirurgia para retirada do tumor, mas diminuíram significativamente após o
33 procedimento. Além disso, os níveis plasmáticos de TGF-B1 também foram
34 observados a ser elevados em tumores pancreáticos, hepáticos, renais e prostáticos

1 (IVANOVIC *et al.*, 1995; JUNKER *et al.*, 1996; SHIRAI *et al.*, 1994; SINNREICH *et al.*,
2 2004; ZHAO *et al.*, 2016).

3 Em relação às neoplasias hematológicas, os resultados têm-se demonstrado
4 contraditórios. Dois estudos envolvendo 162 pacientes e 31 controles e outro com 35
5 pacientes e 27 controles observaram diminuição significativa nos níveis plasmáticos
6 do TGF-B1 em pacientes diagnosticados com mieloma múltiplo. No entanto, foi
7 observado aumento na concentração plasmática da citocina em pacientes
8 diagnosticados com síndrome mielodisplásica, mielofibrose, trombocitopenia
9 essencial e mielofibrose idiopática, e em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH)
10 (AKIYAMA *et al.*, 2005; EL-HEFNI, ALAZZAZI e TALEB, 2015; KYRTSONIS *et al.*,
11 1998; URBA SKA-RYS, WIERZBOWSKA e ROBAK, 2003). Notavelmente, AL-
12 MOWALLAD *et al.* (2006) não encontraram diferença significativa na concentração
13 plasmática do TGF-B1 em pacientes diagnosticados com LLA.

14 Dessa forma, a severidade da LLA e o impacto dos polimorfismos no *TGFB1*
15 na patogênese da mesma permanecem incertos. No entanto, investigações sobre a
16 influência destes polimorfismos na patogênese da LLA ajudam a entender melhor o
17 quadro clínico desta neoplasia.

1 2 OBJETIVOS

2 2.1 OBJETIVO GERAL

- 3 - Investigar o papel dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469 do *TGFB1* e da sua
4 expressão proteica no plasma da medula óssea na patogênese da LLA infanto-juvenil.

5 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 6 - Analisar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs1800468 e
7 rs1800469 do gene *TGFB1* em pacientes com LLA.
8 - Determinar os níveis plasmáticos de TGF-B1 em amostra de medula e correlacionar
9 com os parâmetros clínico patológicos dos pacientes com LLA.
10 - Comparar a presença dos polimorfismos do gene *TGFB1* com os níveis plasmáticos
11 de TGF-B1.

1 3 MATERIAIS E MÉTODOS

2 3.1 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

3 O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
4 da Universidade Estadual de Londrina (CEP/UEL 189/2013 – CAAE Nº
5 164.0.268.000-09) (Anexo A). Os sujeitos do estudo somente foram considerados
6 aptos mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
7 por seus responsáveis (Anexo B).

8 O grupo foi composto por pacientes atendidos e diagnosticados no Hospital do
9 Câncer de Londrina (HCL), sendo que o convite para participarem do projeto foi
10 realizado aos responsáveis pelos pacientes durante o atendimento clínico no Serviço
11 de Oncopediatria do HCL. Um total de 39 crianças e adolescentes de 1 a 16 anos
12 participaram deste projeto no período de 2014 a 2018, sendo que os mesmos foram
13 encaminhados para o centro cirúrgico, onde foram submetidos a indução anestésica
14 para coleta de medula óssea (MO) pelo médico hematologista. Foi coletado 1ml de
15 MO e colocado em tubo de EDTA, sendo identificado e armazenado. Os dados clínicos
16 dos pacientes foram obtidos a partir da consulta autorizada de seus prontuários no
17 banco de dados do HCL.

18 Após a realização de exames hematológicos, mielograma, imunofenotipagem
19 e análise citogenética o diagnóstico da LLA foi confirmado e o hematologista
20 classificou cada paciente em alto e baixo risco segundo os critérios do BFM 2009.
21 Para avaliação da recidiva, o período de acompanhamento (*follow-up*) se estendeu
22 por 8 anos (2014 a 2022).

23 3.2 OBTENÇÃO DE MEDULA ÓSSEA

24 Amostras de medula óssea (1mL) foram coletadas em tubos de EDTA. Este
25 exame foi realizado no Centro Cirúrgico do HCL pelo médico hematologista
26 oncopediátrico. O exame foi realizado com sedação da criança (sendo realizado pelo
27 médico anestesista do mesmo hospital) e a punção foi realizada com agulha de fino
28 calibre na crista ilíaca posterior. Com o auxílio de uma seringa procedeu-se à
29 aspiração da MO, e compressão local logo após aspiração. A amostra foi centrifugada
30 a 2500g por 15 minutos, e o plasma foi separado e armazenado a -80 °C para os

1 ensaios de quantificação dos níveis plasmáticos de TGF-B1.

2 3.3 OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO

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

7 3.4 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO *TGF-B1* POR PCR-RFLP

8 A análise dos polimorfismos genéticos foi realizada por reações em
9 cadeia da polimerase seguidas de restrição enzimática (PCR-RFLP), de
10 acordo com a técnica descrita por JIN *et al.* (2004). Um seguimento do gene
11 *TGFB1* foi amplificado por PCR, um deles englobando os polimorfismos da
12 rs1800468, G-800A e rs1800469, C-509T).

13 As concentrações dos reagentes utilizadas foram as mesmas para
14 ambas as regiões, como exposto na tabela 2. Todos os reagentes de PCR
15 (*buffer*, MgCl₂, dNTP, iniciadores, albumina e *Taq* DNA polimerase) foram
16 adquiridos da Invitrogen® (Carlsbad, CA, EUA). Para amplificação da região dos
17 polimorfismos da região promotora as sequências dos pares de
18 oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram: 5'-
19 GCAGTTGGCGAGAACAGTTG-3' (*Primer Forward*) e 5'-
20 CCAGAACGGAAGGAGAGTCAG-3' (*Primer Reverse*). As concentrações de
21 reagentes utilizadas encontram-se expostas na tabela 2. As condições de
22 ciclagem da PCR encontram-se expostas na tabela 3.

23

24

25

26

27

28

1 **Tabela 2** - Concentrações de reagentes utilizados na reação.

Reagentes (concentração)	Concentração final	Volume (µL)
Buffer (10 X)	1 X	2,50
MgCl ₂ (50 mM)	1,0 mM	0,50
dNTP (1,25 mM)	0,1 mM	2,00
Primer Fwd (2,5 µM)	0,20 µM	2,00
Primer Rev (2,5 µM)	0,20 µM	2,00
Albumina sérica bovina (20 X)	0,8 X	1,00
Taq DNA Polimerase (5 U/µL)	1U	0,20
Água ultrapura	-	13,80
Amostra	~100 ng	~1,00
Total	-	25,0

2

3 **Tabela 3** - Condições utilizadas para a amplificação das regiões do gene *TGFB1*.

4

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

5

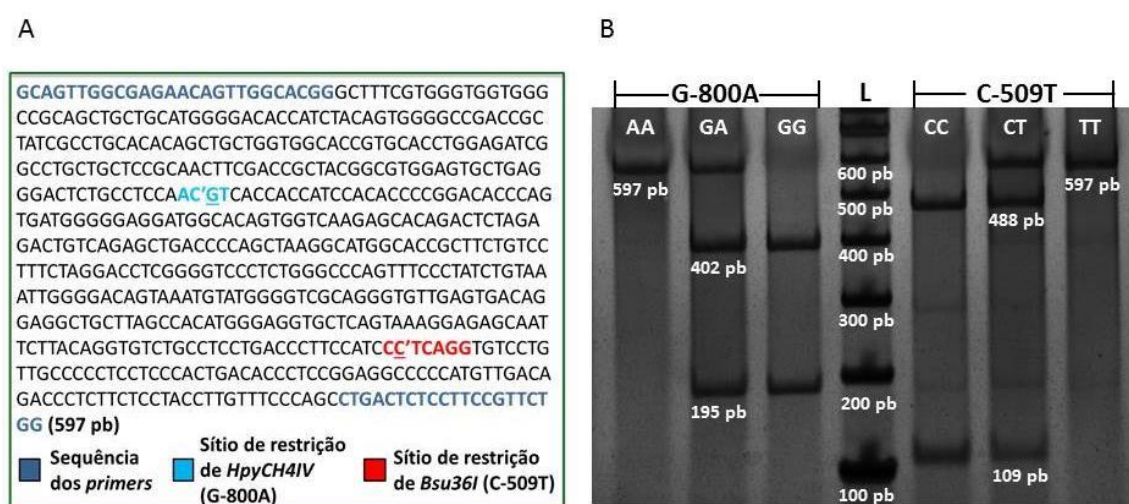
6 A amplificação foi analisada por eletroforese em géis de poliacrilamida
7 (10%) corados com nitrato de prata (AgNO₃). Em amostras com amplificação
8 positiva, os fragmentos obtidos foram clivados por enzimas de restrição (New
9 England Biolabs®, Ipswich, MA, EUA), utilizando 1U da enzima para clivar 4µL
10 do produto de PCR em no mínimo 2h de incubação a 37°C, seguindo as
11 recomendações do fabricante. Os fragmentos gerados pela restrição
12 enzimática foram analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida (10%)
13 corados com AgNO₃.

14 Para a região promotora, um fragmento de 597 pares de base (pb) é gerado. A
15 enzima de restrição *HpyCH4IV* foi utilizada para determinar o polimorfismo G-800A,
16 uma vez que a substituição elimina o sítio de restrição para essa enzima no fragmento
17 amplificado. Assim, a clivagem do alelo G gera dois fragmentos de 402 pb e 195 pb
18 respectivamente, enquanto o alelo G não é clivado, mantendo o tamanho originalde
19 597 pb.

1 Já para a análise do polimorfismo C-509T, foi utilizada a enzima *Bsu36I*,
 2 que reconhece o sítio de restrição no alelo selvagem, clivando o fragmento
 3 amplificado em fragmentos de 488 pb e 109 pb. A substituição elimina o
 4 sítio de restrição da enzima. Portanto, o alelo contendo a substituição
 5 permanece inalterado após a clivagem. A Figura 2 demonstra o fragmento
 6 amplificado para a análise dos polimorfismos da região promotora do
 7 *TGFB1*, destacando os sítios de restrição das enzimas utilizadas e os
 8 nucleotídeos polimórficos (que encontram-se sublinhados)(Figura 2A), e os
 9 perfis de fragmentos apresentadas para cada genótipo após a restrição
 10 enzimática (Figura 2B).

11

12 **Figura 2** - Análise dos polimorfismos da região promotora do *TGFB1*.



13 A. Sequência do gene *TGFB1* amplificada pelos primers da reação de PCR. B.
 14 Genotipagem dos polimorfismos G-800A e C-509T em gel de poliacrilamida. L=
 15 marcador de peso molecular (*ladder*), pb= pares de bases.

16 3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TGF-B1

17 Análise quantitativa dos níveis de TGF-B1 plasmática foi realizada usando o
 18 ensaio imunoenzimático (ELISA) usando o conjunto de ELISA Humano TGF-B1 da
 19 BD OptEIA™ (*BD Biosciences Pharmingen*, San Diego, CA, EUA), de acordo com as
 20 condições do fabricante. Para realizar essa análise quantitativa, uma curva padrão
 21 para cada ensaio foi desenhada usando o padrão de proteína serialmente diluído. Os
 22 resultados das amostras foram expressos em pg/ml e a leitura foi realizada a 450nm

1 em um leitor ELISA Bio-Tek ELS 800 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA)
2 dentro de 30 minutos da adição da solução de parada. Cada amostra foi lida e
3 executada em duplicata, e amostras que mostravam um alto coeficiente de variação
4 (CV>5%) entre as duplicatas foram desconsideradas.

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

1 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

2 A comparação dos níveis plasmáticos de TGF-B1 foi realizada usando o teste
3 não-paramétrico de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis*, usando o software *GraphPad*
4 *Prism* (Versão 6.01). Para todas as análises, o nível de significância adotado foi p
5 <0,05.

1 4 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

2 INCREASED TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 IN BONE MARROW 3 PLASMA IS ASSOCIATED WITH HIGH RISK ACUTE LYMPHOBLASTIC 4 LEUKEMIA

5 6 **Abstract**

7 Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disorder originating from a single
8 hematopoietic precursor committed to the B or T cell lineage. The exact cause of
9 leukemogenesis is unknown, but it is believed that it is the result of a combination of
10 environmental and genetic factors. The transforming growth factor beta 1 (TGF-B1) is
11 a pleiotropic cytokine that regulates immunomodulation and hematologic cell
12 proliferation. The gene that codes for TGF-B1 contains two polymorphisms, rs1800468
13 (G-800A) and rs1800469 (C-509T), presenting suggestive roles as risk and prognosis
14 maskers in cancer. These polymorphisms have been noted as potential markers
15 associated with cancer and other diseases. The present study evaluated
16 polymorphisms of the *TGFB1* and plasma levels of TGF-B1 in 39 ALL patients.
17 Analysis of genetic polymorphisms was performed by polymerase chain reaction
18 method by evaluation of restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and
19 TGF-B1 plasma levels were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay
20 (ELISA). In protein expression analysis, the polymorphisms of promoter region were
21 not associated to changes of TGF-B1 plasma concentration. However, patients with
22 ALL-T showed significantly increased mean TGF-B1 concentration when compared to
23 ALL-B ($p=0.0111$), which could be of great importance in leukemia pathophysiology
24 and a possible molecular marker of prognosis. Therefore, further studies with a larger
25 number of patients should be conducted to investigate the plasma levels of TGF-B1 in
26 patients with ALL-T.

27

28 **Keywords:** ALL; TGF-B1; Genetic Variants; Genetic Polymorphism.

29

30

31

32

33

1 INTRODUCTION

2

3 Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is a malignant disorder that develops from
4 a single hematopoietic cell with a genetic mutation involving genes related to the
5 differentiation of B or T lymphocytes. This alteration prevents the maturation and
6 multiplication of the transformed cell (1). The Brazilian estimation, conducted by the
7 National Cancer Institute, forecasts for the years 2023 to 2025 approximately 11,540
8 new cases of leukemia per year, 6,250 in men and 5,290 in women (2).

9 The Transforming Growth Factor Beta (TGF-B) family plays a fundamental role
10 in many physiological and pathological processes, controlling the growth and
11 differentiation of various cell types. The cytokine TGF-B1 has a multifunctional action,
12 being able to regulate cell growth, differentiation, apoptosis, motility, invasion,
13 extracellular matrix production, angiogenesis and immune response (6). Dysregulation
14 of the TGF-B1 signaling pathway has been associated with tumor transformation (7).

15 It is widely accepted that genetic polymorphisms or sequence variants are
16 commonly found throughout the human genome and can be linked to the development
17 of certain diseases and/or prognosis. Consequently, these variations can lead to
18 altered gene function, which can be used to predict the probability of a particular
19 condition (8). Two polymorphisms, rs1800468 and rs1800469, located at positions -
20 800 and -509 from the start codon, respectively, have been identified and may have
21 important effects on the role of TGFB1 gene. In ALL, their implications have been
22 suggested but conclusions are still unclear (9).

23 Moreover, in the context of malignant neoplasia, aberrant TGF-B1 signaling has
24 been linked to tumor initiation, progression, and metastasis (Baba et al, 2022). TGF-
25 B1 acts as a double-edged sword in cancer biology (Akhurst et al, 2001), and
26 specifically in acute leukemias, the dysregulation of TGF-B1 signaling pathways has
27 been implicated in leukemogenesis and disease progression (Bewersdorf et al, 2019;
28 Furler et al, 2018). Research indicates that TGF-B1 can contribute to the escape of
29 leukemic cells from immune surveillance (Rouce et al, 2016) and promote a
30 microenvironment favorable for leukemia cell survival and growth (Baba et al, 2022;
31 Zhang et al, 2021).

32 ALL is a type of cancer that demonstrates complexity from pathogenesis to
33 establishment of diagnosis and treatment. Furthermore, several intrinsic factors can
34 influence the course of the disease. Therefore, it is necessary to investigate molecules,

1 such as growth factors, to understand some of the pathogenesis of ALL and perhaps
2 find a biomarker that may be related to susceptibility or prognosis.

3 Here we observed a lack of association between rs 1800468 and rs 1800469
4 with prognostic factors in ALL. However, increasing TGFB1 levels in bone marrow
5 plasma were found in high risk compared to low-risk patients. Its implications in ALL
6 pathogenesis were further explored plasma levels of TGF-B1 protein in the
7 pathogenesis of childhood and adolescent acute ALL.

8

9

10 **MATERIALS AND METHODS**

11

12 *Study population*

13 After approval by the Human Ethics Committee of the State University of
14 Londrina (CAAE nº 164.0.268.000-09). Informed consent was obtained from all
15 individuals (or their guardians) included in the study. Bone marrow (2 mL) was
16 collected from patients between 1 and 16 years old from 2014 to 2018, diagnosed with
17 ALL treated at the Londrina Cancer Hospital (LCH), Paraná, Brazil. Patient diagnoses
18 were based on LCH Division of Hematology/Oncology guidelines; the risk of relapse
19 was classified based on the BFM Protocol (Berlin-Frankfurt-Munich – 2009) (10, 11).

20

21 *Obtaining Bone Marrow*

22 Bone marrow samples were collected in EDTA tubes. This examination was
23 carried out at the HCL Surgical Center by an oncopediatric hematologist. The
24 examination was carried out with the child sedated (performed by an anesthetist from
25 the same hospital) and the puncture was performed with a fine-caliber needle in the
26 posterior iliac crest. With the aid of a syringe, the BM was aspirated, and local
27 compression was performed immediately after aspiration. The sample was centrifuged
28 at 2500g for 15 minutes, and the plasma was separated and stored at -80 oC for ELISA
29 assays.

30

31 *Genomic DNA extraction*

32 Genomic DNA was extracted from bone marrow by Biopur Mini Spin Plus Kit
33 (Biometrix Diagnostica, Curitiba, Brazil), according to manufacturer's instructions. DNA
34 was eluted in 50 µL of elution buffer and quantified by NanoDrop 2000c®

1 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA), at wavelength of
2 260/280 to indicate DNA concentration and purity.

3 4 *TGFB1 genotyping*

5 Analysis of two polymorphisms in *TGFB1* (rs1800468 and rs1800469) was
6 performed by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length
7 polymorphism (RFLP) as per prior studies (8, 9, 12). All PCR reagents were obtained
8 from Invitrogen™ (Carlsbad, CA, USA). All restriction enzymes were provided by New
9 England Biolabs® (Ipswich, USA). Restriction fragments were then analyzed by
10 electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate.

11 12 *Bone marrow plasma TGFB1 quantification*

13 Analysis was performed on bone marrow, using BD OptEIA™ Human TGF-B1
14 Set (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). Briefly, blood plasma from each
15 patient was added into the precoated plate with monoclonal anti-human TGF-B1. The
16 results were expressed in ng/ml. Each sample was assayed in two biological replicates.
17 Data was performed using the analytical curve-fitting software Gen5 (BioTek,
18 Instrument Corporation, VT, EUA).

19 20 *Statistical analysis*

21 The comparison of plasma TGF-B levels was performed using the
22 nonparametric Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis, using GraphPad Prism software
23 (Version 6.01). For all analyses, the significance level adopted was $p < 0.05$.

24 25 26 **3 RESULTS**

27 A total of 39 children and adolescents diagnosed with ALL were included in the
28 present work. The ALL group was divided into two subsets: 33 ALL-B carriers and 6
29 ALL-T carriers. The clinical-pathological parameters of the patients in each ALL group
30 are shown in Table 1.

31
32
33
34

1 **Table 1.** Distribution of clinical pathological parameters of patients with ALL.

Parameters	ALL	ALL-B	ALL-T
Age			
Mean (SD)	7 (5)	7 (5)	8 (5)
Median (IQR)	7 (9)	6 (7)	9 (10)
≥ 1 e < 9 [n (%)]	23 (59.0)	20 (60.6)	3 (50.0)
< 1 e ≥ 9 [n (%)]	16 (41.0)	13 (39.4)	3 (50.0)
Sex [n (%)]			
Female	18 (46.1)	15 (45.5)	3 (50.0)
Male	21 (53.9)	18 (54.5)	3 (50.0)
Group of risk [n (%)]			
Low Risk (LR)	10 (25.6)	10 (30.3)	0 (0.0)
High Risk (HR)	29 (74.4)	23 (69.7)	6 (100.0)
Relapse [n (%)]			
Yes	14 (35.9)	12 (36.4)	2 (33.3)
No	25 (64.1)	21 (63.6)	4 (66.7)

2 SD: Standard deviation; IQR: interquartile range

3 By analyzing the genotypic and allelic distribution of polymorphisms in the
4 *TGFB1* gene, as shown in Table 2, we can observe that the GG genotype was the
5 most predominant for the polymorphism rs1800468, with the G allele being the most
6 frequent compared to the A allele. It was not possible to observe in the analyzed cohort
7 the presence of the mutated genotype in homozygosity (AA). Regarding the rs1800469
8 polymorphism, the CT genotype was more frequent than the CC and TT genotypes.
9 Regarding allelic frequency, the C allele was the most common compared to the T
10 allele.

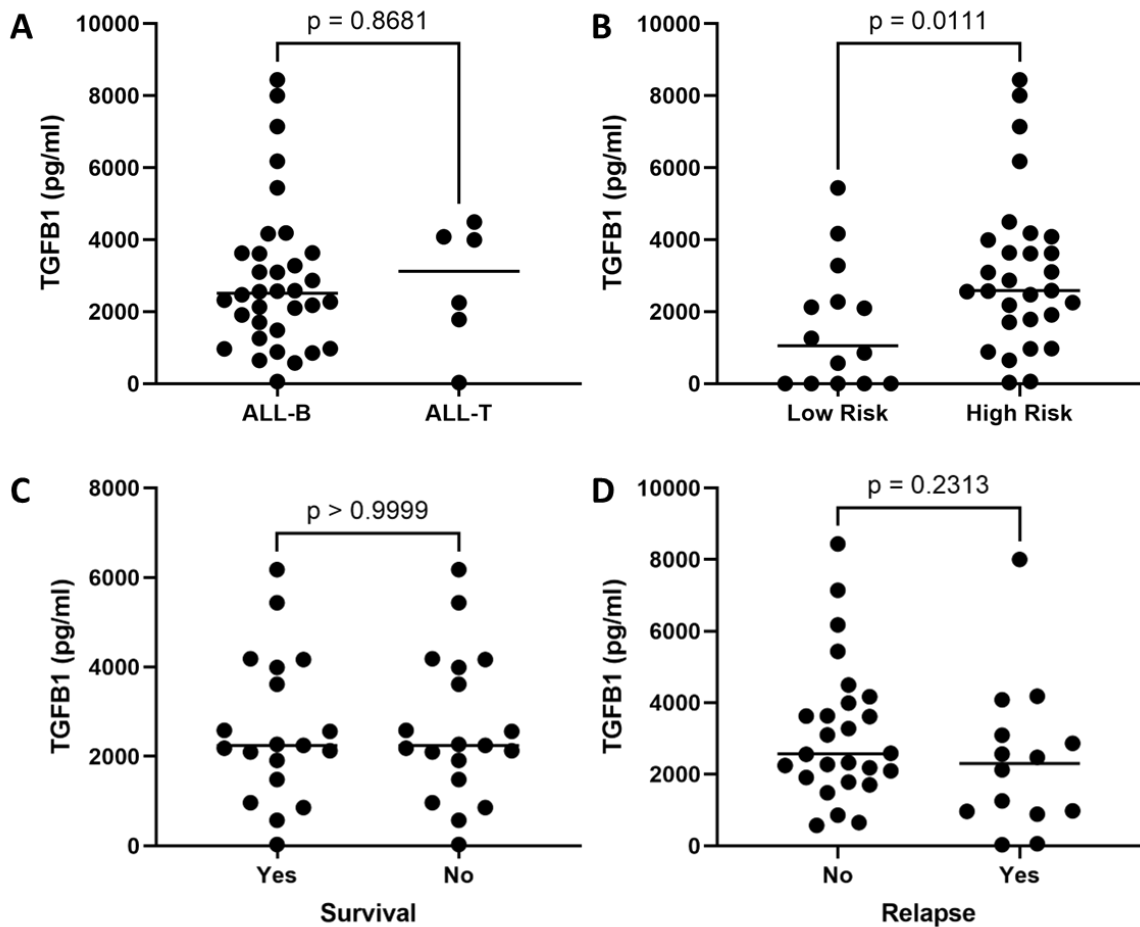
11

12 **Table 2.** Allele and genotype frequencies of the rs1800468 and rs1800469
13 polymorphisms in ALL patients.

	<i>TGF-B1</i>	ALL [n (%)]		
		ALL	ALL-B	ALL-T
rs1800468	Genotypes			
	GG	36 (92.3)	30 (90.9)	6 (100.0)
	GA	3 (7.7)	3 (9.1)	0 (0.0)
	Alelle frequency			
	G	75 (96.1)	63 (95.5)	12 (100.0)
	A	3 (3.9)	3 (4.5)	0 (0.0)
rs1800469	Genotypes			
	CC	16 (41.0)	15 (45.4)	1 (16.7)
	CT	19 (48.7)	15 (45.4)	4 (66.6)
	TT	4 (10.3)	3 (9.2)	1 (16.7)
	Alelle frequency			
	C	51 (68.0)	45 (68.2)	6 (50.0)
T	24 (32.0)	21 (31.8)	6 (50.0)	

14

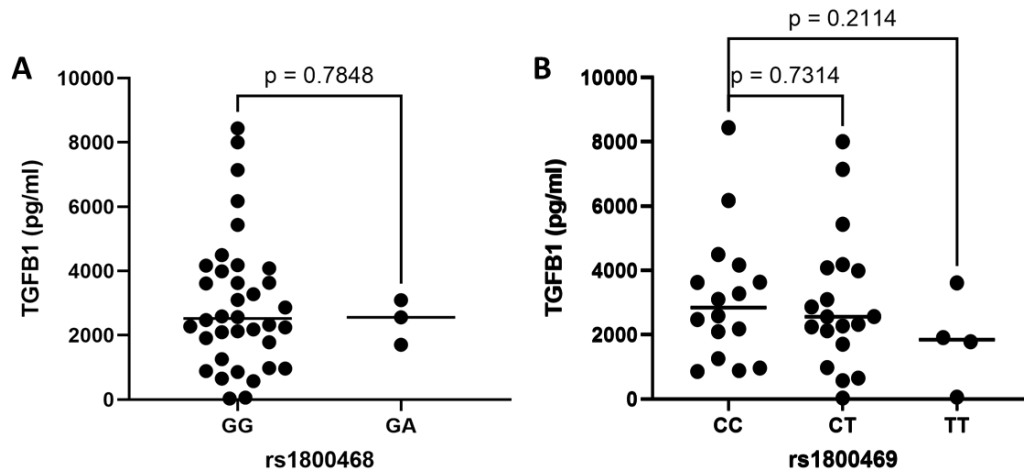
1 In this study, a comparison of bone marrow plasma levels of TGF-B1 with some
 2 clinicopathological characteristics of patients with ALL was also carried out, as shown
 3 in Figure 1, with no significant difference observed between ALL-T and ALL-B patients,
 4 survival and relapse. However, it was observed that patients classified as high risk had
 5 higher plasma levels of TGF-B1 compared to low-risk patients ($p=0.0111$) (Figure 1B).
 6



7 **Figure 1 – TGFβ1 plasma levels in ALL patients. A)** TGFβ1 bone marrow plasma
 8 levels in ALL patients classified by ALL type **B)** risk of relapse. **C)** survival. **D)** and
 9 relapse.
 10

11 Moreover, TGFβ1 plasma levels were compared between genotypes of *TGFB1*
 12 (rs1800468 and rs1800469) polymorphisms, and no differences were detected, as
 13 shown in Figure 2.
 14
 15
 16
 17

1 **Figure 2 – Comparison of TGF-B1 plasma levels with *TGFB1***
 2 **polymorphism genotypes**



3 **A)** TGF-B1 bone marrow plasma levels according to rs1800468 *TGFB1*
 4 polymorphisms in patients with ALL. **B)** TGF-B1 concentration in rs1800469
 5 genotypes. ALL: acute lymphoblastic leukemia

8 **4 DISCUSSION**

9 In this work, a higher number of patients in the age range of 1 to 8 years was
 10 verified. Regarding the sex of the individuals, for ALL-general, the male sex was slightly
 11 predominant among the patients, however, the frequency for both sexes was similar
 12 for the ALL-B and ALL-T groups. According to Ries, Smith (13), the peak incidence of
 13 ALL occurs in the age range of 2 to 5 years, being more common in boys than in girls.
 14 Regarding the distribution of the general ALL patients, 84.6% (33/39) patients
 15 correspond to the ALL-B group and 15.4% (6/39) ALL-T. Values that are similar to
 16 those found in the literature, in which the distribution of ALL was primarily of the B cell
 17 lineage (85%) followed by the T cell lineage (10-15%) (14).

18 In relation to the genotypic and allelic frequency of the rs1800468 and
 19 rs1800469 polymorphism of the *TGFB1* gene the present study corroborates with
 20 previous studies and existing databases. In a case-control study conducted by Dai,
 21 Gast (15), which carried out the analysis of several polymorphisms in the *TGFB1* gene
 22 in patients with ALL, the CC and CT genotypes of the rs1800469 were found to be the
 23 most frequent compared to the homozygous mutated genotype for both groups. In
 24 another study by Sakaguchi, Amarante (9), the genotypic frequencies of the rs1800469

1 CC, CT and TT were respectively 37.5%, 47.1% and 15.4% in ALL patients. In addition
2 to this polymorphism, rs1800468 was also evaluated and the observed proportions
3 were 90.4% for the GG genotype and 9.6% for the GA, and the AA genotype was also
4 observed to be absent in Brazilian patients with ALL.

5 Considering the involvement of the polymorphisms of the *TGFB1* promoter
6 region with the plasma protein levels in the bone marrow, no association was observed
7 with the genotypes of the polymorphisms rs1800468 and rs1800469. Similar results
8 were observed in the work of Sakaguchi, Amarante (9), who evaluated plasma levels
9 in the peripheral blood of patients with diagnosis of ALL and healthy children and
10 adolescents. Therefore, it is difficult to conclude whether the polymorphisms have
11 functional roles in TGF-B1 plasma expression due to the limited number of patients
12 included in this study.

13 The influence of TGF-B1 secretion on cancer is another parameter to be
14 investigated, in addition to the analysis of gene polymorphisms. Studies show that
15 TGF-B1 can have variable behavior depending on the type of tumor (16). The plasma
16 levels of TGF-B1 were observed to be elevated in breast cancer, pancreatic, hepatic,
17 renal and prostate tumors (17-22). In relation to hematological neoplasms, the results
18 have been demonstrated to be contradictory. Two studies observed a significant
19 decrease in plasma levels of TGF-B1 in patients diagnosed with multiple myeloma.
20 However, an increase in plasma cytokine concentration was observed in patients
21 diagnosed with myelodysplastic syndrome, myelofibrosis, essential thrombocytopenia,
22 and idiopathic myelofibrosis, and in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) (23-
23 26).

24 Notably, Al-Mowallad, Carr (27) did not find a significant difference in plasma
25 concentration of TGF-B1 in patients diagnosed with ALL. In contrast to these findings,
26 a study by Sakaguchi, Amarante (9) observed that ALL patients showed significantly
27 lower plasma levels of TGF-B1 when compared to controls. This finding is consistent
28 with Wu, Chen (28), who observed that serum TGF-B1 levels were decreased in acute
29 leukemia patients, returned to normal in those who achieved complete remission, and
30 decreased again in those who had a recurrence. Interestingly, in our work it was
31 possible to observe that in patients diagnosed with ALL-T have higher plasmatic levels
32 of TGF-B1 compared to patients with ALL-B.

33 Our results may suggest that TGF-B1 levels are higher in ALL-T compared to
34 ALL-B, which could be of great importance in leukemia pathophysiology and a possible

1 molecular marker of prognosis. Therefore, further studies should be conducted,
2 assessing a larger number of patients, to investigate the plasma levels of TGF-B1 in
3 patients with ALL-T.

4

5 **Acknowledgments**

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

11 **Informed consent:** Informed consent was obtained from all individual
12 participants included in the study.

13 **Declaration of Interest Statement**

14 The authors declare no conflicts of interests regarding the publication of this
15 manuscript.

16

17 **5 REFERENCES**

- 18 1. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and
19 therapy of pediatric acute leukemias: an update. *Journal of clinical oncology : official*
20 *journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(5):551-65.
- 21 2. INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. In: Silva INdCJAGd,
22 editor. Rio de Janeiro 2022.
- 23 3. El-Chennawi FA, Al-Tonbary YA, Mossad YM, Ahmed MA. Immune
24 reconstitution during maintenance therapy in children with acute lymphoblastic
25 leukemia, relation to co-existing infection. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*.
26 2008;13(4):203-9.
- 27 4. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the
28 tumor microenvironment. *Nature immunology*. 2013;14(10):1014-22.
- 29 5. Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor
30 microenvironment. *Cancer research*. 2012;72(13):3125-30.
- 31 6. Syed V. TGF- β Signaling in Cancer. *Journal of cellular biochemistry*.
32 2016;117(6):1279-87.
- 33 7. Kim SJ, Letterio J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and
34 malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2003;17(9):1731-7.
- 35 8. Vitiello GAF, Guembarovski RL, Hirata BKB, Amarante MK, de Oliveira CEC,
36 de Oliveira KB, et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) polymorphisms and
37 haplotype structures have dual roles in breast cancer pathogenesis. *Journal of cancer*
38 *research and clinical oncology*. 2018;144(4):645-55.
- 39 9. Sakaguchi A, Amarante M, Oliveira C, Hiroki C, Trigo F, Angelica M, et al.
40 Transforming Growth Factor Beta 1: Possible Involvement with Acute Lymphoblastic
41 Leukemia Prognosis in Pediatric Patients. *Clinical Oncology and Research*. 2020.
- 42 10. Cazé M, Bueno D, Santos M. Estudo Referencial de um Protocolo

- 1 Quimioterápico para Leucemia Linfocítica Aguda Infantil. *Clinical and Biomedical*
2 *Research*. 2010;30.
- 3 11. Brandalise SR, Viana MB, Pinheiro VR, Mendonça N, Lopes LF, Pereira WV, et
4 al. Shorter Maintenance Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The
5 Experience of the Prospective, Randomized Brazilian GBTLI ALL-93 Protocol.
6 *Frontiers in pediatrics*. 2016;4:110.
- 7 12. Jin Q, Hemminki K, Grzybowska E, Klaes R, Söderberg M, Zientek H, et al.
8 Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming growth factor β 1
9 and its receptors in familial and unselected breast cancers. *International Journal of*
10 *Cancer*. 2004;112(1):94-9.
- 11 13. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet MS, Tamra T, Young JL, et al., editors.
12 *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER*
13 *Program 1975-1995*1999.
- 14 14. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, et
15 al. International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry
16 study. *The Lancet Oncology*. 2017;18(6):719-31.
- 17 15. Dai L, Gast A, Horska A, Schrappe M, Bartram CR, Hemminki K, et al. A case-
18 control study of childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms in the
19 TGF- β and receptor genes. *Pediatric Blood & Cancer*. 2009;52(7):819-23.
- 20 16. Papageorgis P, Stylianopoulos T. Role of TGF β in regulation of the tumor
21 microenvironment and drug delivery (review). *International journal of oncology*.
22 2015;46(3):933-43.
- 23 17. Zhao J, Liang Y, Yin Q, Liu S, Wang Q, Tang Y, et al. Clinical and prognostic
24 significance of serum transforming growth factor-beta1 levels in patients with
25 pancreatic ductal adenocarcinoma. *Brazilian journal of medical and biological research*
26 = *Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2016;49(8).
- 27 18. Sinnreich O, Kratzsch J, Reichenbach A, Gläser C, Huse K, Birkenmeier G.
28 Plasma levels of transforming growth factor-1beta and alpha2-macroglobulin before
29 and after radical prostatectomy: association to clinicopathological parameters. *The*
30 *Prostate*. 2004;61(3):201-8.
- 31 19. Shirai Y, Kawata S, Tamura S, Ito N, Tsushima H, Takaishi K, et al. Plasma
32 transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma.
33 Comparison with chronic liver diseases. *Cancer*. 1994;73(9):2275-9.
- 34 20. Junker U, Knoefel B, Nuske K, Rebstock K, Steiner T, Wunderlich H, et al.
35 Transforming growth factor beta 1 is significantly elevated in plasma of patients
36 suffering from renal cell carcinoma. *Cytokine*. 1996;8(10):794-8.
- 37 21. Ivanovic V, Melman A, Davis-Joseph B, Valcic M, Geliebter J. Elevated plasma
38 levels of TGF-beta 1 in patients with invasive prostate cancer. *Nature medicine*.
39 1995;1(4):282-4.
- 40 22. Ciftci R, Tas F, Yasasever CT, Aksit E, Karabulut S, Sen F, et al. High serum
41 transforming growth factor beta 1 (TGF-B1) level predicts better survival in breast
42 cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for*
43 *Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(7):6941-8.
- 44 23. Akiyama T, Matsunaga T, Terui T, Miyanishi K, Tanaka I, Sato T, et al.
45 Involvement of transforming growth factor-beta and thrombopoietin in the
46 pathogenesis of myelodysplastic syndrome with myelofibrosis. *Leukemia*.
47 2005;19(9):1558-66.
- 48 24. El-Hefni AM, Alazzazi NMA, Taleb FMA. Prognostic Utility of Transforming
49 Growth Factor Beta-1 in Diffuse Large Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Journal of*
50 *hematology*. 2015;4:131-6.

- 1 25. Kyrtsolis MC, Repa C, Dedoussis GV, Mouzaki A, Simeonidis A, Stamatelou
2 M, et al. Serum transforming growth factor-beta 1 is related to the degree of
3 immunoparesis in patients with multiple myeloma. *Medical oncology* (Northwood,
4 London, England). 1998;15(2):124-8.
- 5 26. Urbaska-Rys H, Wierzbowska A, Robak T. Circulating angiogenic cytokines in
6 multiple myeloma and related disorders. *European cytokine network*. 2003;14(1):40-
7 51.
- 8 27. Al-Mowallad A, Carr T, Al-Qouzi A, Li C, Byers R, Kumar S. Plasma CD105,
9 TGF-Beta-1, TGF-Beta-3 and the ligand/receptor complexes in children with acute
10 lymphoblastic leukaemia. *Anticancer research*. 2006;26(1b):543-7.
- 11 28. Wu Y, Chen P, Huang H-F, Huang M-J, Chen Y-Z. Reduction of transforming
12 growth factor- β 1 expression in leukemia and its possible role in leukemia development.
13 *Leukemia & Lymphoma*. 2012;53(1):145-51.
- 14 29. Horacek JM, Kupsa T, Vasatova M, Jebavy L, Zak P. Evaluation of serum levels
15 of multiple cytokines and adhesion molecules in patients with newly diagnosed acute
16 lymphoblastic leukemia using biochip array technology. *Experimental oncology*.
17 2013;35(3):229-30.
- 18 30. Dong M, Blobe GC. Role of transforming growth factor-beta in hematologic
19 malignancies. *Blood*. 2006;107(12):4589-96.
- 20 31. Døsen-Dahl G, Munthe E, Nygren MK, Stubberud H, Hystad ME, Rian E. Bone
21 marrow stroma cells regulate TIEG1 expression in acute lymphoblastic leukemia cells:
22 role of TGF-Beta/BMP-6 and TIEG1 in chemotherapy escape. *Int J Cancer*.
23 2008;123(12):2759-66.
- 24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

1 5 CONCLUSÃO

- 2 • Não foi observada correlação entre os polimorfismos rs1800468 e rs1800469
3 do *TGFB1* e os níveis plasmáticos de TGF-B1, sugerindo que estas variações
4 genéticas não alteram a quantidade da citocina presente na medula.
- 5 • Os níveis plasmáticos de TGF-B1 foram estatisticamente diferentes entre os
6 grupos LLA-B e LLA-T, sendo que na LLA-B os níveis eram significativamente
7 maiores que na LLA-T ($p=0,011$);
- 8 • Apesar de necessitar de mais investigações, é possível supor que os valores
9 plasmáticos de TGF-B1 possam servir como um marcador prognóstico da LLA.

1 **6 REFERÊNCIAS**

- 2 AKIYAMA, T. et al. Involvement of transforming growth factor-beta and thrombopoietin
3 in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome with myelofibrosis. **Leukemia**, v. 19,
4 n. 9, p. 1558-1566, Sep 2005. ISSN 0887-6924 (Print)
5 0887-6924.
6
- 7 AL-MOWALLAD, A. et al. Plasma CD105, TGF-Beta-1, TGF-Beta-3 and the
8 ligand/receptor complexes in children with acute lymphoblastic leukaemia. **Anticancer**
9 **Res**, v. 26, n. 1b, p. 543-547, Jan-Feb 2006. ISSN 0250-7005 (Print)
10 0250-7005.
11
- 12 ALLEVA, D. G.; BURGER, C. J.; ELGERT, K. D. Tumor-induced regulation of
13 suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived
14 IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. **J Immunol**, v. 153, n. 4, p. 1674-1686, Aug
15 15 1994. ISSN 0022-1767 (Print)
16 0022-1767.
17
- 18 ANJOS, A.R.; SILVA, M.A.; BORELLI, P. Matriz Extracelular e Leucemia.
19 Rev.bras.hematol.hemoter., 2000, 22(3): 404-412. [https://doi.org/10.1590/S1516-](https://doi.org/10.1590/S1516-84842000000300007)
20 [84842000000300007](https://doi.org/10.1590/S1516-84842000000300007)
21
- 22 ARMSTRONG, S. A. et al. Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target
23 identified by gene expression based classification. **Cancer Cell**, v. 3, n. 2, p. 173-183,
24 Feb 2003. ISSN 1535-6108 (Print)
25 1535-6108.
26
- 27 ARMSTRONG, S. A. et al. MLL translocations specify a distinct gene expression
28 profile that distinguishes a unique leukemia. **Nat Genet**, v. 30, n. 1, p. 41-47, Jan 2002.
29 ISSN 1061-4036 (Print)
30 1061-4036.
31
- 32 AZIZIDOOST, S. et al. Bone marrow neoplastic niche in leukemia. **Hematology**, v.
33 19, n. 4, p. 232-238, Jun 2014. ISSN 1024-5332.
34
- 35 BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers.
36 **European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of**
37 **Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology**, v. 30 6, p.
38 593-601, 2004.
39
- 40 BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children:
41 a review. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 1, p. 138-145, Jan 2007. ISSN 0091-
42 6765 (Print)
43 0091-6765.
44
- 45 BLANK, U.; KARLSSON, S. TGF- β signaling in the control of hematopoietic stem cells.
46 **Blood**, v. 125, n. 23, p. 3542-3550, Jun 4 2015. ISSN 0006-4971.
47
- 48 BORIM, L. N. B. et al. Estado nutricional como fator prognóstico em crianças

- 1 portadoras de Leucemia Linfocítica Aguda. **Revista Brasileira de Hematologia e**
2 **Hemoterapia**, v. 22, 2000. ISSN 1516-8484.
3
- 4 BRANDALISE, S. R. et al. Shorter Maintenance Therapy in Childhood Acute
5 Lymphoblastic Leukemia: The Experience of the Prospective, Randomized Brazilian
6 GBTLI ALL-93 Protocol. **Front Pediatr**, v. 4, p. 110, 2016. ISSN 2296-2360 (Print)
7 2296-2360.
8
- 9 BRANTON, M. H.; KOPP, J. B. TGF-beta and fibrosis. **Microbes Infect**, v. 1, n. 15, p.
10 1349-1365, Dec 1999. ISSN 1286-4579 (Print)
11 1286-4579.
12
- 13 BRIX, N.; ROSTHØJ, S. Bone marrow involvement is not manifest in the early stages
14 of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Dan Med J**, v. 61, n. 8, p. A4883, Aug
15 2014. ISSN 2245-1919.
16
- 17 CAMBIEN, F. et al. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in
18 relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de
19 l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. **Hypertension**, v. 28, n. 5, p. 881-887, Nov
20 1996. ISSN 0194-911X (Print)
21 0194-911x.
22
- 23 CAMPANA, D.; PUI, C. H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia:
24 methodologic advances and clinical significance. **Blood**, v. 85, n. 6, p. 1416-1434, Mar
25 15 1995. ISSN 0006-4971 (Print)
26 0006-4971.
27
- 28 CAZÉ, M.; BUENO, D.; SANTOS, M. Estudo Referencial de um Protocolo
29 Quimioterápico para Leucemia Linfocítica Aguda Infantil. **Clinical and Biomedical**
30 **Research**, v. 30, 04/12 2010.
31
- 32 CHESSELLS, J. M. et al. Continuing (maintenance) therapy in lymphoblastic
33 leukaemia: lessons from MRC UKALL X. Medical Research Council Working Party in
34 Childhood Leukaemia. **Br J Haematol**, v. 98, n. 4, p. 945-951, Sep 1997. ISSN 0007-
35 1048 (Print)
36 0007-1048.
37
- 38 CIFTCI, R. et al. High serum transforming growth factor beta 1 (TGF-B1) level predicts
39 better survival in breast cancer. **Tumour Biol**, v. 35, n. 7, p. 6941-6948, Jul 2014. ISSN
40 1010-4283.
41
- 42 CRAIG, F. E.; FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic
43 neoplasms. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3941-3967, Apr 15 2008. ISSN 0006-4971 (Print)
44 0006-4971.
45
- 46 CRISTOFANI, L. et al. Recidivas extramedulares em leucemia linfocítica aguda:
47 impacto da quimioterapia e definição de um grupo particularmente favorável. 01/01
48 2004.
49
- 50 CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **N Engl J Med**, v. 358, n. 5, p. 502-511, Jan

- 1 31 2008. ISSN 0028-4793.
2
- 3 DAI, L. et al. A case-control study of childhood acute lymphoblastic leukaemia and
4 polymorphisms in the TGF- β and receptor genes. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 52,
5 n. 7, p. 819-823, 2009. ISSN 1545-5009. Disponível em: <
6 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pbc.21971> >.
7
- 8 EL-HEFNI, A. M.; ALAZZAZI, N. M. A.; TALEB, F. M. A. Prognostic Utility of
9 Transforming Growth Factor Beta-1 in Diffuse Large Cell Non-Hodgkin Lymphoma.
10 **Journal of hematology**, v. 4, p. 131-136, 2015.
11
- 12 FARHI, D. C.; ROSENTHAL, N. S. Acute lymphoblastic leukemia. **Clin Lab Med**, v.
13 20, n. 1, p. 17-28, vii, Mar 2000. ISSN 0272-2712 (Print)
14 0272-2712.
15
- 16 GALLEGOS-ARREOLA, M. P. et al. Pathophysiology of Acute Lymphoblastic
17 Leukemia. 2013.
18
- 19 GRAINGER, D. J. et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming
20 growth factor type beta1. **Hum Mol Genet**, v. 8, n. 1, p. 93-97, Jan 1999. ISSN 0964-
21 6906 (Print)
22 0964-6906.
23
- 24 GRAUX, C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic
25 relevance. **Transfus Apher Sci**, v. 44, n. 2, p. 183-189, Apr 2011. ISSN 1473-0502
26 (Print)
27 1473-0502.
28
- 29 GREAVES, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia.
30 **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 3, p. 193-203, 2006/03/01 2006. ISSN 1474-1768.
31 Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nrc1816> >.
32
- 33 GREAVES, M. F.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood
34 leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639-649, Sep 2003. ISSN 1474-175X (Print)
35 1474-175x.
36
- 37 GROTENDORST, G. R.; SMALE, G.; PENCEV, D. Production of transforming growth
38 factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. **J Cell Physiol**, v.
39 140, n. 2, p. 396-402, Aug 1989. ISSN 0021-9541 (Print)
40 0021-9541.
41
- 42 HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **J Pediatr (Rio J)**, v.
43 84, n. 4 Suppl, p. S52-57, Aug 2008. ISSN 0021-7557.
44
- 45 HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1,
46 p. 31-46, 2022. ISSN 2159-8274. Disponível em: < <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059> >. Acesso em: 12/26/2022.
47
48
- 49 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-
50 70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print)

- 1 0092-8674.
2
3 Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011.
4 ISSN 0092-8674.
5
6 HASHIBE, M. et al. Epidemiologic review of marijuana use and cancer risk. **Alcohol**,
7 v. 35, n. 3, p. 265-275, Apr 2005. ISSN 0741-8329 (Print)
8 0741-8329.
9
10 HUNGER, S. P. et al. Improved survival for children and adolescents with acute
11 lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology
12 group. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 14, p. 1663-1669, May 10 2012. ISSN 0732-183X (Print)
13 0732-183x.
14
15 IKEUTI, P. S.; BORIM, L. N. B.; LUPORINI, R. L. Dor óssea e sua relação na
16 apresentação inicial da leucemia linfóide aguda. **Revista Brasileira de Hematologia**
17 **e Hemoterapia**, v. 28, 2006. ISSN 1516-8484.
18
19 INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia.
20 **Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943-1955, Jun 1 2013. ISSN 0140-6736 (Print)
21 0140-6736.
22
23 INCA. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. SILVA, I. N. D. C. J. A. G.
24 D. Rio de Janeiro 2022.
25
26 INFANTE-RIVARD, C. et al. Risk of childhood leukemia associated with exposure to
27 pesticides and with gene polymorphisms. **Epidemiology**, v. 10, n. 5, p. 481-487, Sep
28 1999. ISSN 1044-3983 (Print)
29 1044-3983.
30
31 IVANOVIC, V. et al. Elevated plasma levels of TGF-beta 1 in patients with invasive
32 prostate cancer. **Nat Med**, v. 1, n. 4, p. 282-284, Apr 1995. ISSN 1078-8956 (Print)
33 1078-8956.
34
35 IVANOVIĆ, V. et al. Elevated plasma levels of transforming growth factor-β1 (TGF-
36 β1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression.
37 **European Journal of Cancer**, v. 39, n. 4, p. 454-461, 2003/03/01/ 2003. ISSN 0959-
38 8049. Disponível em: <
39 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804902005026> >.
40
41 JASMINE, H.; MARIE-HELENE, R.-G.; DANIEL, S. No evidence for association
42 between TGF-B1 promoter SNPs and the risk of childhood pre-B acute lymphoblastic
43 leukemia among French Canadians. **Haematologica**, v. 94, n. 7, p. 1034-1035, 07/01
44 2009. Disponível em: < <https://haematologica.org/article/view/5293> >. Acesso em:
45 2023/02/20.
46
47 JIN, M. W. et al. A review of risk factors for childhood leukemia. **Eur Rev Med**
48 **Pharmacol Sci**, v. 20, n. 18, p. 3760-3764, Sep 2016. ISSN 1128-3602.
49
50 JIN, Q. et al. Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming

- 1 growth factor β 1 and its receptors in familial and unselected breast cancers.
2 **International Journal of Cancer**, v. 112, n. 1, p. 94-99, 2004. ISSN 0020-7136.
3 Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.20370> >.
4
- 5 JUNKER, U. et al. Transforming growth factor beta 1 is significantly elevated in plasma
6 of patients suffering from renal cell carcinoma. **Cytokine**, v. 8, n. 10, p. 794-798, Oct
7 1996. ISSN 1043-4666 (Print)
8 1043-4666.
9
- 10 KANG, H. G. et al. Polymorphisms in TGF-beta1 gene and the risk of lung cancer.
11 **Lung Cancer**, v. 52, n. 1, p. 1-7, Apr 2006. ISSN 0169-5002 (Print)
12 0169-5002.
13
- 14 KAUSHANSKY, K. et al. **Williams Hematology, 9E**. McGraw-Hill Education, 2015.
15 ISBN 9780071833011. Disponível em: <
16 <https://books.google.com.br/books?id=0MneCgAAQBAJ> >.
17
- 18 KIKUCHI, K. et al. Genetic polymorphisms of transforming growth factor beta-1
19 promoter and primary biliary cirrhosis in Japanese patients. **Ann N Y Acad Sci**, v.
20 1110, p. 15-22, Sep 2007. ISSN 0077-8923 (Print)
21 0077-8923.
22
- 23 KIM, S. J.; LETTERIO, J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and
24 malignant hematopoiesis. **Leukemia**, v. 17, n. 9, p. 1731-1737, Sep 2003. ISSN 0887-
25 6924 (Print)
26 0887-6924.
27
- 28 KONG, F. M. et al. Elevated plasma transforming growth factor-beta 1 levels in breast
29 cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. **Ann Surg**, v. 222, n. 2,
30 p. 155-162, Aug 1995. ISSN 0003-4932 (Print)
31 0003-4932.
32
- 33 KONOPLEVA, M. Y.; JORDAN, C. T. Leukemia stem cells and microenvironment:
34 biology and therapeutic targeting. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 591-599, Feb 10 2011.
35 ISSN 0732-183X (Print)
36 0732-183x.
37
- 38 KUBICZKOVA, L. et al. TGF- β - an excellent servant but a bad master. **J Transl Med**,
39 v. 10, p. 183, Sep 3 2012. ISSN 1479-5876.
40
- 41 KUBISTOVA, Z.; MRAZEK, F.; PETREK, M. Polymorphisms of the immune response
42 genes: selected biological, methodical and medical aspects. **Biomed Pap Med Fac**
43 **Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 153, n. 2, p. 93-102, Jun 2009. ISSN 1213-
44 8118.
45
- 46 KYRTSONIS, M. C. et al. Serum transforming growth factor-beta 1 is related to the
47 degree of immunoparesis in patients with multiple myeloma. **Med Oncol**, v. 15, n. 2,
48 p. 124-128, Jul 1998. ISSN 1357-0560 (Print)
49 1357-0560.
50

- 1 LARSON, R. A.; ANASTASI, J. Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Presentation,
2 Diagnosis, and Classification. **Acute Leukemias**, 2020.
3
- 4 LIU, Y. et al. Transforming growth factor beta-1 C-509T polymorphism and cancer
5 risk: a meta-analysis of 55 case-control studies. **Asian Pacific journal of cancer
6 prevention : APJCP**, v. 13 9, p. 4683-4688, 2012.
7
- 8 LIU, Y.; ZHOU, W.; ZHONG, D. W. Meta-analyses of the associations between four
9 common TGF- β 1 genetic polymorphisms and risk of colorectal tumor. **Tumour Biol**, v.
10 33, n. 4, p. 1191-1199, Aug 2012. ISSN 1010-4283.
11
- 12 LOCATELLI, F. et al. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia.
13 **Blood**, v. 120, n. 14, p. 2807-2816, Oct 4 2012. ISSN 0006-4971.
14
- 15 LOGAN. C. A.; **Measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia:
16 How low is low enough?**, Best Practice & Research Clinical Haematology, Volume 35,
17 Issue 4,
18 2022,
19
- 20 LORENZI, T. F. et al. **Manual de Hematologia - Propedêutica e Clínica**. 2003.
21
- 22 LU, J. et al. Genetic polymorphisms of CYP1A1 and risk of leukemia: a meta-analysis.
23 **Onco Targets Ther**, v. 8, p. 2883-2902, 2015. ISSN 1178-6930 (Print)
24 1178-6930.
25
- 26 MA, J. et al. TGF- β 1 polymorphism 509 C>T is associated with an increased risk for
27 hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 2, p.
28 4461-4468, May 4 2015. ISSN 1676-5680.
29
- 30 MAEDA, H. et al. TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal
31 and tumor-bearing mice. **J Immunol**, v. 155, n. 10, p. 4926-4932, Nov 15 1995. ISSN
32 0022-1767 (Print)
33 0022-1767.
34
- 35 MANISHA, P. Leukemia: a review article. **International Journal of Advanced
36 Research in Pharmaceutical & Bio Sciences**, v. 1, p. 397+, 2012 July-September
37 // 2012. ISSN 22776222. Disponível em: <
38 <https://link.gale.com/apps/doc/A357968820/HRCA?u=anon~5a72dd42&sid=bookmark-HRCA&xid=f9ef7b62> >. Acesso em: 2023/2/20/.
40
- 41 MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. **Henry's Clinical Diagnosis and Management
42 by Laboratory Methods E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2011. ISBN
43 9781455726844. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=-97J-8Zh2hkC> >.
44
- 45
- 46 METAYER, C. et al. Tobacco smoke exposure and the risk of childhood acute
47 lymphoblastic and myeloid leukemias by cytogenetic subtype. **Cancer Epidemiol
48 Biomarkers Prev**, v. 22, n. 9, p. 1600-1611, Sep 2013. ISSN 1055-9965 (Print)
49 1055-9965.
50

- 1 NIU, W. et al. Association of TGF-B1 -509 C>T polymorphism with breast cancer:
2 evidence from a meta-analysis involving 23,579 subjects. **Breast Cancer Research**
3 **and Treatment**, v. 124, n. 1, p. 243-249, 2010/11/01 2010. ISSN 1573-7217.
4 Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0832-0> >.
5
- 6 ORFAO, A. et al. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic
7 syndromes. **Cytometry A**, v. 58, n. 1, p. 62-71, Mar 2004. ISSN 1552-4922 (Print)
8 1552-4922.
9
- 10 OUESLATI, S. et al. Association of TGF-B1 -509C/T polymorphism gene with clinical
11 variability in cystic fibrosis patients: A case-control study. **Pathologie Biologie**, v. 63,
12 n. 4, p. 175-178, 2015/09/01/ 2015. ISSN 0369-8114. Disponível em: <
13 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0369811415000619> >.
14
- 15 PAINE, S. K. et al. Association of vascular endothelial growth factor, transforming
16 growth factor beta, and interferon gamma gene polymorphisms with proliferative
17 diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. **Molecular vision**, v. 18, p. 2749-
18 2757, 2012 2012. ISSN 1090-0535.
19
- 20 PAPAGEORGIS, P.; STYLIANOPOULOS, T. Role of TGF β in regulation of the tumor
21 microenvironment and drug delivery (review). **Int J Oncol**, v. 46, n. 3, p. 933-943, Mar
22 2015. ISSN 1019-6439 (Print)
23 1019-6439.
24
- 25 PERERA, F. P. Environment and Cancer: Who Are Susceptible? **Science**, v. 278, n.
26 5340, p. 1068-1073, 1997.
27
- 28 PICKUP, M.; NOVITSKIY, S.; MOSES, H. L. The roles of TGF β in the tumour
29 microenvironment. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 11, p. 788-799, Nov 2013. ISSN 1474-
30 175X (Print)
31 1474-175x.
32
- 33 POLYCHRONAKIS, I. et al. Work-related leukemia: a systematic review. **J Occup**
34 **Med Toxicol**, v. 8, n. 1, p. 14, May 22 2013. ISSN 1745-6673 (Print)
35 1745-6673.
36
- 37 PUI, C. H.; CAMPANA, D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic
38 leukemia. **Leukemia**, v. 14, n. 5, p. 783-785, May 2000. ISSN 0887-6924 (Print)
39 0887-6924.
40
- 41 PUI, C. H. et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias:
42 an update. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 551-565, Feb 10 2011. ISSN 0732-183X (Print)
43 0732-183x.
44
- 45 PUI, C. H.; HOWARD, S. C. Current management and challenges of malignant disease
46 in the CNS in paediatric leukaemia. **Lancet Oncol**, v. 9, n. 3, p. 257-268, Mar 2008.
47 ISSN 1470-2045.
48
- 49 PUI, C. H.; RELLING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl**
50 **J Med**, v. 350, n. 15, p. 1535-1548, Apr 8 2004. ISSN 0028-4793.

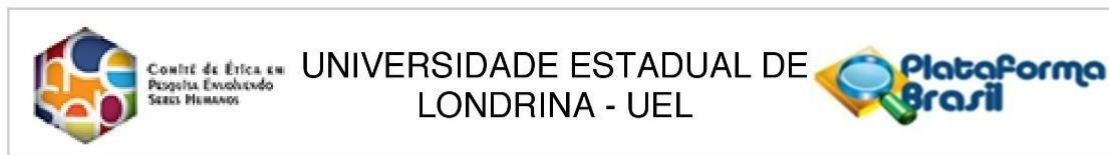
- 1
2 REIS, R. D. S. et al. Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. **Pediatr**
3 **Hematol Oncol**, v. 33, n. 2, p. 83-93, 2016/02/17 2016. ISSN 0888-0018. Disponível
4 em: < <https://doi.org/10.3109/08880018.2015.1130763> >.
5
- 6 RIX, U. et al. A target-disease network model of second-generation BCR-ABL inhibitor
7 action in Ph+ ALL. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77155, 2013. ISSN 1932-6203.
8
- 9 SCHIFFMAN, J. D. Applying molecular epidemiology in pediatric leukemia. **J Investig**
10 **Med**, v. 64, n. 2, p. 355-360, Feb 2016. ISSN 1081-5589.
11
- 12 SCHMIEGELOW, K. et al. Risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia
13 is related to RBC methotrexate and mercaptopurine metabolites during maintenance
14 chemotherapy. Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology. **J Clin Oncol**,
15 v. 13, n. 2, p. 345-351, Feb 1995. ISSN 0732-183X (Print)
16 0732-183x.
17
- 18 SHIRAI, Y. et al. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with
19 hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. **Cancer**, v. 73, n. 9,
20 p. 2275-2279, May 1 1994. ISSN 0008-543X (Print)
21 0008-543x.
22
- 23 SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in Cancer**
24 **Biology**, v. 18, n. 5, p. 349-355, 2008/10/01/ 2008. ISSN 1044-579X. Disponível em:
25 < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X08000230> >.
26
- 27 SILVERMAN, E. S. et al. Transforming Growth Factor- β 1 Promoter Polymorphism C-
28 509T Is Associated with Asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care**
29 **Medicine**, v. 169, n. 2, p. 214-219, 2004. Disponível em: <
30 <https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200307-973OC> >.
31
- 32 SINNREICH, O. et al. Plasma levels of transforming growth factor-1beta and alpha2-
33 macroglobulin before and after radical prostatectomy: association to
34 clinicopathological parameters. **Prostate**, v. 61, n. 3, p. 201-208, Nov 1 2004. ISSN
35 0270-4137 (Print)
36 0270-4137.
37
- 38 SOCIETY, A. C. Cancer Facts & Figures. 2021. Disponível em: <
39 [https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-](https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2021/cancer-facts-and-figures-2021.pdf)
40 [statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2021/cancer-facts-and-figures-2021.pdf](https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2021/cancer-facts-and-figures-2021.pdf) >.
41
- 42 SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence
43 and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, Feb 4
44 2021. ISSN 1542-4863 (Electronic)
45 0007-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33538338>
46 >.
47
- 48 SYED, V. TGF- β Signaling in Cancer. **J Cell Biochem**, v. 117, n. 6, p. 1279-1287, Jun
49 2016. ISSN 0730-2312.
50

- 1 SYRRIS, P. et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms and
2 coronary artery disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 95, n. 6, p. 659-667, Dec 1998. ISSN
3 0143-5221 (Print)
4 0143-5221.
5
- 6 SYUKRI, M. et al. The promoter region (G-800A and C-509T) polymorphisms of
7 transforming growth factor- β 1 gene among young women with recurrent urinary tract
8 infection. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 15, n. 2, p. 125-130,
9 2014/04/01/ 2014. ISSN 1110-8630. Disponível em: <
10 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110863014000275> >.
11
- 12 TAMIZIFAR, B. et al. Polymorphism of the promoter region of C-509T of transforming
13 growth factor-beta1 gene and ulcerative colitis. **Arch Iran Med**, v. 10, n. 2, p. 171-175,
14 Apr 2007. ISSN 1029-2977 (Print)
15 1029-2977.
16
- 17 TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive
18 review and 2017 update. **Blood Cancer J**, v. 7, n. 6, p. e577, Jun 30 2017. ISSN 2044-
19 5385.
20
- 21 URBA SKA-RYS, H.; WIERZBOWSKA, A.; ROBAK, T. Circulating angiogenic
22 cytokines in multiple myeloma and related disorders. **Eur Cytokine Netw**, v. 14, n. 1,
23 p. 40-51, Jan-Mar 2003. ISSN 1148-5493 (Print)
24 1148-5493.
25
- 26 VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO)
27 classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important
28 changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-951, Jul 30 2009. ISSN 0006-4971.
29
- 30 VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nat**
31 **Rev Immunol**, v. 8, n. 7, p. 523-532, Jul 2008. ISSN 1474-1733 (Print)
32 1474-1733.
33
- 34 WAN, P. Q. et al. TGF- β 1 polymorphisms and familial aggregation of liver cancer in
35 Guangxi, China. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 3, p. 8147-8160, Jul 27 2015. ISSN 1676-
36 5680.
37
- 38 WU, S. et al. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature**
39 **communications**, v. 9, n. 1, p. 3490-3490, 2018. ISSN 2041-1723. Disponível em: <
40 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30154431>
41 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113228/> >.
42
- 43 YAMAZAKI, S. et al. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell
44 hibernation in the bone marrow niche. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 1146-1158, Nov 23 2011.
45 ISSN 0092-8674.
46
- 47 ZHANG, T. et al. Association of IL10 -819C>T and -592C>A Polymorphisms with Non-
48 Hodgkin Lymphoma Susceptibility: Evidence from Published Studies. **Journal of**
49 **Cancer**, v. 6, p. 709 - 716, 2015.
50

- 1 ZHAO, J. et al. Clinical and prognostic significance of serum transforming growth
2 factor-beta1 levels in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. **Braz J Med**
3 **Biol Res**, v. 49, n. 8, Jul 25 2016. ISSN 0100-879X (Print)
4 0100-879x.
5
- 6 ZHAO, M. et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-
7 injury regeneration of hematopoietic stem cells. **Nat Med**, v. 20, n. 11, p. 1321-1326,
8 Nov 2014. ISSN 1078-8956.
9
10
11
12

1 **ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**

2



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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

Pesquisador: Maria Angelica Ehara Watanabe

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 6

CAAE: 73557317.0.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de PG em Patologia Experimental

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.638.782

Apresentação do Projeto:

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

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

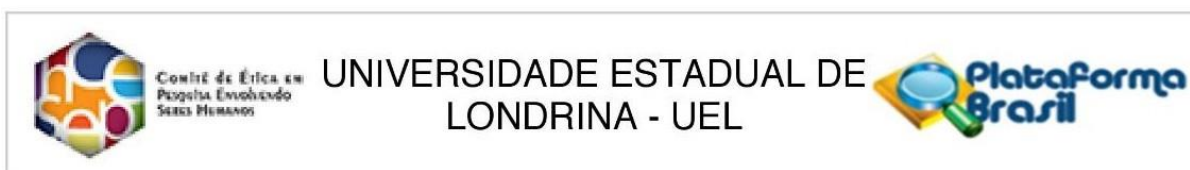
CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.638.782

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

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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

Objetivos Secundários:

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

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

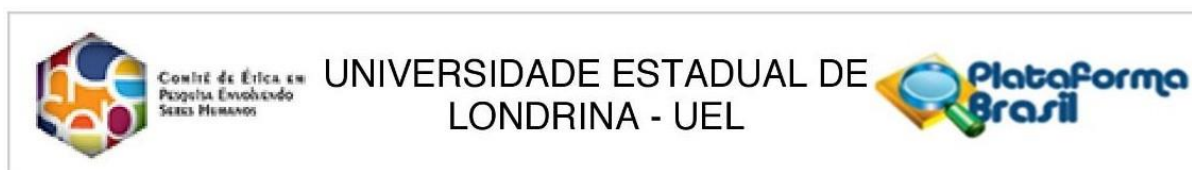
UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.638.782

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

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

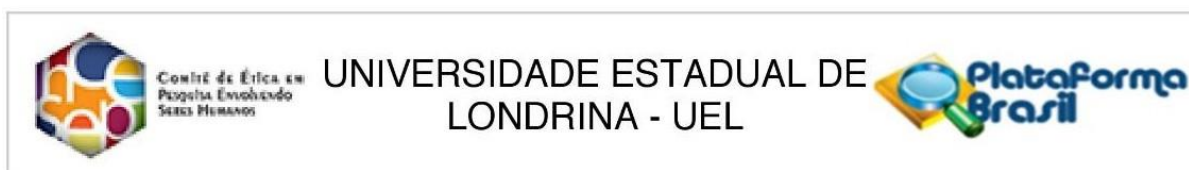
UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.638.782

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_111024_2_E4.pdf	25/04/2018 10:46:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_TCLE_controles_saudaveis_crianças.pdf	25/04/2018 10:45:28	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	3_TCLE_crianças.pdf	25/04/2018 10:44:43	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4_TCLE_pacientes_adultos.pdf	25/04/2018 10:43:35	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	1_TCLE_controles_saudaveis_adultos.pdf	25/04/2018 10:42:37	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	adendo_anamnese.doc	09/04/2018 14:04:18	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	anamnese.doc	09/04/2018 14:00:50	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	adendo_APOBEC.pdf	08/03/2018 22:07:23	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	Emenda.docx	29/11/2017 16:03:16	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	24/07/2017 16:01:36	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

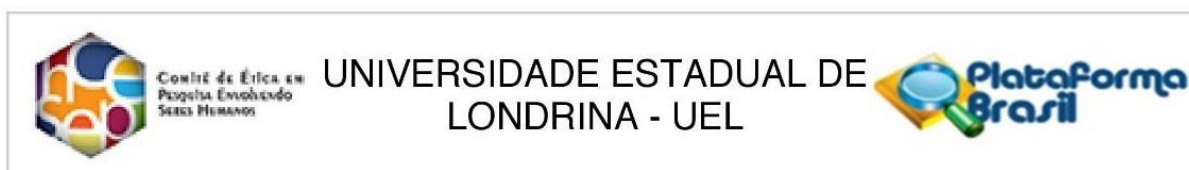
CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.638.782

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 07 de Maio de 2018

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

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br

1 **ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Universidade Estadual de Londrina

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

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

Procedimentos do Estudo:

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

Confidencialidade da Pesquisa

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

A amostra de sangue obtidos será utilizada para obtenção de DNA e RNA para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof^ª. Dr^ª Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia Cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel / Fax: (43) 3371-5629, 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 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): _____