

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MATHEUS LOUREIRO DA SILVA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *TOLL-LIKE RECEPTORS* NAS
LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Porto Alegre

DEZEMBRO/2015

MATHEUS LOUREIRO DA SILVA CRUZ

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TOLL-LIKE RECEPTORS NAS LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre

DEZEMBRO/2015

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente ao **Dr. Rafael e Dr^a. Caroline**, pela oportunidade de trabalhar no laboratório, pelos ensinamentos, pela paciência, pela capacidade de liderar esse grupo, do qual tenho muito orgulho de fazer parte. Na minha opinião, o principal momento em que nosso grupo teve que ultrapassar um obstáculo, a exemplo do derretimento do freezer, nossos líderes tiveram uma humildade e uma maestria para solucionar e resolver esse problema, ao mesmo tempo em que nos consolaram.

Aos colegas do **Laboratório de Câncer e Neurobiologia**, por me receber de braços abertos, por me apoiar e me criticar, quando necessário.

Aos meus **amigos** que viram minha trajetória acadêmica nesses 7 anos, aos trancos e barrancos, que me ajudaram a estudar, a manter o foco, que me ajudaram a enfrentar o luto pela morte do meu pai.

À minha ex-namorada **Amanda**, que também me apoiou em quase todas as batalhas acadêmicas e pessoais.

Aos meus **professores**, que sempre deram o máximo deles para ensinar e me conduzir a ser um profissional qualificado, crítico e confiante.

E por fim, a minha **família**: a minha **mãe**, minha **vó**, meus **tios**, meus **primos**, que sempre me apoiaram tanto financeiramente, quanto emocionalmente e nunca deixaram faltar nada para eu concluir esta etapa da minha vida.

Não posso deixar de mencionar meu **pai**, que até a sua morte fez de tudo para que eu conquistasse aquilo que ele não conseguiu, que sempre demonstrou seu apoio, que comemorou como se fosse um título do Grêmio quando eu passei no vestibular e por aí vai.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1 CÂNCER.....	11
1.2 TUMORES PEDIÁTRICOS.....	16
1.3 LEUCEMIAS.....	18
1.3.1 Incidência das Leucemias.....	19
1.3.2 Tipos de Leucemias.....	22
1.3.2.1 Leucemia Mieloide Aguda.....	22
1.3.2.2 Leucemia Mieloide Crônica.....	23
1.3.2.3 Leucemia Linfoide Crônica.....	24
1.4 Tratamento (leucemias em geral)	25
1.5 Resistência ao tratamento.....	26
2 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA.....	27
2.1 QUADRO CLÍNICO.....	28
2.2 DIAGNÓSTICO.....	29
2.2.1 Diagnóstico morfológico.....	29
2.2.2 Diagnóstico imunofenotípico.....	30
2.2.3 Diagnóstico citogenético.....	31
2.3 FATORES PROGNÓSTICOS.....	32
2.4 TRATAMENTO.....	34
2.5 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA.....	37
3 TOLL-LIKE RECEPTORS.....	39
3.1 Toll-Like Receptor 2.....	42
3.2 Toll-Like Receptor 3.....	43
3.3 Toll-Like Receptor 4.....	44
3.4 TLRs e o câncer.....	45
4 OBJETIVOS.....	47
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
5 TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	47
5.1 RESUMO.....	49

5.2 ABSTRACT.....	50
5.3 INTRODUÇÃO.....	51
5.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
5.5 RESULTADOS.....	58
5.6 DISCUSSÃO.....	59
5.7 CONCLUSÕES.....	61
5.8 PERSPECTIVAS.....	62
5.9 REFERÊNCIAS.....	63
6 BIBLIOGRAFIA ADICIONAL.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo: Anticorpos monoclonais específicos

D0: Corresponde ao momento em que foi dado o diagnóstico ao paciente.

D35: Corresponde ao momento final da terapia de indução

DAMPs: *Damage-associated molecular patterns*

DRM: Doença residual mínima

dsRNA: *Double-stranded RNA*

IFN: *Interferon*

IFN- γ : *Interferon gamma*

IKBKE: *Inhibitor of kappa B-cells polypeptide kinase epsilon*

IKK ϵ : ou TBK1

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IRAK: *Interleukin-1 receptor-associated kinases*

IRF-3: *Interferon regulatory factor-3*

LLA: Leucemia linfóide aguda

LLC: Leucemia linfóide crônica

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crônica

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

LTA: Ácido lipoteicóico

MAL/TIRAP: *MYD-88-adaptor-like protein/TIR domain-containing adaptor protein*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*

MM: Mieloma múltiplo

MYD88: *Myeloid differentiation factor 88*

NCI: *National Cancer Institute*

NEMO/IKBKE: *NF-kappa-B essential modulator/ inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma*

NF-κB: *Nuclear factor kappa B*

NK: *Células natural-killer*

OMS: *Organização Mundial da Saúde*

PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns*

Ph: *Cromossomo filadélfia t(9;22)*

SNC: *Sistema nervoso central*

SNP: *Polimorfismo de nucleotídeo único*

ssRNA: *Single stranded RNA*

TBK1: *TANK-binding kinase 1*

TCTH: *Transplante de células tronco hematopoiéticas*

TICAM-1: *Toll-like receptor adaptor molecule 1*

TIR: *Toll/Interleukin-1 receptor*

TLR1: *Toll-like receptor 1*

TLR2: *Toll-like receptor 2*

TLR3: *Toll-like receptor 3*

TLR4: *Toll-like receptor 4*

TLR5: *Toll-like receptor 5*

TLR6: *Toll-like receptor 6*

TLR7: *Toll-like receptor 7*

TLR8: *Toll-like receptor 8*

TLR9: *Toll-like receptor 9*

TLRs: *Toll-like receptors*

TNF-α: *Fator de necrose tumoral alfa*

TRAF2: *TNF receptor-associated factor 2*

TRAF3: *TNF receptor-associated factor 3*

TRAF6: *Receptor-associated factor 6*

TRAM: *TRIF-related adaptor molecule*

TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxas brutas de incidência estimadas para 2014 por sexo, segundo Estado e capital*.

Figura 2: Desenvolvimento de células sanguíneas a partir de uma célula-tronco.

Figura 3: Incidência de Leucemia em homens, com base em 100 mil habitantes.

Figura 4: Incidência de Leucemia em mulheres, com base em 100 mil habitantes.

Figura 5: Cromossomo Philadelphia (Ph). Translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22; t (9;22) (q34;q11).

Figura 6: Demonstração as vias de sinalização, juntamente com a cascata intracelular ativada pelo TLRs, com o recrutamento das moléculas adaptadoras e seus principais efeitos.

Figura 7: Sinalização do TLR3. A ligação do ligante de TLR3 (dsRNA) com o posterior recrutamento de moléculas adaptadoras que levam a ativação de fatores de transcrição que intensificam a codificação de citocinas pró-inflamatória.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Incidência de alguns tipos de neoplasias distribuídas pelos estados.

Tabela 2: Estimativas para o ano de 2014 da incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*

Tabela 3: Incidência de neoplasias em homens e mulheres, no Brasil

Tabela 4: Tratamentos mais comuns no combate a Leucemia Mieloide Aguda.

Tabela 5: Principais achados clínicos ao diagnóstico de LLA.

Tabela 6: Padrão de expressão antigênica nas leucemias linfoides agudas.

Tabela 7: Subdivisões da LLA e suas alterações cromossômica.

Tabela 8: Quimioterápicos administrados no tratamento de Leucemia Linfóide Aguda.

Tabela 9: Combinações Imunofenotípicas usadas no estudo de DRM na LLA.

Tabela 10: Toll-Like Receptors, principais ligantes, proteínas adaptadoras e resposta.

1 REVISÃO DA LITERATURA

Este tópico apresenta o conhecimento teórico utilizado como referência para os assuntos e estudos apresentados neste trabalho.

1.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças relacionadas que tem em comum o crescimento desordenado de células, que invadem outros tecidos e órgãos. Normalmente as células crescem, se multiplicam para formar novas células e quando estiverem muito danificadas entram em processo de apoptose para outras células novas ocuparem seu lugar. Entretanto quando o câncer se desenvolve este processo ordenado não acontece e as células passam a se dividirem rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de massas celulares ou de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo levando a formação de metástases (GLUNDE, 2011).

Existem inúmeros tipos de neoplasias que podem levar a formação de tumores sólidos ou de tumores não sólidos como as leucemias. A primeira estratificação dos tipos de tumores leva em consideração sua origem, isto é, a célula que levou a formação do tumor. Dessa forma os tumores são classificados em categorias: carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, leucemias, linfomas, mieloma múltiplo, melanoma, tumores de sistema nervoso central (SNC), tumores de células germinativas e tumores neuroendócrinos.

Além dessa divisão, os tumores podem ser divididos quanto sua capacidade de invasão tecidual em tumores benignos e malignos. Tumores benignos não tem capacidade de invadir e se espalhar para outros tecidos, podem ser de tamanho variável e quando são removidos em uma cirurgia geralmente não voltam a crescer. Por outro lado, tumores malignos são capazes de invadir e se espalhar para tecidos próximos ou podem migrar para tecidos mais distantes através da corrente sanguínea ou do tecido linfático e formar novos tumores, processo chamado de metástases. (ROGERS, 2007).

Células neoplásicas diferem das células normais em muitos aspectos que lhes permitem crescer fora de controle e se tornarem invasoras. Uma diferença importante é que essas células são menos especializadas do que as células normais o que implica em perda de função. Outra

característica é que células cancerosas podem criar um microambiente com vasos sanguíneos de onde elas obtêm sua nutrição e oxigenação, necessária para sua sobrevivência (TIZIANI, 2013).

Hoje sabe-se que o câncer é considerado uma doença genética, uma vez que ela é causada por alterações em genes que controlam especialmente o crescimento, a divisão celular e os processos de apoptose. Alterações genéticas que causam câncer podem ser herdadas, como também podem ocorrer durante a vida de uma pessoa a partir do resultado de erros que ocorrem quando as células se dividem ou por causa de danos ao DNA causados por certas exposições ambientais, tais como substâncias químicas proveniente do tabagismo e raios UV, por exemplo. As alterações genéticas que podem contribuir para a formação do câncer tendem a afetar três tipos principais de gene: proto-oncogenes, genes supressores tumorais e genes de reparação do DNA (VOGELSTEIN, 2013).

Oncogenes são genes cuja atividade normal promove proliferação celular. Mutações de ganho de função em células tumorais criam formas que são excessivas ou imprópriamente ativas. Um único alelo mutante pode afetar o comportamento de uma célula. As versões não mutadas são chamadas de proto-oncogenes (SANA, 2015).

Por outro lado, genes supressores tumorais são genes cujos produtos agem para limitar a proliferação celular normal. Versões mutantes em células cancerígenas perdem sua função. Alguns produtos destes genes previnem a progressão do ciclo celular inapropriado, outros agem induzindo células defeituosas à apoptose e outros mantem o genoma estável e a taxa de mutação baixa garantindo a replicação precisa, o reparo e a segregação do DNA das células. Ambos os alelos de um gene supressor tumoral precisam ser inativados para alterar o comportamento de uma célula (HUA, 2015).

O câncer tem um grande impacto tanto na sociedade brasileira, quanto na mundial, uma vez que ganha relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando, e, com isso, é necessário o conhecimento sobre a situação dessa doença para que assim possa permitir estabelecer prioridades e alocar recursos de forma direcionada para a modificação positiva desse cenário mundial (INCA, [2015]).

Em 2015 nos Estados Unidos da América é estimado em 1.658.300 o número de novos casos de câncer diagnosticados, bem como, aproximadamente 589.430 pessoas virão a óbito pela doença. A incidência de câncer é de 454,8 por 100.000 homens e mulheres por ano (com base em 2008-2012). O número de mortes por câncer é 171,2 por 100.000 homens e mulheres por ano (com base em 2008-2012). A mortalidade por câncer é maior entre homens do que em

mulheres (207,9 por 100.000 homens e 145,4 por 100.000 mulheres), além de ser maior em homens afro-americanos (261.5 por 100.000), (Com base em 2008-2012) - (NCI, 2015).

O número de pessoas vivendo além de um diagnóstico de câncer atingiu cerca de 14,5 milhões em 2014 e deverá aumentar para quase 19 milhões em 2024. Cerca de 39,6 por cento dos homens e mulheres serão diagnosticadas com câncer em algum momento durante suas vidas (com base em dados 2010-2012) - (NCI, 2015).

Em 2014, um número estimado de 15.780 crianças e adolescentes (idades entre 0 e 19 anos) foram diagnosticadas com câncer e 1.960 morreram da doença. Despesas para o tratamento do câncer nos Estados Unidos totalizaram quase US \$125 bilhões em 2010 e pode chegar a US \$156 bilhões em 2020 (NCI, 2015).

No Brasil, o perfil demográfico vem sofrendo mudanças, consequências de inúmeros fatores como o processo de urbanização populacional, industrialização e dos avanços da ciência e da tecnologia. Essas novas características se unem aos novos estilos de vida intenso que a sociedade se torna obrigada a se expor o que pode ser considerado como fatores de risco da sociedade urbana. A população brasileira envelheceu e trocou a ocorrência de doenças infectocontagiosas por doenças crônico-degenerativas. De forma que atualmente é o novo centro de atenção dos problemas de saúde da população brasileira (INCA, [2015]).

No Brasil, a estimativa do ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 395 mil casos novos de câncer, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para sexo feminino. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide. É incontestável que o câncer é hoje, no Brasil, um problema de saúde pública (INCA, [2015]).

Tabela 1: Incidência de alguns tipos de neoplasias distribuídas pelos estados.

Estados	Leucemias	Corpo do Útero	Pele Melanoma	Outras Localizações	Subtotal	Pele não melanoma	Todas as Neoplasias
Acre	20	**	**	150	630	80	710
Amapá	20	**	**	100	560	100	660
Amazonas	110	50	30	680	3.860	970	4.830
Pará	250	70	40	1.190	6.650	1.980	8.630
Rondônia	50	20	20	370	1.710	650	2.360
Roraima	20	**	20	90	550	120	670
Tocantins	60	**	20	270	1.730	430	2.160
Alagoas	110	80	20	680	3.250	1.100	4.350
Bahia	460	270	170	3.350	18.130	5.280	23.410
Ceará	390	210	180	2.730	14.540	5.540	20.080
Maranhão	200	70	50	1.320	5.740	1.380	7.120
Paraíba	180	80	60	1.170	5.550	2.070	7.620
Pernambuco	380	290	150	3.070	15.460	4.610	20.070
Piauí	140	50	50	810	4.120	1.440	5.560
Rio Grande do Norte	160	60	50	1.080	5.040	2.020	7.060
Sergipe	60	30	40	560	2.930	860	3.790
Distrito Federal	120	130	90	950	5.280	2.470	7.750
Goiás	220	130	130	2.000	10.510	6.890	17.400
Mato Grosso	100	50	60	890	4.770	3.400	8.170
Mato Grosso do Sul	110	80	70	920	5.380	2.740	8.120
Espírito Santo	160	80	120	1.180	7.690	4.630	12.320
Minas Gerais	910	420	430	7.060	38.200	23.330	61.530
Rio de Janeiro	870	880	430	7.870	46.360	27.320	73.680
São Paulo	2.210	1.900	1.840	17.590	104.470	47.730	152.200
Paraná	740	330	560	5.550	28.380	11.630	40.010
Rio Grande do Sul	910	410	800	8.300	37.910	13.500	51.410
Santa Catarina	410	170	440	2.940	15.050	9.860	24.910
Brasil	9.370	5.900	5.890	72.870	394.450	182.130	576.580

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

** Menor que 15 casos.

Fonte: INCA, [2015].

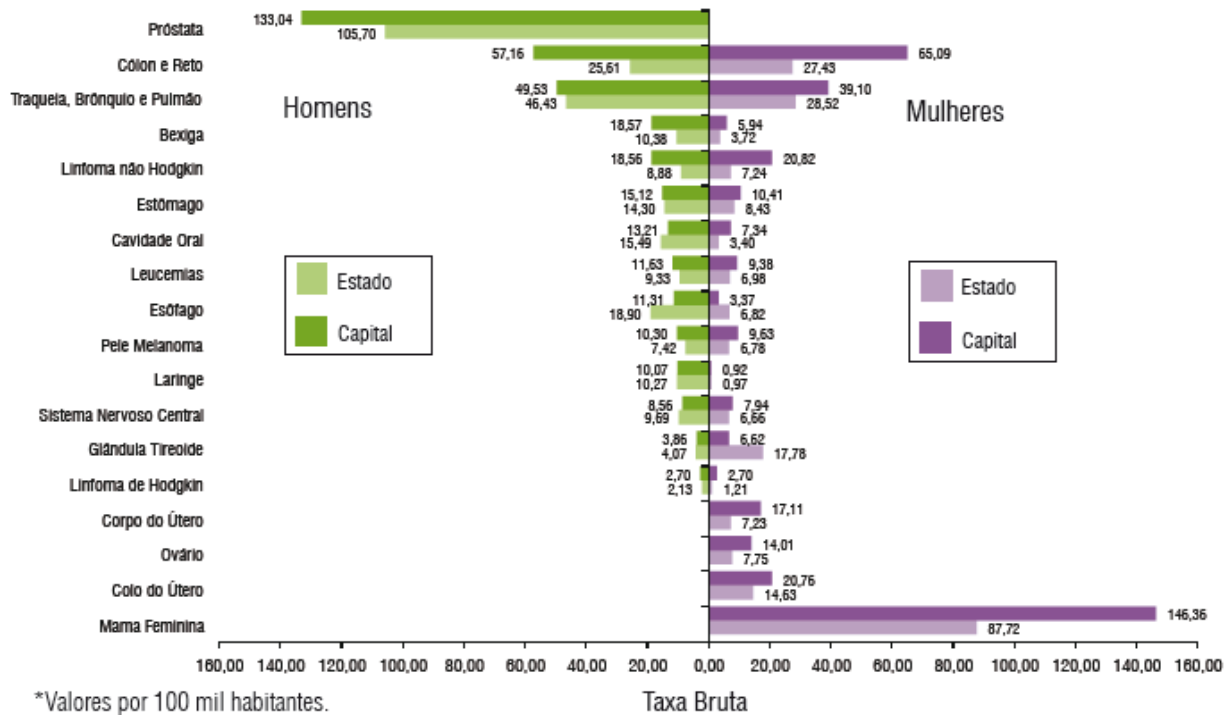
Tabela 2: Estimativas para o ano de 2014 da incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capital		Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	5.740	105,70	910	133,04	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	5.030	87,72	1.150	146,36
Colo do Útero	-	-	-	-	840	14,63	160	20,76
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.520	46,43	340	49,53	1.630	28,52	310	39,10
Cólon e Reto	1.390	25,61	390	57,16	1.570	27,43	510	65,09
Estômago	780	14,30	110	15,12	480	8,43	80	10,41
Cavidade Oral	840	15,49	90	13,21	190	3,40	60	7,34
Laringe	560	10,27	70	10,07	60	0,97	**	0,92
Bexiga	560	10,38	130	18,57	210	3,72	50	5,94
Esôfago	1.030	18,90	80	11,31	390	6,82	30	3,37
Ovário	-	-	-	-	440	7,75	110	14,01
Linfoma de Hodgkin	120	2,13	20	2,70	70	1,21	**	2,70
Linfoma não Hodgkin	480	8,88	130	18,56	410	7,24	160	20,82
Glândula Tireoide	220	4,07	30	3,86	1.020	17,78	50	6,62
Sistema Nervoso Central	530	9,69	60	8,56	380	6,66	60	7,94
Leucemias	510	9,33	80	11,63	400	6,98	70	9,38
Corpo do Útero	-	-	-	-	410	7,23	130	17,11
Pele Melanoma	410	7,42	70	10,30	390	6,78	80	9,63
Outras Localizações	4.660	85,76	710	103,98	3.640	63,57	590	72,89
Subtotal	20.350	374,41	3.220	471,66	17.560	306,37	3.600	456,29
Pele não Melanoma	8.670	159,59	350	50,65	4.830	84,26	540	69,09
Todas as Neoplasias	29.020	533,92	3.570	522,92	22.390	390,64	4.140	524,73

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10. / ** Menores que 15 casos.

Fonte: INCA, [2015].

Figura 1: Taxas brutas de incidência estimadas para 2014 por sexo, segundo Estado e capital*.



Fonte: INCA, [2015].

1.2 TUMORES PEDIÁTRICOS

Atualmente, a ocorrência de câncer em crianças e em adolescentes é rara, cerca de 0,5 a 3% de todas neoplasias da população em geral, embora a incidência geral em câncer infantil, incluindo LLA tem aumentado gradualmente desde 1975 (SMITH, 2014). Apresenta características histopatológicas e biológicas diferentes das neoplasias malignas que acometem adultos. Os tumores infantis crescem rapidamente e são mais invasivos do que as neoplasias adultas, entretanto tendem a responder melhor aos tratamentos e são considerados de bom prognóstico (HOWLADER, 2013).

Por isso, o câncer infanto-juvenil deve ser estudado separadamente daqueles que acometem os adultos, principalmente no que diz respeito ao comportamento clínico. Desse modo, as classificações utilizadas para os tumores pediátricos são diferentes daquelas utilizadas para os tumores nos adultos, sendo a morfologia a principal característica observada. (D'ONOFRIO, 2014).

Existe uma variação na proporção dos vários tipos de câncer infanto-juvenil nas populações. Em alguns países em desenvolvimento, onde a população de crianças chega a 50%, a proporção do câncer infantil representa de 3% a 10% do total de neoplasias. Já nos países desenvolvidos, essa proporção diminui, chegando a cerca de 1% (MURPHY, 2013).

A mortalidade também possui padrões diferentes. Enquanto nos países desenvolvidos o óbito por neoplasia é considerado a segunda causa de morte na infância, correspondendo a cerca de 4% a 5% (crianças de 1 a 14 anos), em países em desenvolvimento, essa proporção é bem menor, cerca de 1%, porque as mortes por doenças infecciosas são as principais causas de óbito (INCA, [2014]).

O tratamento dos pacientes infanto-juvenis deve ser realizado em centros médicos, os quais devem disponibilizar de um suporte material tecnológico e também de uma equipe multidisciplinar especializada no tratamento onco-pediátrico. Essa característica multidisciplinar é importante pela incorporação de abordagens específicas implementadas por cada profissional da área de saúde tais como médicos oncologistas pediátricos, fisioterapeutas, psicólogos, enfermeiros, biomédicos, biólogos, farmacêuticos, entre outros profissionais que auxiliam não somente o paciente como também sua família. Essa forma de acompanhamento assegura que o paciente receba o melhor tratamento disponível visando sua recuperação e melhora da qualidade de vida (CORRIGAN, 2004; SMITH, 2014).

No Brasil, em 2011, ocorreram 2.812 óbitos por câncer em crianças e adolescentes (de 0 a 19 anos), ocupando a segunda posição (7%) de óbitos de nessa faixa etária em 2011, perdendo somente para óbitos por causas externas, configurando-se como a doença que mais mata (INCA, [2014]).

O tipo de câncer pediátrico mais comum na maioria das populações é a leucemia (cerca de 25% a 35%). Os Linfomas, em países em desenvolvimento, são o segundo tipo mais comum. (INCA,2014). Os tumores de sistema nervoso ocorrem principalmente em crianças menores de 15 anos, com um pico na idade de 10 anos. Estima-se que cerca de 8% a 15% das neoplasias pediátricas sejam representadas por esse grupo, sendo o tumor sólido mais frequente em pacientes pediátricos (SMITH, 2014). Grandes avanços têm sido alcançados na sobrevivência de crianças e adolescentes com câncer. Entre 1975 e 2010 a mortalidade decorrente do câncer infantil diminuiu por mais de 50% (SMITH, 2014; HOWLADER, 2013). As taxas de sobrevivência variam de acordo com o diagnóstico do câncer e frequentemente por características demográficas, como idade, sexo e raça, assim como características do próprio tumor, como localização e extensão da doença, morfologia e alterações genéticas (ROBISON, 2011).

Para LLA a taxa de sobrevivência de 5 anos aumentou nesse mesmo tempo de 60% para aproximadamente 90% para crianças com menos de 15 anos e de 28% para mais de 75% para adolescentes entre 15 e 19 anos de idade (SMITH, 2014; HUNGER, 2012). Apesar dos tratamentos atuais terem alta efetividade existe a possibilidade do desenvolvimento de resistência à quimioterapia, além dos efeitos colaterais tardios consequentes da terapia que causam déficit de crescimento, distúrbios relacionados à insuficiência cardíaca e danos neuro-cognitivos (CORRIGAN, 2004). Tendo em vista isto, é necessário o desenvolvimento de novas terapias com ação mais específica sobre alvos moleculares que levem a um aumento da taxa de cura e redução dos efeitos colaterais (HOWLADER, 2013).

Devido ao grande potencial das doenças malignas infanto-juvenis, elas requerem um longo acompanhamento, pois os efeitos tardios e consequentes da terapia anti-neoplásica podem persistir por muitos anos depois do final do tratamento (GAYNON, 2010).

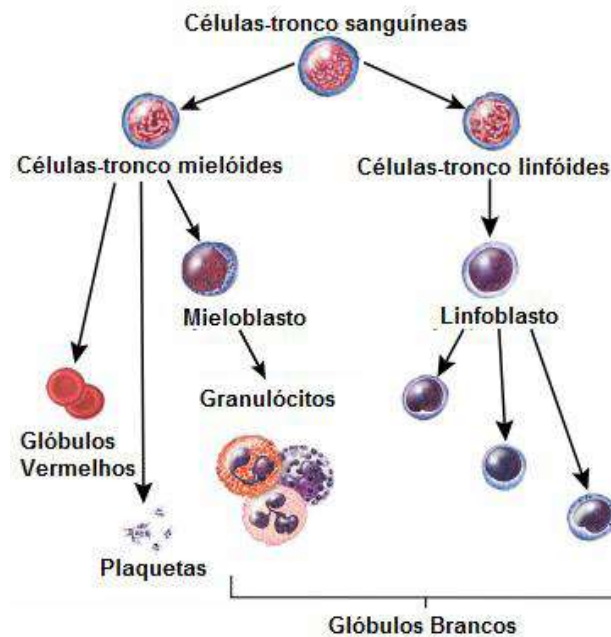
1.3 LEUCEMIAS

A leucemia corresponde a um conjunto de neoplasias malignas que afetam os leucócitos (glóbulos brancos) sendo sua origem, na maioria dos casos, desconhecida, tendo como principal característica o acúmulo de células neoplásicas imaturas na medula óssea e no sangue. A doença é hoje reconhecida por ser muito heterogênea (ILYAS, 2015), que consiste em vários fenótipos clínicos. As leucemias podem ser do tipo crônico, caracterizada pelo aumento excessivo no número de células maduras anormais da série branca do sangue, levando meses ou até anos para progredir, ou agudo que, em geral, caracteriza-se por um aumento rápido no número de células imaturas, o que faz com que a medula óssea seja incapaz de reproduzir células sanguíneas saudáveis. A outra subdivisão refere-se à sua célula de origem, que pode ser do tipo mieloide ou linfoide (HOFFBRAND e MOSS, 2013). As originárias dos linfoblastos resultam em uma doença denominada leucemia linfoide, enquanto as originárias das células granulocíticas e monocíticas são denominadas leucemias mieloides (HOFFBRAND e MOSS, 2013).

Para o entendimento da origem desta neoplasia é necessário o conhecimento da formação normal do sangue. A medula óssea é um tecido esponjoso que preenche as cavidades dentro dos ossos. Todas as células sanguíneas são produzidas na medula óssea. O processo pelo qual as células sanguíneas são formadas é chamado de hematopoiese. As células-tronco encontradas na medula óssea são responsáveis pela diferenciação em glóbulos vermelhos - responsáveis pelo transporte de oxigênio pelo corpo, plaquetas – responsáveis pela formação

de coágulos sanguíneos e glóbulos brancos – fortes atuantes no combate às infecções (NCI, 2013). A figura 2 mostra as duas vias de diferenciação das células tronco: a via de células mielóides e a via de células linfóides. A via mielóide conduz os glóbulos vermelhos, plaquetas e granulócitos, enquanto a via linfóide conduz os diferentes tipos de glóbulos brancos do sangue.

Figura 2: Desenvolvimento de células sanguíneas a partir de uma célula-tronco.



Fonte: Adaptado de NCI, 2013.

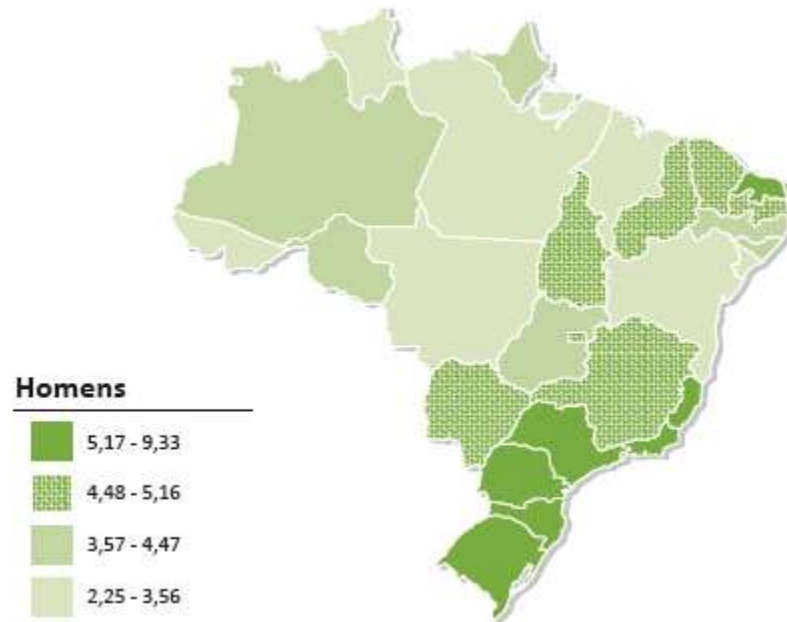
As células neoplásicas dividem-se rapidamente e crescem de forma desordenada, espalhando-se através da medula, corrente sanguínea e demais sistemas e tecidos, processo denominado de metástase. Diferentemente de células sanguíneas normais, as células leucêmicas não morrem quando danificadas ou velhas e passam a comprometer os pacientes tornando mais difícil a oxigenação, o combate às infecções e o controle das hemorragias (INCA, [2015]).

1.3.1 Incidência das Leucemias

Segundo levantamentos do INCA no Brasil, no ano de 2014, estimou-se 5050 casos novos de leucemia em homens e 4320 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,20 novos casos para cada 100 mil homens e 4,24 para cada 100 mil mulheres. Os estados com maior incidência de leucemias é São Paulo, seguido por Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Tabela 1), sendo a décima neoplasia mais frequente em homens e a oitava em mulheres.

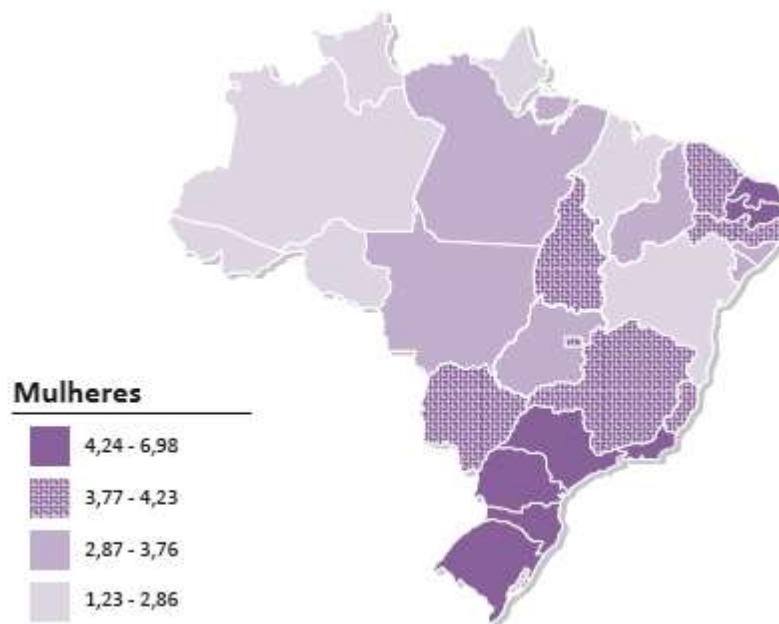
As figuras 3 e 4 mostram, de forma ilustrada, a distribuição de casos de leucemias no Brasil em homens e mulheres, respectivamente.

Figura 3: Incidência de Leucemia em homens, com base em 100 mil habitantes.



Fonte: INCA, [2015].

Figura 4: Incidência de Leucemia em mulheres, com base em 100 mil habitantes.



Fonte: INCA, [2015].

As leucemias estão entre os doze tipos mais frequentes de neoplasias em homens e mulheres (Tabela 2), sendo a leucemia linfóide aguda a neoplasia mais comum em crianças e adolescentes de 0 a 16 anos (INCA, [2015]).

Tabela 3: Incidência de neoplasias em homens e mulheres, no Brasil

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos	%	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%	Colon e Reto	17.530	6,4%
Colon e Reto	15.070	5,0%	Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%	Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%	Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%	Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%	Leucemias	4.320	1,6%

Fonte: INCA, [2015].

No mundo foram estimados cerca de 350 mil novos casos e 265 mil óbitos por leucemia no ano de 2012. (SILVA, 2015.). A leucemia linfóide aguda é o tipo de câncer mais comum na infância. Nas últimas décadas, houve uma considerável progressão no tratamento das leucemias. Em virtude das diferenças no acesso ao tratamento, observa-se uma considerável diferença entre populações com relação à sobrevida. Entre a população masculina dos Estados Unidos e da Europa Ocidental, a sobrevida em cinco anos é de 43%, enquanto, para o Japão, observa-se uma sobrevida de 25%; na América do Sul, 24%; na Índia, 19%; na Tailândia, 15%; e na África subsaariana, 14%. Em áreas com acesso a tratamentos, a sobrevida relativa em cinco anos, em crianças, alcança 80% (SCHMIEGELOW, 2010).

O principal tratamento para a leucemia é a quimioterapia, seguida de transplantes, radioterapia e imunoterapia (SANTOS, 2012). Estudos recentes indicam que cerca de 20% dos pacientes tratados apresentam resistência a algum medicamento administrado para tratamento da doença. Segundo Millani (2013) o grande desafio para a eficiência dos tratamentos atuais é lidar com a resistência intrínseca e adquirida, resultando em recidivas e períodos longos de tratamento. O ideal seria o desenvolvimento de tratamentos específicos e devidamente controlados para cada paciente em cada estágio da doença (STEPHEN, 2015).

1.3.2 Tipos de Leucemias

Este trabalho apresentará de forma simplificada as características dos diferentes tipos de leucemias sendo elas LMA, LMC e LCC. Entretanto apresentará de maneira mais profunda sobre a leucemia linfóide aguda (LLA).

1.3.2.1 Leucemia Mieloide Aguda

A leucemia mieloide aguda (LMA) é o tipo de leucemia aguda mais comum em adultos, representando 80% dos casos. Pacientes geralmente apresentam sintomas relacionados a citopenias. O diagnóstico, em geral, é baseado na presença de 20% de blastos em relação à população total de células em uma contagem de 500 células no aspirado de medula óssea. A presença de mutações características como t(8;21) ou inv(16) é diagnosticada em LMA independente da contagem de blastos (BEN-AMI, 2013).

Nas leucemias deste tipo, a célula que sofre a transformação neoplásica é o mieloblasto, tal célula é precursora dos glóbulos brancos imaturos que a partir de uma mutação genética impede a posterior diferenciação, mantendo-se permanentemente no seu estado imaturo. Essa mutação ocorre de maneira espontânea, no entanto somente ela não leva a transformação maligna, sendo necessária uma outra mutação que leve a uma descontrolada proliferação celular, resultando no excesso de células imaturas na medula óssea (BEZERRA, 2013).

Atualmente a classificação da LMA depende de características da fase em que a diferenciação celular foi interrompida, através disso médicos norte-americanos, franceses e ingleses criaram o sistema FAB (The French-American-British *classification system*) dividiu a LMA em 8 subtipos, de M0 a M7, com base no tipo de célula que originou a leucemia e também no grau de maturidade celular. Esta análise é realizada a partir do aspecto das células malignas visualizadas na microscopia óptica e também com o uso de recursos da citogenética para caracterizar as anomalias cromossômicas presentes (MORAES, 2009).

Por outro lado, uma classificação realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) preocupa-se com o prognóstico, uma vez que é produzida informações mais precisas, quando comparado com a classificação anterior (PAES, 2001). Esta classificação é estabelecida pelo exame do comprometimento de mais de 20% do sangue e/ou medula óssea por mieloblasto (INCA, [2015]).

Tabela 4: Tratamentos mais comuns no combate a Leucemia Mieloide Aguda.

Fase de Indução (28 semana)	Fase de Intensificação (45 semanas)	Fase de Manutenção (52 semanas)
Prednisona	Citarabina	Tioguanina
Tioguanina	Etoposídeo	Citarabina
Vincristina	Vincristina	Irradiação Craniana
Adriamicina	Tioguanina	
Citarabina		
Etoposídeo		
Idarrubicina		

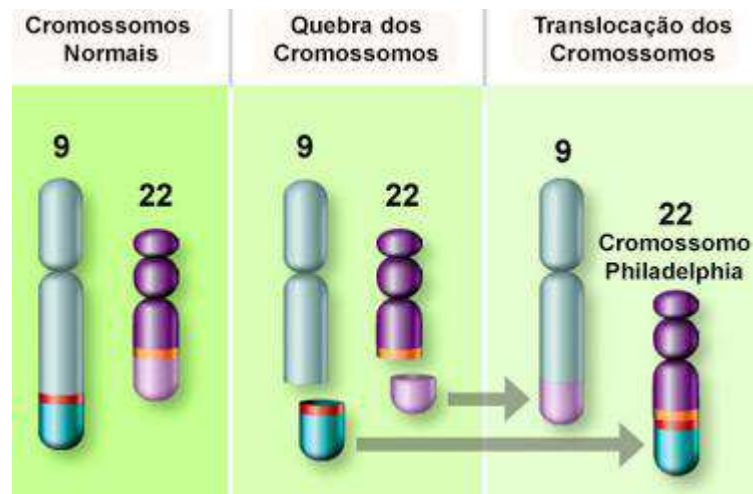
Fonte: SILVA, 2015.

1.3.2.2 Leucemia Mieloide Crônica

A leucemias mieloide crônica (LMC) corresponde a aproximadamente a 15% de todas as leucemias que acometem adultos, podendo ocorrer inclusive em crianças. Caracterizada como uma doença mieloproliferativa clonal resultante da transformação neoplásica da célula progenitora hematopoética que se caracteriza por acentuada hiperplasia mieloide. Uma característica importante é dada pela presença da translocação balanceada entre os braços longos do cromossomo 9 e 22, $t(9;22)(q34;q11)$, denominado cromossomo Filadélfia (cromossomo Ph) (MELO, 2003). Como resultado deste processo ocorre à fusão de dois genes, BCR (*breakpoint cluster region*) e ABL (*abelson murine leukemia viral oncogene homolog*) dos cromossomos 22 e 9 respectivamente.

O diagnóstico é realizado com exames clínicos e laboratoriais. Atualmente se faz a avaliação da presença do cromossomo Filadélfia (Ph) por cariótipo por banda G no aspirado de medula, a quantificação do transcrito BCR-ABL por PCR utilizando a escala internacional e/ou realização de FISH. O cariótipo pode também detectar alterações citogenéticas adicionais ao diagnóstico, as quais podem apresentar relevância prognóstica. Citometria de fluxo deve ser utilizada para melhor determinação da medula óssea (MO) em apresentações de fase acelerada (FA) ou crise blástica (CB) (DA ANUNCIACÃO, 2008).

Figura 5: Cromossomo Filadélfia (Ph). Translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22; t (9;22) (q34;q11).



Fonte: Adaptada de Abrale, 2015.

O tratamento contra LMC é baseado na contenção da produção da proteína BCR-ABL pelo oncogene de mesmo nome. Dentre as drogas com esta finalidade (inibidor de tirosina-quinase), imatinibe, dasatinibe e nilotinibe são bastante utilizadas. A hidroxiureia também é bastante utilizada no tratamento combinado a um dos inibidores de tirosina-quinase para auxiliar a conter os altos valores de linfoblastos no sangue (HEHLMANN, 2007).

1.3.2.3 Leucemia Linfóide Crônica

A leucemia linfóide crônica (LLC) é uma doença proliferativa clonal que em mais de 90% dos casos apresenta imunofenótipo B maduro (LLC-B), marcada pelo acúmulo progressivo de linfócitos maduros, mas imunologicamente incompetentes em linfonodos, fígado, baço e medula óssea. Essa característica morfológica da célula neoplásica confere uma evolução muito lenta da doença. (ABRALE, 2015). Na maioria dos casos de LLC encontram-se alterações cromossômicas, sendo as mais comuns às deleções nos cromossomos 13, 11 e/ou 17 e a trissomia no cromossomo 12. Embora as alterações cromossômicas estão relacionadas ao surgimento tumoral ainda não se sabe quais são os genes que estão envolvidos e como eles induzem este tipo de leucemia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

O tratamento quimioterápico inicial para LLC tem como objetivo principal colocar a leucemia em remissão e para este primeiro estágio a combinação de fludarabina, ciclofosfamida e rituximab são os mais indicados. A clorambucila é outro quimioterápico bastante indicado

para casos menos invasivos ou em estágio final de tratamento. Seu uso é indicado fora do ambiente hospitalar e com duração de, em média, um ano. Em alguns casos o tratamento com clorambucila não se mostra eficaz sendo necessário o emprego de um novo protocolo quimioterápico que envolve a combinação de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisolona (CANCER RESEARCH, [2015]).

1.4 Tratamento (leucemias em geral)

A quimioterapia é o principal tratamento dos pacientes com leucemia. A dose, tipos de medicamentos e a duração das aplicações variam de acordo com a idade, sexo, estágio da doença, origem das células malignas e outros fatores específicos das condições de cada paciente (ABRALE, 2015). O objetivo da quimioterapia é eliminar as células leucêmicas utilizando compostos químicos combinados ou isolados. O uso de drogas isoladas demonstrou ser ineficaz em induzir respostas significativas, na maioria dos tumores, sendo atualmente de uso muito restrito. A poliquimioterapia faz uso de diferentes combinações de quimioterápicos, de eficácia comprovada e tem como objetivo atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular através da ação sinérgica das drogas e promover maior resposta por dose administrada, além de diminuir o desenvolvimento de resistência (INCA, [2015]).

A maioria dos medicamentos citostáticos usados na quimioterapia tem como alvo preferencial as células que se dividem mais rapidamente e atingem altas taxas proliferativas, características de células tumorais, acarretando maiores danos a essas células do que às dos tecidos normais. Não sendo letais às células neoplásicas de modo seletivo estes medicamentos podem atingir as demais células, ainda que de maneira mais branda (SANTOS, 2012).

Segundo o NCI a quimioterapia pode ser classificada em:

- Curativa: quando é usada com o objetivo de se conseguir o controle completo do tumor, como nos casos de doença de Hodgkin, leucemias agudas, carcinomas de testículo e outros tumores.
- Adjuvante: quando se segue à cirurgia curativa, tendo o objetivo de esterilizar células residuais locais ou circulantes, diminuindo a incidência de metástases à distância.
- Neoadjuvante: quando indicada para se obter a redução parcial do tumor, visando a permitir uma complementação terapêutica com a cirurgia e/ou radioterapia.
- Paliativa: usada com a finalidade de melhorar a qualidade da sobrevivência do paciente.

A quimioterapia é administrada como uma combinação de quimioterápicos que agem associados e de formas diferentes a fim de destruir as células leucêmicas do organismo. O tratamento é realizado em forma de ciclos, dando um período de até 15 dias para restabelecimento do indivíduo (HAMERSCHLAK, 2012).

Os medicamentos podem ser administrados na forma de comprimidos, soluções injetáveis (via venosa, muscular, subcutânea e intra-tecal) para prevenir que as células leucêmicas se espalhem além da medula óssea (INCA, [2001]).

1.5 Resistência ao tratamento

O fato de os quimioterápicos não apresentarem tropismo exclusivo para as células tumorais significa que seja possível que algumas estruturas normais que se renovam constantemente, como a medula óssea, os pelos e a mucosa do tubo digestivo, também sejam atingidas pela ação dessa classe de fármaco. No entanto, como as células normais apresentam um tempo de recuperação conhecido, ao contrário das células tumorais, é possível que a quimioterapia seja aplicada repetidamente, desde que seja respeitado o intervalo de tempo necessário para a recuperação da medula óssea e da mucosa do tubo digestivo, o que justifica o uso da quimioterapia em ciclos (INCA, [2015]). O uso de diferentes drogas associadas, visando a melhoria da resposta ao tratamento também se mostra positiva e vem obtendo sucesso já que atingem as células em diferentes estágios do ciclo celular, além de ser um mecanismo que reduz a resistência ao quimioterápico.

Mesmo com todos os avanços da farmacoterapia, a multirresistência atinge um número significativo de pacientes que por não apresentarem evolução no quadro clínico mesmo com o uso dos agentes terapêuticos, ficam numa situação ainda mais vulnerável (MILANI, 2013). As células podem apresentar uma resistência inerente ou adquirida e esta resistência pode existir para qualquer tipo de fármaco, sendo desencadeada por vários mecanismos que podem atuar individual ou sinergicamente (SANTOS, 2012).

A forma de administração, distribuição, metabolização e excreção dos quimioterápicos, juntamente com as características da membrana celular caracterizam as principais barreiras para que a ação seja corretamente direcionada completando o tratamento de maneira eficaz e eficiente (SANTOS, 2012).

Além dos fatores moleculares o microambiente está envolvido na resposta do tumor às terapias aplicadas e a processos metastáticos. Uma vascularização anormal, bem como uma pressão elevada do fluido intersticial, pode impedir a entrada de macromoléculas na célula tumoral. Os tumores podem ter regiões onde os metabólitos e o oxigênio não conseguem penetrar alterando o pH do meio e inativando alguns quimioterápicos. Deste modo, entende-se que este microambiente pode desenvolver ou desencadear a multirresistência (GILLET, 2010).

2 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma doença clonal do tecido hematopoiético caracterizada pela transformação maligna de células precursoras linfóides (células B ou T) na medula óssea. Essa transformação surge a partir de mutação genética espontânea que leva a proliferação desregulada e expansão clonal da célula anormal resultante (MEYER, 2013.).

A LLA é o tipo mais comum de neoplasia infantil chegando a um terço de todas as neoplasias malignas da criança, seguida em ordem de frequência pelos tumores de sistema nervoso central (SNC) e linfomas (GAYNON, 2010; PUI, 2000; REDAELLI, 2005). Dentro das leucemias, a LLA corresponde a 75% de todos os casos de leucemias, a LMA corresponde de 20% e a LMC corresponde a 5% (INCA, [2007]).

No Estados Unidos, a ocorrência anual é de 35 a 40 casos por 1 milhão de pessoas. Sendo que aproximadamente 2.900 crianças e adolescentes menores de 20 anos de idade são diagnosticados com LLA a cada ano. Ao longo dos últimos 25 anos tem sido visto um aumento na incidência de LLA (NCI, 2013; SHAH, 2007).

Um pico agudo da incidência de LLA é observado em crianças de 2 a 3 anos de idade (maior do que 90 casos por milhão por ano), com taxas que reduzem para 30 casos por milhão em crianças com até 8 anos. A incidência de LLA em crianças de 2 a 3 anos é cerca de 4 vezes maior do que em recém nascidos e é igualmente 4 vezes maior do que em crianças com 10 anos ou mais (NCI, 2013)

A etiologia da LLA pode estar associada a alguns fatores ambientais e genéticos. Existem evidências para alguns fatores de risco, como exposição à radiação ionizante, medicamentos utilizados em quimioterapia e exposição ocupacional ao benzeno (INCA, [2015]), entre outros. Os primeiros indícios de que a exposição à radiação ionizante levava ao desenvolvimento de leucemia foram estudados após os bombardeios nucleares no Japão,

durante a II Guerra Mundial, onde foi observado um excesso nas taxas de incidência para LLA, LMA e LMC (PRESTON, 1994). Por outro lado, as doenças cromossômicas constitucionais, as altas taxa de leucemia familiar, a alta incidência de leucemia em gêmeos idênticos e as alterações citogenéticas características em blastos leucêmicos; tudo isso sustenta a associação entre LLA e à genética (MORIYAMA, 2015; LI, 2014).

Entre as alterações cromossômicas mais importantes na caracterização do risco de LLA, encontra-se o cromossomo Filadélfia (Ph). Sua incidência em pacientes com LLA aumenta com a idade, acometendo 3% das crianças, 25% dos adultos, e pode chegar a entre 40 e 50% naqueles indivíduos com mais de 60 anos (ABRALE, 2015). A presença do cromossomo Ph representa um diagnóstico distinto na classificação da OMS – LLA. O prognóstico desse tipo de LLA é extremamente pobre quando tratada apenas com quimioterapia citotóxica, por outro lado, com a introdução da terapia com inibidores de tirosina-quinase (TKIs, do inglês *tyrosine kinase inhibitors*), tem se obtido resultados muito melhores com o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) (GRUBER, 2009).

O desenvolvimento de LLA é um processo na maioria das vezes que ocorre em múltiplas etapas com mais de uma alteração genética necessária. Em pelo menos alguns casos de LLA infantil, a alteração genômica inicial parece ocorrer ainda no útero. Tais evidências vêm de observações de imunoglobulinas ou do rearranjo de antígenos de receptores de células T que são únicos em cada grupo de células leucêmicas do paciente podendo ser detectada em amostras obtidas no nascimento (GREAVES, 2003; TAUB, 2002).

2.1 QUADRO CLÍNICO

O quadro clínico da LLA depende do grau de infiltração da medula óssea bem como da extensão da doença extramedular. Os principais achados clínicos ao diagnóstico da LLA são mostrados na tabela abaixo. Dentro do quadro clínico ainda é encontrado palidez, fadiga, anorexia, artralgia e artrite. As alterações musculoesqueléticas são frequentes nas leucemias agudas da infância, tanto na linfoide quanto na mieloide. (ROBAZZI, 2007).

Tabela 5: Principais achados clínicos ao diagnóstico de LLA.

Achados clínicos da LLA	Pacientes (%)
Febre	61
Sangramentos	48
Dor óssea	23
Adenomegalia	50
Esplenomegalia	63
Hepatoesplenomegalia	68

Fonte: Adaptado de Manual de Oncologia, 3ª Edição.

2.2 DIAGNÓSTICO

Atualmente, o diagnóstico para LLA integra características morfológicas, citoquímicas, imunofenotípicas e citogenéticas como detalhado pela classificação de neoplasias linfoides em 2008 pela organização mundial de saúde (VARDIMAN, 2009).

2.2.1 Diagnóstico morfológico

A avaliação morfológica do aspirado de medula óssea ou biópsia (em casos de punção “seca”), ainda hoje, representa o primeiro passo no diagnóstico, para primeiramente diferenciar a LLA da LMA (LAI, 2000). O critério para diagnóstico de LLA é a presença de 25% de blastos na contagem diferencial das células nucleadas na medula óssea (SEVILLA, 2010). Entretanto, essas avaliações são limitadas para o diagnóstico preciso do tipo de LLA, uma vez que a partir do ponto de vista morfológico não é possível distinguir entre linhagem B ou T, para o qual a técnica de citometria de fluxo torna-se o padrão ouro para a identificação da linhagem celular e da definição do subgrupo de LLA (BENE, 2011).

2.2.2 Diagnóstico imunofenotípico

As LLA são classificadas igualmente como os linfomas linfoblásticos na categoria de neoplasias de linhagem B ou T (LLA B ou LLA T). No caso das LLA, a imunofenotipagem por citometria de fluxo (IMF) permite identificar nos blastos leucêmicos os antígenos de superfície, intracitoplasmáticos e nucleares pelo uso de anticorpos monoclonais específicos (AcMo) e caracterizar as células leucêmicas quanto a sua origem e grau de diferenciação. Por essa razão a IMF é mandatória para a definição da origem celular B ou T, como também os subtipos imunofenotípico que são de relevância para prognóstico e tratamento dos pacientes. Além disso, essa ferramenta tem sido usada para detecção da doença residual mínima (DRM) (PATKAR, 2012).

A maioria das LLA são de linhagem B, tanto em crianças quanto em adultos. A linhagem B é demonstrada pela expressão dos marcadores CD19, CD20, CD22, CD24, CD79a (MAINO, 2015). Dentre as leucemias derivadas de precursores B, admitem-se basicamente três estágios maturativos: pró-B, pré-B e B maduro, de acordo com a expressão de imunoglobulina citoplasmática e de superfície.

De todos os marcadores de superfície utilizados para definição do subgrupo de LLA, o antígeno CD10 (CALLA: antígeno comum de LLA) está presente em 90% das leucemias pró-B e 95% das pré-B e sua presença indica um bom prognóstico. Por outro lado, a ausência de CALLA pode estar associada a fatores de mau prognóstico, tais como idade inferior a 12 meses, leucometria elevada, visceromegalia e infiltração do SNC (PUI, 2003). Em leucemias T-derivadas, os marcadores linfoides associados a esta linhagem são: CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 e CD8; conforme observados na tabela 6 acima.

Os marcadores CD2, CD5 e CD7 são antígenos comum a maioria das células T imaturas, mas nenhuma delas é linhagem específica de modo que o diagnóstico necessita da presença do marcador CD3. Pode haver coexpressão de marcadores mieloides e de linhagens linfoides diferentes entre si como por exemplo LLA-T coexpressando CD19 ou CD79a, ou a expressão de marcadores mieloides CD13 e CD33. A expressão de marcadores de linhagens distintas deve ser avaliada no sentido de diferenciar a presença de um padrão de expressão antigênica aberrante de leucemia bifenotípica (LIU, 2014). A tabela abaixo mostra os três estágios de maturação para cada linhagem celular e seus antígenos principais (LIU, 2014; SCHWICKERT, 2014).

Tabela 6: Padrão de expressão antigênica nas leucemias linfóides agudas.

Linhagem linfocitária	Expressão imunológica
LLA B	
Pró-B	Na superfície: CD10, CD19, CD24, CD34, HLA-DR No citoplasma: CD22, CD97a e 79b No núcleo: TdT
Pré-B	Na superfície: CD10, CD19, CD24, CD34, HLA-DR e CD22 No citoplasma: CD22, CD97a e 79b No núcleo: TdT
B maduro	Na superfície CD20 e IgM
LLA T	
Timócito precoce	Na superfície: CD2, CD5, CD7 No citoplasma: CD3 No núcleo: TdT
Timócito comum	Na superfície: CD1, CD2, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10 e CD3 fraca intensidade No citoplasma: CD3 No núcleo: TdT
Timócito tardio	Na superfície: CD2, CD4, CD5, CD7, CD8 ou CD3 de forte intensidade No citoplasma: CD3 No núcleo: TdT

Fonte: Adaptado de Manual de Oncologia, 3ª edição.

2.2.3 Diagnóstico citogenético

A citogenética representa uma importante ferramenta na classificação da LLA. A caracterização das LLAs pelo estudo genético dos blastos por meio de técnicas de citogenética e biologia molecular permite delimitar alterações cromossômicas características da doença e indicadoras de prognóstico. A exemplo disso, a cariotipagem convencional pode auxiliar a

identificação de translocações recorrentes bem como ganhos e perdas de material cromossômico, entretanto a maior limitação dessa técnica é que em alguns casos as células leucêmicas falham ao entrar na metáfase, o que impossibilita o diagnóstico por essa técnica.

Por outro lado, a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) parece contornar esse problema, sendo possível detectar e visualizar de maneira direta anormalidades cromossômicas em LLA com até 99% de sensibilidade (MAZLOUMI, 2012).

Outras técnicas de identificação genômica como microarranjo (*array-CGH*), arranjo de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) podem permitir a identificação de mudanças sub-microscópicas e ocultas no genoma (HEALY, 2007).

As alterações cromossômicas que acometem cerca de 60 a 85% dos casos de LLA são numéricas e estruturais. (PUI, 2003). Tais mudanças cariotípicas que possam ocorrer em LLA podem ser relacionadas ao prognóstico da doença, levando a uma subdivisão demonstrado na tabela abaixo.

2.3 FATORES PROGNÓSTICOS

O prognóstico de LLA está diretamente relacionado a determinadas alterações clínicas e laboratoriais. Os atuais protocolos terapêuticos são desenhados a partir dos possíveis fatores prognósticos. Conforme os fatores que cada paciente tenha, será classificado em um grupo de risco. Os fatores conhecidos são leucometria e idade ao diagnóstico, sexo, citogenética, fenótipo, morfologia FAB, infiltração do SNC, massa mediastinal, hepato/espleno/adenomegalia, hemoglobina e plaquetas ao diagnóstico, etnia, imunoglobulinas séricas, rapidez de citorredução, expressão antigênica mieloide, estado nutricional e níveis de glicorticoides (CONTER, 2010).

Segundo o NCI, pacientes classificados como risco-padrão são aqueles com idades entre 1 ano e até 10 anos e leucometria inicial inferior do que $50.000/\text{mm}^3$. Por outro lado, acima desse valor é considerado fator independente de mau prognóstico e acomete cerca de 20% dos pacientes. A morfologia dos blastos, quimioterapia utilizada e as variações individuais no metabolismo das drogas são fatores que influenciam no prognóstico da doença (SCHWICKERT, 2014).

Tabela 7: Subdivisões da LLA e suas alterações cromossômicas.

Subtipo	Prevalência (%)	Clínica
LLA B		
Hiperploídia com > de 50 cromossomos	20 a 30	Excelente prognóstico
Hiperploídia com < de 44 cromossomos	2 a 3	Pior prognóstico, alta frequência de vias Ras e mutações de genes da família IKAROS
Translocação t(12;21)(p13;q22) codificantes de <i>ETV6-RUNX1</i>	15 a 25	Excelente prognóstico
Translocação t(1;19)(q23;p13) codificante de <i>TCF3-PBX1</i>	2 a 6	Geralmente excelente prognóstico, associação com recaída no SNC
Translocação t(9;22)(q21;q23) codificante de BCR-ABL1	2 a 4	Pior prognóstico, indicação de imatinibe e/ou desatinibe a quimioterapia intensiva
LLA tipo Ph	10 a 15	Presença de lesões múltiplas quinases ativadas, associada com o aumento da idade, elevados índices de contagem de células brancas, alteração <i>IKZF1</i> , possibilidade de terapia com inibidores de tirosina quinase
Translocação t(4;11)(q21;q23) que codifica fusão <i>MLL-AF4</i>	1 a 2	Comum em LLA infantil, especialmente em idade < 6 meses, associada a pior prognóstico
Translocação t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(q12;q24), t(2;8)(q12;q24) que codifica rearranjo MYC	2	Prognóstico favorável com quimioterapia de alta dose por tempo curto
Rearranjo <i>CRLF2</i> (IH-CRLF2; P2RY8-CRLF2)	5 a 7	Comum em síndrome de Down, associado com LLA tipo Ph (~50%), com deleção <i>IKZF1</i> e/ou mutação de <i>JAK1/2</i> (pior prognóstico em LLA não associada a síndrome de down)
LLA com defeito ERG	7	Distintos perfis de expressão gênica
LLA T		
Translocação t(1;7)(p32;q32) e t(1;14)(p32;q11), deleção 1p32; desregulação <i>TAL1</i>	15 a 18	Geralmente desfechos favoráveis
Translocação t(11;14)(p15;q11) e deleção <i>LMO2</i>	10	Geralmente desfechos favoráveis
Translocações t(10;14)(q24;q11) e t(7;10)(q35;q24), desregulação <i>TLX1 [HOX 11]</i>	7	Geralmente desfechos favoráveis
Translocações t(5;14)(q35;q32), desregulação <i>TLX3</i>	20	Pior prognóstico, geralmente fusionado ao BCL11B

Translocação t(10;11)(p13;q14), <i>PICALM-MLLT10 [CALM-AF10]</i>	10	Piores desfechos clínicos
MLL-MLLT1[MLL-ENL]	2 a 3	Prognóstico semelhante a outros tipos de leucemias com rearranjo MLL
Amplificação 9q34 codificando NUP214-ABL1	6	Possibilidade de terapia com inibidores de tirosina-quinase, fusões identificadas em LLA T inclui <i>EML1-ABL1</i> , <i>ETV6-JAK2</i> e <i>ETV6-ABL1</i>
Translocação t(7;9)(q34;q34)	1	Rearranjo de <i>NOTCH1</i> , com mutações de sequência em > de 50% das LLA T
LLA T precoce	10 a 15	Expressão de fatores mieloides e de marcadores de células tronco, relacionada a pior prognóstico, geneticamente heterogênea com mutações nos reguladores hematopoiéticos, citocinas, sinalização Ras, modificações epigenéticas

Fonte: Autor, 2015.

2.4 TRATAMENTO

O tratamento de crianças e de adolescentes com LLA leva em consideração o grupo ao qual ela está inserida. Essa estratificação em grupos é baseada na classificação de risco de falha do tratamento. Aqueles pacientes com características que conferem um bom prognóstico podem ser tratados com um regime terapêutico menos tóxico, enquanto que uma terapia mais agressiva é reservada para aqueles pacientes com doença de alto risco (PUI, 2006). Os estudos clínicos têm obtido taxas de sobrevida livre de doença de 79 a 82% na LLA em crianças e adolescentes

Entretanto, grande desafio está em reduzir os efeitos tardios relacionados ao tratamento. Novas intervenções, por exemplo, o uso dos inibidores da tirosina-quinase ou de anticorpos monoclonais, com benefícios e riscos incompletamente definidos, são primeiro introduzidos para os pacientes de maior risco e, somente mais tarde para aqueles de baixo risco, após benefício comprovado. Um segundo princípio norteador do tratamento da LLA tem sido a hipótese de Goldie-Coldman (GOLDIE, 1984), a partir do princípio de que as velocidades das mutações são constantes, e que o risco de uma célula ser resistente, depende do número de células malignas presentes e do tempo elas estão presentes.

Uma variedade de achados clínicos e laboratoriais ao diagnóstico, e a avaliação da resposta medular precoce, têm sido usados para a definição de risco (PUI, 2006). A partir disso, algumas características são relacionadas a grupos de alto risco em pacientes pediátricos com LLA; entre as principais, idade < 1 ou > 10 anos, contagem inicial de células brancas muito acima de 50.000/ μ l, envolvimento do SNC, envolvimento testicular, características citogenéticas não favoráveis (hipodiploidia, t(9;22), 11q23, iAMP21) e falha da quimioterapia de indução ou doença residual mínima (DRM) positiva (CONTER, 2010).

Além disso, características próprias da célula leucêmica também são utilizadas para determinar o risco da doença, de forma que estas formam ou fazem parte de uma descrição imunofenotípica, através da análise de expressão de proteínas ou marcadores que ajudam a identificar a linhagem celular derivada de células B ou T. Aproximadamente 80% dos pacientes infantis são classificados com o fenótipo LLA-B, os quais são incluídos no grupo de baixo risco da doença. Por outro lado, cerca de 10 a 15% dos pacientes são classificados fenotipicamente como LLA-T, e isto está fortemente associado a uma baixa taxa de cura. Entretanto, a identificação desses pacientes e o tratamento com esquemas mais agressivos tem levado a uma taxa de sobrevivência que se assemelha com a de pacientes LLA-B (GAYNON, 2010; REITER, 1994).

Ainda em relação às características celulares, existem alguns tipos raros de leucemias agudas, que ocorrem em menos de 5% dos pacientes pediátricos, derivados de linhagens mistas. Esses não podem ser caracterizados como linfóide ou mieloide, bem como linhagens bifenotípicas que incluem marcadores derivados de células B e T. Embora não haja uma classificação específica para esses tipos de leucemias, sabe-se que estão associadas a um pior prognóstico (GERR, 2010).

A implantação da Doença Residual Mínima (DRM) como mais um critério de definição dos grupos de risco representa um importante avanço no tratamento oncológico no Brasil. Consiste em uma técnica simplificada, de baixo custo, que possui uma sensibilidade no método semiquantitativo por PCR que varia de um mínimo de 10^{-2} até o máximo de 10^{-3} (SCRIDELI, 2006). Pode ser realizado também por citometria de fluxo. Todavia, deve-se ressaltar que a sensibilidade é limitada, sendo importante a utilização de amostras frescas de medula óssea e com quantidade elevada de DNA (500 mg) (SCRIDELI, 2008).

O método para estudo de doença residual mínima por reação em cadeia da polimerase (PCR) nas fases iniciais do tratamento é capaz de estratificar crianças em grupos de bom e mau prognóstico (BUCCISANO, 2012). A determinação da DRM é atualmente necessária no aprimoramento da definição dos grupos de risco e da definição de terapias ajustadas aos

respectivos grupos, representando uma variável de fundamental importância para definir a melhor e mais eficaz terapia.

Atualmente, existem 4 componentes principais para o tratamento de LLA, que utiliza esquemas com múltiplos fármacos anti-neoplásicos cuja finalidade é a redução do desenvolvimento de resistência ao fármaco. A intensidade e o tempo dos blocos de tratamento dependem do tipo de LLA (B ou T) e do grupo de risco. Como mencionado anteriormente, os grupos de risco são divididos em baixo, intermediário e alto; por sua vez o grupo baixo é dividido em dois subgrupos que são o Baixo Risco Verdadeiro (subgrupo BRV) e o Baixo Risco Intermediário (subgrupo BRI). Da mesma forma o grupo de alto risco é dividido em dois subgrupos que são os Alto Risco Responder Lento (subgrupo RL) e Alto Risco Responder Rápido (subgrupo RR).

A indução de remissão é o primeiro bloco de quimioterapia, com duração de 4 a 6 semanas. Nesse período, os pacientes são geralmente admitidos em um hospital para iniciar o tratamento e internação. O objetivo desse bloco de terapia é induzir uma completa remissão, sendo alcançado por cerca de 95% dos pacientes. Daqueles pacientes que não alcançam a completa remissão até o final da indução, cerca de 50% demonstram uma falha da indução e o restante sucumbe ao tratamento indo a óbito. Para aqueles com falha da indução, há necessidade um transplante alogênico de medula óssea, embora não exista um consenso sobre isto (SCHRAPPE, 2012).

A indução da remissão é seguida pela consolidação cuja finalidade é erradicar a doença residual microscópica que ainda permanece após a remissão completa. Com duração de 6 a 9 meses, essa fase contém variações de intensidade e de duração entre diferentes protocolos. Entretanto, uma característica que parece não ser alterada entre os protocolos é o uso da quimioterapia combinada, isto é, o uso de diferentes agentes anti-neoplásicos que aumentam o sinergismo entre os agentes e minimiza a resistência aos fármacos (SEIBEL, 2008).

A fase de manutenção é o último e mais longo estágio do tratamento da LLA infantil, geralmente se constitui de um esquema menos intenso. Por ser um tratamento mais prolongado demonstra um risco baixo de recaída após a estabilização da remissão. A principal característica da terapia de manutenção é o uso de agentes antimetabólitos como metotrexato e mercaptopurina (BHATIA, 2012; BRACKETT, 2014).

O quarto componente do tratamento de LLA em pacientes infanto-juvenis é a terapia direta do SNC, que incluem pacientes com manifestações clínicas no SNC, bem como a profilaxia de pacientes subclínicos. Os esquemas terapêuticos para erradicar a doença no SNC incluem administração intratecal de quimioterápicos, bem como a administração sistêmica com

agentes que possuem capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e radiação intracraniana (MATLOUB, 2006).

Tabela 8: Quimioterápicos administrados no tratamento de Leucemia Linfóide Aguda.

Fase de indução (4 a 6 semanas)	Fase de consolidação (6 a 9 meses)	Fase de manutenção (2 a 3 anos)	Terapia contra a doença no SNC
Vincristina	Mercaptopurina	Metotrexato	Metotrexato
Doxorrubicina	Thioguanina	Mercaptopurina	Citarabina
Daunorrubicina	Metotrexato		Hidrocortisona
Asparaginase	Ciclofosfamida		Dexametasona
Prednisona	Etoposídeo		Asparaginase
Dexametasona	Citarabina		

Fonte: Autor, 2015.

2.5 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA

Doença residual mínima (DRM) é o nome atribuído ao número muito baixo de células remanescentes no paciente durante ou após o tratamento antineoplásico; ou seja, durante o período de remissão. DRM é a principal razão para a recidiva em pacientes com leucemia e é detectado por métodos moleculares, atualmente estabelecidos como um padrão-ouro. A detecção da DRM tem vários papéis importantes; investigar a presença de células tumorais após a terapia, determinação da eficácia do tratamento, monitorar o estado de remissão do paciente e prever a possibilidade de uma recaída (BASSO, 2009). Em um grande número de pacientes com leucemia, a DRM pode ser detectada por técnicas de microscopia quando em remissão completa (BENE, 2009). A DRM detectada nas fases iniciais do tratamento, independente de índices prognósticos clássicos como idade e contagem de leucócitos, imunofenotipagem e análise citogenética, entretanto são importantes para fornecer informações sobre o prognóstico (IRVING, 2009).

A DRM pode ser detectada por reação em cadeia da polimerase ou citometria de fluxo multiparamétrica (CFM), e é de importância vital na maioria dos subtipos de leucemia. Existem dois métodos básicos para a detecção de DRM em crianças com LLA, a análise molecular de genes de receptores de células T e B e rearranjos e análise de CFM de fenótipos imunes

aberrantes, sendo que ambos são preditivos para o desfecho da LLA (IRVING, 2009). Com ambos os métodos, é possível detectar uma única célula leucêmica em 10.000 ou mais células normais, aumentando assim a sensibilidade de um mínimo de 100 campos, quando comparados a microscopia óptica convencional (KARAWAJEW, 2015). A

Identificação de fatores de prognóstico é crítica na determinação da terapia para a subgrupos de pacientes e tem como objetivo atingir uma elevada taxa de cura, com uma toxicidade mínima. Outra meta importante de estratificação dos grupos de risco é definir pacientes com um alto risco de recaída, que podem se beneficiar do transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico, após a remissão completa (TEKGÜNDÜZ, 2010). Atualmente os métodos de detecção da DRM em pacientes com LLA são: Imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica, já mencionada; RQ-PCR – baseada na detecção de transcritos de genes de fusão ou quebras cromossômicas, RQ-PCR: baseada na detecção de imunoglobulina clonal e rearranjo do gene do receptor de célula T (BRÜGGEMANN, 2010).

Tabela 9: Combinações Imunofenotípicas usadas no estudo de DRM na LLA.

Linhagem	Diferenças	Fenótipo	% Frequência (10⁻³ a 10⁻⁴)
LLA-B	Quantitativa	CD19/CD34/CD10/TdT	30-50
		CD19/CD34/CD10/CD22	20-30
		CD19/CD34/CD10/CD38	30-50
		CD19/CD34/CD10/CD45	30-50
	Qualitativa	CD19/CD34/CD10/CD13	10–20
		CD19/CD34/CD10/CD15	5–10
		CD19/CD34/CD10/CD33	5–10
		CD19/CD34/CD10/CD65	5–10
		CD19/CD34/CD10/CD21	5–10
		CD19/CD34/CD10/CD56	5–10
		CD19/CD34/CD10/KORSA3544	10–20
		CD19/CD34/TdT/cytoplasmic	10–20
		CD19/7.1 e CD19/p5	3–5
		LLA-T	Qualitativa
CD34/CD3	30-50		

3 TOLL-LIKE RECEPTORS

Receptores do tipo Toll, do inglês, *Toll-like receptors* (TLR), são receptores que pertencem a uma família de receptores evolutivamente conservados responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a organismos patogênicos, do inglês, *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), e de padrões moleculares associados ao dano, do inglês, *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Estes receptores foram descritos inicialmente em moscas das frutas - *Drosophila melanogaster* - e denominados *Toll* e associados a defesa contra patógenos. Posteriormente, foram descritos como receptores homólogos em mamíferos e designados de “*Toll-like receptors*”. Atualmente, 13 membros de TLRs foram identificados em humanos e em ratos e todos eles apresentam pequenas diferenças nas cadeias de aminoácidos que compõem as proteínas que os formam. Por causa dessa diferença, cada TLR é capaz de reconhecer classes diferentes de moléculas biológicas presentes em diversos microrganismos, como por exemplo, LPS, lipoproteínas, flagelina, peptidoglicana, DNA e outras (AKIRA, 2006; TAKEDA, 2004).

Dessa forma, estes receptores tornam-se moléculas essenciais para o sistema imune inato, além de representar uma via pela qual ocorre a regulação do sistema imune adquirido (HARSINI, 2014). Os TLRs são constituídos estruturalmente por um domínio extracelular rico em repetições do aminoácido leucina, um domínio transmembrana constituído por uma glicoproteína que possui uma cauda N-terminal com um sítio de ligação da molécula ligante reconhecida e um domínio intracelular homólogo ao domínio, do inglês, *Toll/Interleukin-1 receptor* (TIR), com a porção da cauda C-terminal com sítios responsáveis pelas cascatas de sinalização celular recrutamento de moléculas adaptadoras específicas que também possuem um domínio do tipo TIR (MORESCO, 2011). As moléculas adaptadoras inicialmente recrutadas, essenciais à transdução de sinal pelos TLRs, são as proteínas MyD88, Mal (Tirap), TRIF (Ticam) e TRAM (CHANG, 2010).

Os membros da família de TLRs são expressos diferencialmente em uma grande variedade celular e tecidual, incluindo tanto células do sistema imune inato (como monócitos e células dendríticas) quanto linfócitos do sistema imune adaptativo, além de outras células não constituintes do sistema imune como queratinócitos e células endoteliais (HOPKINS e SRISKANDAN, 2005; CHANG, 2010). Quanto a sua localização, sabe-se que existem 11 tipos de TLRs expressos em humanos localizados na superfície da membrana celular ou em endossomos. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são expressos na superfície da membrana

celular, enquanto que as formas TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão presentes no interior de endossomos (LI, 2010).

O reconhecimento de uma gama de estruturas moleculares de organismos microbiológicos pelos TLRs leva a ativação de uma cascata de sinalização intracelular que leva a uma indução de genes envolvidos na defesa contra organismos patogênicos, tais genes codificam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. A importância da ativação de TLRs na ativação da resposta imune tem sido intensivamente investigada nos últimos anos produzindo muitos estudos. Tais pesquisas levaram a descoberta de duas importantes vias que são ativadas pelos TLRs.

Uma via é dependente do fator 88 de diferenciação mieloide, do inglês, *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), e outra que, por sua vez, é independente do MyD88. Todos os TLRs ativam a cascata de sinalização celular via MyD88, com exceção do TLR3 (HARSINI, 2014).

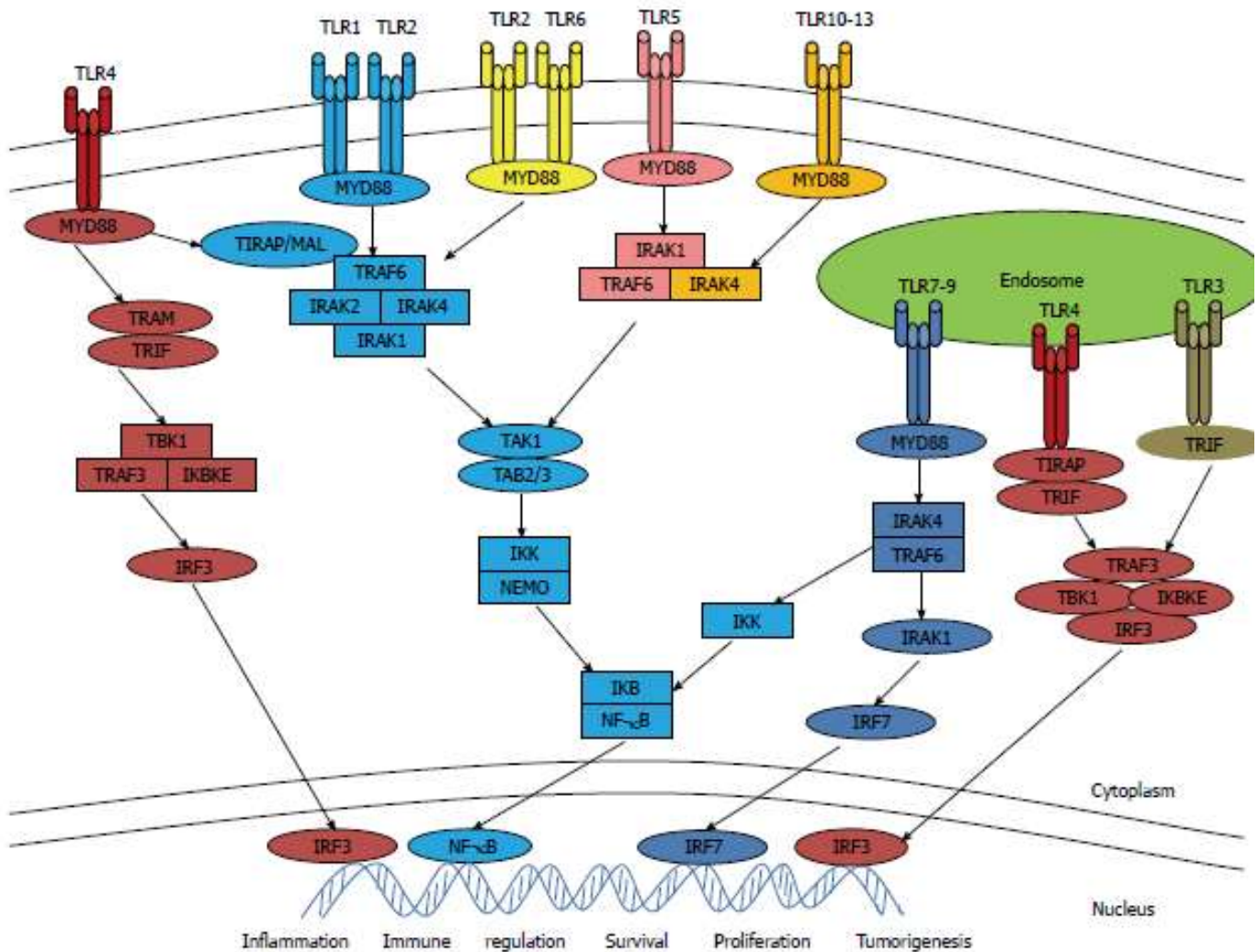
Após a ativação do TLR pelo seu respectivo ligante, ocorre o recrutamento do MyD88, o que leva a uma subsequente ativação de fatores *downstream* incluindo NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), interferon (IFN) e outros fatores regulatórios tais como fatores de transcrição. Após o reconhecimento dos ligantes pelo TLR2 e pelo TLR4, respectivamente, ocorre uma dimerização formando complexos. Essa configuração é então alterada e moléculas adaptadoras específicas são recrutadas, incluindo MyD88, TRIF, TRAM e Tirap/Mal, inicializando a cascata de sinalização intracelular. Este processo resulta no recrutamento de outras proteínas adaptadoras tais como IRAK, TRAF3 e TRAF6, juntamente com a indução de fosforilação de I κ BKE e a formação de complexos IKK constituído de TBK1/TRAF3/I κ KE, NEMO/I κ BKE levam a ativação de fatores de transcrição de genes envolvido na inflamação, regulação da resposta imune, sobrevivência, proliferação celular e tumorigênese (ROLF, 2015).

Tabela 10: Toll-Like Receptors, principais ligantes, proteínas adaptadoras e resposta.

TLRs	DAMPS (endógenos) Ligantes	PAMPS (exógenos) Ligantes	Proteínas Adaptadoras	Resposta
TLR2	HSP60, HSP70, HSP96, HMGB1, ácido Hialurônico	Lipoproteína /lipopeptídeos, HMGB1 Peptideoglicanos, ácido Hialurônico, ácido lipotecoico, glicoinositol fosfolípídeos, Glicolípídeos, Porinas, LPS	MAL, Tirap, Myd88	Citocinas inflamatórias
TLR3	dsRNA, mRNA, ssRNA	dsRNA, ssRNA (Viral)	TRIF	Citocinas inflamatórias, Interferon do tipo I
TLR4	HSP22, HSP60, HSP70, HSP96 HMGB1 β -defensina 2, fibronectina, ácido Hialurônico, herapan sulfato, Fibrinogênio, surfactante	LPS HSP60, proteína de fusão, proteínas de envelope viral, taxol	TRAM, TRIF, MAL, Tirap, Myd88	Citocinas inflamatórias, Interferon do tipo I

Fonte: Autor, 2015.

Figura 6: Demonstração as vias de sinalização, juntamente com a cascata intracelular ativada pelo TLRs, com o recrutamento das moléculas adaptadoras e seus principais efeitos.



Fonte: Li, et al. 2014.

Nesse trabalho, dissertaremos sobre os TLR2, TLR3 e TLR4, em relação a sua estrutura, principais ligantes e particularidades.

3.1 Toll-Like Receptor 2

O *Toll-Like Receptor 2* é considerado o principal mediador na ativação de macrófagos em resposta ao bacilo de Koch - *Mycobacterium tuberculosis*. O TLR2 é ativado por uma lipoproteína de 19 kDa que leva à produção de citocinas inflamatórias, principalmente TNF- α e IFN- γ . A partir de diversos estudos, foi visto que sem a presença de TLRs funcionais, a fagocitose não conduz a ativação da resposta imune. Assim um polimorfismo encontrado no

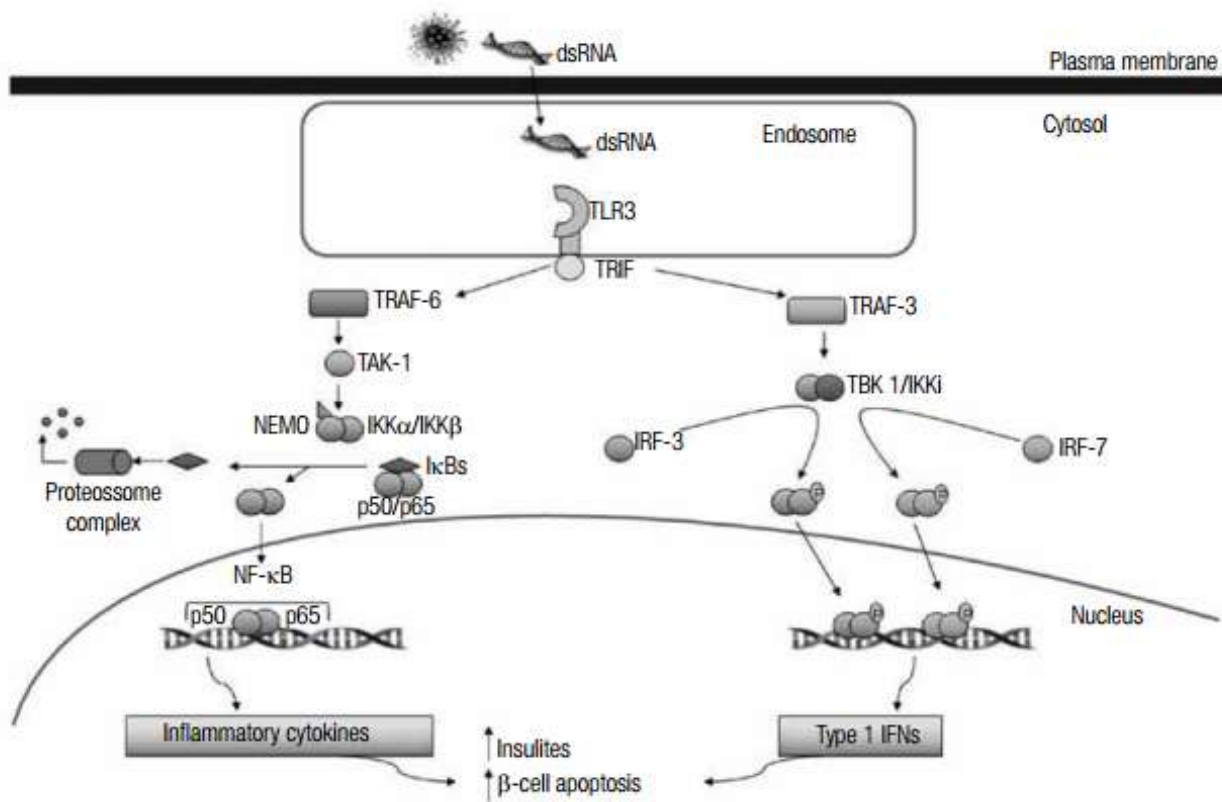
gene do TLR2 pode levar a uma redução da ativação dos macrófagos contra peptídeos bacterianos, resultando em uma atenuada resposta imune contra o hospedeiro. Muitos SNPs já foram identificados no gene de TLR2, embora a maioria não cause alterações sobre a função das células, alguns SNPs podem levar tanto a ganho de função, levando a uma resposta aguda ou que levam ao portador ter uma maior suscetibilidade a infecções (FRAZÃO, 2013).

3.2 *Toll-Like Receptor 3*

O gene do TLR3 é o único receptor da família dos TLRs que quando acionado pelo seu ligante não ativa uma cascata de sinalização celular via MyD88 e sim pela molécula auxiliadora TRIF, também conhecida como, TICAM-1. A partir desse acoplamento, há o recrutamento de moléculas como TRAF3 (*TNF receptor-associated factor 3*), TBK1 (*TANK-binding kinase 1*), IKK ϵ (*inhibitor of kappa-B kinase epsilon*), TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) e TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), o que leva à fosforilação de fatores de transcrição, sendo IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) e NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) os principais (KAWAI, 2011; VERCAMMEN, 2008).

Ao contrário do que acontece aos outros TLR, a fosforilação de Tyr759 e Tyr858 no domínio citoplasmático do TLR3 é necessária para ativar a cascata de sinalização (SARKAR, 2007). As principais estruturas ligantes de TLR3 são RNAs virais de fita única (ssRNA) e também de fita dupla (dsRNA). As informações sobre o TLR3 são escassas em comparação ao que se tem sobre outros TLRs, entretanto sabe-se que muitos SNPs no gene do TLR3 podem levar ao aumento da suscetibilidade a câncer, doenças autoimunes e infecções. Em virtude disso, esses SNPs tem um grande potencial para se tornar biomarcadores para avaliação do risco para essas doenças.

Figura 7: Sinalização do TLR3. A ligação do ligante de TLR3 (dsRNA) com o posterior recrutamento de moléculas adaptadoras que levam a ativação de fatores de transcrição que intensificam a codificação de citocinas pró-inflamatórias.



Fonte: Adaptado de Kumar, 2009.

3.3 Toll-Like Receptor 4

O *Toll-Like Receptor 4* é um receptor de superfície celular, principalmente expresso em células mieloides, mas também em mastócitos, células endoteliais, células NK e linfócitos, células epiteliais, queratinócitos, fibroblastos e inclusive em células tumorais (CHANG, 2010). Seu principal ligante é o LPS de bactérias Gram-negativas e o ácido lipoteicoico (LTA). Ambos LPS e LTA ligam-se primeiramente ao receptor de CD14 que em seguida os transfere para o TLR4. Após essa ligação ocorre uma homo-dimerização do TLR4 com outros TLRs formando um complexo no qual é adicionada a proteína co-receptora MD-2 que será transportada para a superfície celular (PARK, 2009). A transdução do sinal do TLR4 pode levar ao recrutamento das quatro moléculas adaptadoras envolvidas no processo de sinalização: a MyD88, TRIF, TIRAP e TRAM (GANGLOFF, 2012). O efeito global dessa transdução é indução da expressão

de uma série de genes envolvidos na resposta inflamatória, como quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, moléculas antimicrobianas e moléculas coestimulatórias da resposta imune adaptativa (MORESCO, 2011).

O domínio transmembrana do TLR4 tem um papel importante e crítico no processo de oligomerização funcional que constitui uma mutação sem sentido. Tal mutação pode alterar a resposta do TLR4 ao LPS.

Embora o reconhecimento de patógenos ou de outros agentes inflamatórios pelas células da imunidade inata seja essencialmente importante no controle ou no curso da doença, a resposta inflamatória desencadeada precisa ser controlada afim de se evitar danos teciduais extensivos e a manifestação de estados patológicos crônicos (BISWAS & LOPES-COLLAZO, 2009).

3.4 TLRs e o câncer

As vias que levam a indução das respostas imune e inflamatória já foram parcialmente caracterizadas, no entanto ainda não está claro o seu papel em algumas doenças, tanto em doenças inflamatórias, em autoimunidades e inclusive em neoplasias malignas. Por outro lado, evidências sugerem que o mau funcionamento de sinalizações dos TLRs contribui significativamente para o desenvolvimento de doenças autoimunes, tuberculose, pancreatite aguda grave, enterocolite necrosante, aterosclerose, doença hepática álcool induzida e hepatites não alcoólicas (MANNI, 2015; MAJUMDAR, 2015).

A sinalização dos TLRs parece modular a transformação do tecido ou de células que sofreram por um processo de inflamação crônica e/ou agudo em lesões pré-malignas (ZHANG, 2014; FURI, 2013).

Um estudo com câncer colorretal, neoplasia que está fortemente associada a infecções bacterianas e à indução de uma resposta inflamatória crônica, demonstrou uma expressão gênica elevada de TLR1, TLR2, TLR4, TLR8 de células tumorais provenientes de pacientes com CCR, em relação a células normais dos mesmos pacientes. Entretanto a expressão gênica de MyD88, IFN- α , IL-6 e IL-8 das células tumorais não mostrou significante aumento em relação às células normais (LU, 2014).

Entretanto uma das principais vias ativadas pelos TLRs, a via MyD88 dependente está fortemente associada ao desenvolvimento de câncer colorretal (URONIS,2009), isto sugere que não somente a via dependente de MyD88 é selecionada para levar ao desenvolvimento de fatores tumorais (UEHORI, 2003). Entretanto, outras moléculas adaptadoras e proteínas consideradas, como fatores de transcrição de genes relacionado à inflamação, as quais são recrutadas para a ativação da resposta *downstream* iniciada pelos TLRs também estão associadas ao desenvolvimento tumoral (KAWAI, 2004).

Outros dois estudos mostraram que a ativação do TLR via MYD88 induzida por PAMPs está relacionada a uma gravidade da colite crônica, que por sua vez mostrou-se diretamente correlacionada com o desenvolvimento de câncer colorretal e com a progressão de adenoma para carcinoma invasivo (LI, 2014; FURI,2015).

Além de associação da expressão de TLRs de moléculas adaptadoras que participam da cascata de sinalização celular, muitos ensaios clínicos têm mostrado a relação da super-expressão de diversos tipos de TLRs a um pior diagnóstico em diferentes neoplasias (LI, 2014). Em câncer de pâncreas a ativação de TLRs parece promover mecanismos que favorece a invasão tecidual por células tumorais, produzindo metástases o que está intimamente relacionado a um pior desfecho clínico (WEN, 2013).

Além disso, sabemos que existem alterações genéticas, como variações de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes de TLRs que podem influenciar tanto na incidência, quanto na severidade e desfecho de doenças (SOPHIA, 2015).

Muito conhecimento tem sido produzido sobre TLRs quanto a sua a expressão gênica, a sua associação com fatores prognósticos e fatores de risco, a seus ligantes e sua ativação em algumas neoplasias malignas. Entretanto, pouco se sabe quanto ao seu papel em relação as leucemias pediátricas, principalmente LLA. Sabemos que células B precursoras de leucemia linfóide aguda (CBP-LLA) expressam os TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 e TLR9, no entanto não se sabe se a expressão elevada dos TLR3, TLR4 e TLR5 ocorre como consequência da malignidade tumoral ou representa um fenótipo (CHIRON, 2008; IACOBUCCI, 2012). Isso nos levou a estudar, primeiro, se há expressão desses receptores em blastos leucêmicos de pacientes com LLA, para posteriormente analisar o que essa expressão possa significar em relação as características clínicas.

4 OBJETIVOS

Este trabalho visa avaliar a expressão gênica de *Toll-like receptors* (TRL2, TRL3 e TRL4) em células B e T precursoras de leucemia linfóide aguda de pacientes com LLA em momentos diferentes, D0 (antes do tratamento) e D35 (após primeiro bloco de tratamento - indução), com a finalidade de verificar se o tratamento oncológico interfere na expressão gênica desses receptores. Os momentos avaliados D0 e D35 serão constituídos dos mesmos pacientes. Esta avaliação será acompanhada da análise dos dados clínicos do paciente, tais como raça, idade, classificação fenotípica, resposta ao tratamento, prognóstico, entre outras variáveis.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão gênica de TRL2, TRL3 e TRL4 na reação em cadeia da polimerase.
- Correlacionar os resultados com os dados clínicos dos pacientes da Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5 TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Câncer e Neurobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob orientação do Prof. Dr. Rafael Roesler e co-orientação da Dr^a. Caroline Brunetto de Farias, durante o período de julho a dezembro de 2015.

Apoio financeiro: HCPA, FAPERGS, INCT e ICI-RS.

A revista escolhida foi a *Blood, the Journal of the American Society of Hematology*. A escolha por essa revista foi baseada na sua vocação em investigar e divulgar, de forma clínica e experimental, a área de hematologia, incluindo distúrbios dos componentes sanguíneos, mecanismos de hemostasia, atividade vascular, imunologia e oncologia.

Fator de Impacto (2014): 10.452

Avaliação da Expressão de *Toll-like Receptors* nas Leucemias Pediátricas

Matheus Loureiro da Silva Cruz¹, Caroline Brunetto de Farias^{1,2,3}, Rafael Roesler^{1,2,4}

Filiation

¹ Cancer and Neurobiology Laboratory, Center of Experimental Research (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil

² National Institute for Translational Medicine, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Children's Cancer Institute (ICI-RS), Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumoral Biology, Pharmacology Department, Institute for Basic Health Sciences, Federal University do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

To whom the correspondence should be addressed

Rafael Roesler, Pharmacology Department, Institute for Basic Health Sciences, Federal University do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Rua Sarmento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro), Porto Alegre, RS - Brazil

CEP: 90046-900

Phone: +55 51 33083183; Fax: +55 51 33083121

E-mail: rafael.roesler@pq.cnpq.br ; roesler@terra.com.br

URL da Homepage: <http://www.ufrgs.br/icbs/>

RESUMO

O câncer infantil representa cerca de 0,5 a 3% de todas neoplasias da população em geral, apresentando incidência maior no sexo masculino. Os tumores infantis crescem rapidamente e são mais invasivos do que as neoplasias adultas, entretanto, tendem a responder melhor aos tratamentos e são considerados de bom prognóstico. As leucemias correspondem a 30% dos tumores pediátricos constituindo as neoplasias mais frequentes em indivíduos com menos de 15 anos. O tipo mais comum de neoplasia infantil, chegando a 79% de todos os casos de leucemias, é a leucemia linfóide aguda (LLA). Este tipo de neoplasia é caracterizado por formar um grupo heterogêneo de manifestações clínicas, na qual existe a substituição dos elementos medulares e sanguíneos normais por células imaturas, denominadas blastos, bem como o acúmulo destas em outros tecidos. Apesar dos avanços nos índices de cura, cerca de 25 a 30% das crianças apresentam recidiva da doença. Receptores do Tipo *Toll*, do inglês, *Toll-Like Receptors* (TLRs), se caracterizam como moléculas proteicas e componentes essenciais do sistema imune. Por meio do reconhecimento de estruturas moleculares presentes em organismos patogênicos, os TLRs são capazes de desencadear uma resposta dirigida a eliminar esses patógenos e desenvolver uma memória imunológica. Diversos estudos já evidenciaram a relação destes receptores com neoplasias malignas. Assim, o objetivo central desse trabalho é avaliar a expressão gênica dos TLRs (TRL2, TRL3 e TRL4) em células leucêmicas de pacientes com LLA, nos momentos D0 e D35, e correlacionar os resultados com os dados clínicos dos pacientes. A relação entre a expressão de TLRs e processos que propiciam a carcinogênese já foi identificada em outros tipos de tumores, bem como a associação dos TLRs a piores prognósticos. Neste trabalho, foi evidenciada a presença de tais receptores nos blastos leucêmicos em ambos momentos, e de fato foi verificado que houve um aumento da expressão dos receptores TLR2 e TLR4 entre os momentos D0 e D35, característica essa observada principalmente naqueles pacientes do grupo de alto risco. Outra característica evidenciada foi a maior expressão de TLR4 naqueles pacientes com fenótipo associado ao grupo de alto risco para LLA. Além do conhecimento já obtido nessa área, a relação entre TLRs e câncer ainda precisa ser estudada em maiores detalhes, uma vez que muitos dos efeitos da ativação dos TLRs conduzem ora a efeitos pró-tumorais, ora a efeitos antitumorais.

Palavras-chave: Receptores do Tipo-Toll, Leucemia Linfóide Aguda, Tumores Pediátricos, Leucemias Agudas, Câncer Infantil.

ABSTRACT

The development of cancer during childhood represent about 0.5 to 3% of all cases of cancer in the general population, and it is also noticeable the higher incidence in males. Children's tumors grow quickly and are more invasive than for adults, however, these tumors tend to respond better to the treatments and are considered to have a good prognosis. Leukemia account for 30% of all pediatric tumors, constituting the most frequent type of cancer in people under 15 years. The most common form of childhood cancer, reaching 79% of all cases of leukemia, is the acute lymphoblastic leukemia (ALL). This form of neoplasia is characterized by forming a heterogeneous group of clinical manifestations, in which there is a replacement of normal bone marrow and blood components by immature cells, called blasts, as well as their accumulation in other tissues. Despite advances in the complete cure rate, about 25-30% of children having cancers suffer relapses of the disease. Toll-Like Receptors (TLRs) are proteins which constitute essential components of the immune system. By recognizing molecular structures present in pathogens, TLRs trigger a targeted response to eliminate these pathogens and to develop an immunological memory. Several studies have demonstrated the relationship of these receptors with malignancies. Thus, the aim of this study is to evaluate the gene expression of TLRs (TRL2, TRL3 and TRL4) in leukemic cells from patients with ALL, in the D0 and D35 moments, and to correlate the results with clinical data of the patients. In other studies, the relationship of TLRs with processes that can induce carcinogenesis, as well as TLR's association with a worse prognosis, has already been identified. We have demonstrated through this study the presence of such receptors in leukemic blasts in both moments, and it was also observed an increase in the expression of TLR2 and TLR4 receptors between D0 and D35 moments, a feature mainly observed in patients from the high risk group. Another remarkable result was the greatest expression of TLR4 in patients with phenotype associated with high risk for ALL. Despite of the already obtained results, it is still necessary clarify the relationship between TLRs and cancer, once many of TLRs' activation effects lead either to pro-tumoral or to anti-tumoral pathways.

Keywords: Toll-Like Receptors (TLRs), Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), Pediatric Tumors, Acute Leukemia, Childhood Cancer.

INTRODUÇÃO

O câncer infantil representa cerca de 0,5 a 3% de todas neoplasias da população em geral sendo sua incidência maior no sexo masculino. Os tumores infantis crescem rapidamente e são mais invasivos do que as neoplasias adultas, entretanto tendem a responder melhor aos tratamentos e são considerados de bom prognóstico. Dentro desse grupo, a leucemia linfóide aguda (LLA) é o tipo mais comum de neoplasia infantil chegando a 79% de todos os casos de leucemias e cerca de um terço de todas as neoplasias malignas da criança¹.

Leucemias agudas são neoplasias primárias de medula óssea caracterizadas por formarem um grupo heterogêneo de doenças nas quais existe a substituição dos elementos medulares e sanguíneos normais por células imaturas ou diferenciadas, denominadas blastos, bem como acúmulo destas células em outros tecidos². Atualmente, o diagnóstico para LLA integra características morfológicas, citoquímicas, imunofenotípicas e citogenéticas como detalhado pela classificação de neoplasias linfóides em 2008 pela organização mundial de saúde³.

A avaliação morfológica do aspirado de medula óssea ou biópsia, ainda hoje, representa o primeiro passo no diagnóstico, para primeiramente diferenciar a LLA da LMA⁴. O critério para diagnóstico de LLA é a presença de 25% de blastos na contagem diferencial das células nucleadas na medula óssea. Entretanto, essas avaliações são limitadas para o diagnóstico preciso do tipo de LLA, uma vez que a partir do ponto de vista morfológico não é possível distinguir entre linhagem B ou T. Com a aplicação da técnica de Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo (IMF) foi possível contornar esse problema, uma vez que, se possibilitou identificar os antígenos de superfície, intracitoplasmáticos e nucleares pelo uso de anticorpos monoclonais específicos (AcMo), além de caracterizar as células leucêmicas quanto a sua origem e grau de diferenciação⁵.

Grandes avanços tem sido alcançados na sobrevivência de crianças e adolescentes com câncer. Entre 1975 e 2010 a mortalidade decorrente do câncer infantil diminuiu por mais de 50%^{6,7}. Para LLA a taxa de sobrevivência de 5 anos aumentou nesse mesmo período de 60% para aproximadamente 90%, para crianças com menos de 15 anos, e de 28% para mais de 75%, para adolescentes entre 15 e 19 anos de idade^{6,8}. Todavia, apesar dos tratamentos atuais terem alta efetividade, existe a possibilidade de ocorrer resistência à quimioterapia e além disso os efeitos colaterais tardios consequentes da terapia causam déficit de crescimento, distúrbios relacionados à insuficiência cardíaca e danos neurocognitivos⁹.

A quimioterapia é o principal tratamento dos pacientes com leucemia¹⁰, com o objetivo de eliminar as células leucêmicas utilizando compostos químicos combinados ou isolados. O uso de fármacos isolados demonstrou ser um método ineficaz em induzir respostas significativas, na maioria dos tumores, sendo atualmente de uso muito restrito. A poliquimioterapia faz uso de diferentes combinações de quimioterápicos de eficácia comprovada e tem como objetivo atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular através da ação sinérgica das drogas. Essa estratégia terapêutica promove uma maior resposta por dose administrada, ao mesmo tempo que ameniza os efeitos colaterais das drogas, e diminui o desenvolvimento de resistência¹¹.

Mesmo com todos os avanços da farmacoterapia, a multirresistência atinge um número significativo de pacientes que, por não apresentarem evolução no quadro clínico em resposta ao uso dos agentes terapêuticos, se encontram em uma situação ainda mais vulnerável¹². As células tumorais podem apresentar uma resistência inerente ou adquirida, a qual pode existir para qualquer tipo de fármaco e ser desencadeada por vários mecanismos, que podem atuar individual ou sinergicamente¹³.

Nesse contexto, a busca de terapias-alvo para o tratamento de leucemias pediátricas envolve a identificação e a caracterização de novos agentes moduladores da sinalização como possíveis compostos antitumorais. Alguns desses alvos emergentes tem sido objeto de investigação em nosso grupo de pesquisa.

A primeira evidência de um efeito antitumoral a partir da ativação do sistema imune por agentes infecciosos foi obtida no início do século XVIII, quando mostrou-se que infecções em pacientes com câncer podem ter levado à remissão de malignidades¹⁴. William B Coley, um cirurgião de Nova Iorque observou que injeções repetidas de uma mistura de toxinas bacterianas atuaram como um eficiente agente antitumoral¹⁵. Mais tarde com a descoberta dos *Toll-like receptors* (TLRs), dos seus ligantes e de suas vias, foi demonstrado que fatores derivados de microrganismos agem estimulando TLRs, os quais sinalizam e ativam respostas imune adaptativa e inata, potencializando a imunidade antitumoral¹⁶.

Receptores do tipo Toll, do inglês, *Toll-like receptors* (TLR), são receptores que pertencem a uma família de receptores evolutivamente conservados, que são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a organismos patogênicos, do inglês, *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), e de padrões moleculares associados ao dano, do inglês, *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Atualmente, 13 membros de TLRs foram identificados em humanos e em ratos e sendo que todos eles apresentam pequenas diferenças nas cadeias de aminoácidos que compõem as proteínas que os formam. Por causa

dessas diferenças nas estruturas das sequências proteicas, cada TLR é capaz de reconhecer classes diferentes de moléculas biológicas presentes em diversos microrganismos como, por exemplo, LPS, lipoproteínas, flagelina, peptidoglicana e DNA^{17,18}. Quanto a sua localização, sabe-se que existem 11 tipos de TLRs expressos em humanos na superfície da membrana celular ou em endossomos. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são expressos na superfície da membrana celular, enquanto que as formas TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão presentes no interior de endossomos¹⁹. O reconhecimento de uma gama de estruturas moleculares de organismos microbiológicos pelos TLRs leva a ativação de uma cascata de sinalização intracelular, a qual induz a ativação de genes envolvidos na defesa contra organismos patogênicos, que codificam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias²⁰. Entretanto, fatores necessários para combater infecções e controlar a homeostase fisiológica, tais como a resposta imune e a inflamação, constituem também fatores envolvidos no desencadeamento de processo de carcinogênese. A reação inflamatória se destaca pois parece ser capaz de afetar todas as fases do desenvolvimento tumoral, incluindo a iniciação do tumor, a promoção, a invasão e a disseminação de metástases. Notavelmente, todas as etapas ocorrem sem que o sistema imune sinalize uma resposta adequada, da forma que geralmente responde em frente a um processo reconhecido como nocivo²¹.

O ponto-chave dessa resposta atípica ao processo inflamatório em células tumorais está no fato de que a inflamação age como um estressor celular, levando ao dano do DNA ou a instabilidade epigenética. Ambas as vias intrínseca e extrínseca agem como fatores carcinogênicos, sendo que a via intrínseca conduz principalmente a mutações que levam a ativação de oncogenes, bem como inativação de genes supressores tumorais²².

O microambiente tumoral associado ao processo de inflamação induz um mecanismo específico nas células tumorais, que faz com que o sistema imune tolere o crescimento dessas células e a formação de metástases. Dessa forma, o sistema imune é incapacitado a agir contra. Além disso, estudos têm mostrado que a ativação do TLR4 sinaliza através de vias que promovem a invasão do tumor, resistência à apoptose, resistência à quimioterapia, progressão tumoral e metástase^{23,24}.

Em câncer colorretal, os receptores TLR2 e TLR4, que normalmente regulam a inflamação, quando presentes de forma elevada^{25,26} podem levar a, no mínimo, uma inflamação crônica. Esse processo crônico possivelmente está correlacionado ao início do desenvolvimento tumoral e à posterior transformação em tumores mais agressivos²⁷. A via que conduz à capacidade aprimorada do tumor em adquirir um comportamento metastático ainda permanece

não esclarecida, porém sabe-se que em algumas neoplasias, um dos fatores é a superexpressão do TLR4²⁸.

Contudo, a sinalização mediada pelos TLR é dirigida ora para supressão de células de tumor, ora para bloqueio de mecanismos pró-apotóticos. Essa resposta é dependente do contexto e influenciada por muitos fatores intra e extracelular, tais como os tecidos envolvidos, microambiente envolvente, fundo genético e estágio de desenvolvimento do tumor. No entanto, para a descrição mais detalhada das vias, ainda são necessários mais estudos²⁴.

Nos últimos anos, tem se estudado incansavelmente os mecanismos relacionados à carcinogênese com ênfase no envolvimento do sistema imune. Os TLRs têm sido revelados como fatores centrais, devido aos seus efeitos antitumorais, como o aumento da resposta *downstream* da produção de citocinas inflamatórias. Apesar do fato que as células tumorais têm a capacidade de burlar o sistema imune, quando o mesmo é capaz de as reconhecer por meio de células apresentadora de antígenos (APC), como as células dendríticas, é dado início à uma resposta antitumoral com um grande potencial de eficácia^{29,30}. Esse efeito foi observado num estudo em modelo de câncer de mama em camundongos, que analisou a atividade do TLR4. Nesse estudo, a administração de um agonista do TLR4, Immunomax®, resultou na melhora da capacidade anti-tumoral de células natural killer (NK)³¹.

Entretanto, como já mencionado, as células tumorais produzem sinais inibitórios capazes de bloquear o seu reconhecimento pelas células que formam a primeira linha de defesa imune, levando a uma tolerância imunológica que facilita a progressão tumoral³². Ainda são necessários estudos para elucidar o papel dos TLRs como agentes antitumorais, bem como o mecanismo pelo qual as células tumorais conseguem se sobressair sobre o sistema imune.

A associação dos TLRs com a ativação de mecanismos que propiciam a carcinogênese, bem como processos que levam a uma maior malignidade do tumor, têm sido estudados com mais entusiasmo. A partir dessas abordagens se observou não só o processo de inflamação, já revelado bastante envolvido no processo de transformação maligna, mas também outros efeitos característicos que levam a esse processo, tais como ativação de mecanismos anti-apoptóticos, sinais que aumentam o processo proliferativo (desequilibrado) e processo fibrogênico, tanto nas células tumorais, ou pré-malignas, quanto no microambiente tumoral³³. Nesse contexto, um segundo padrão de resposta foi analisado na ativação de TLR4, pelo qual se observou que a sinalização através de TLR4, além de inibir, levou ao crescimento do tumor e à formação de metástases, através de vias que aumentam a angiogênese, a permeabilidade vascular e a posterior invasão^{34, 35}.

A ativação dos TLRs tem sido estudada não só através da análise desse receptor, mas também das moléculas adaptadoras que compõem as cascatas de sinalização intracelular e por qual tipo de molécula o TLR é ativado³⁶. Muitos estudos têm mostrado que a via *downstream*, que tem como molécula adaptadora o MyD88, parece estar muito associada à resposta que promove a carcinogênese³⁷. Esse efeito foi observado em um estudo no qual, após a deleção do gene do Myd88, se obteve uma depleção da ativação do TLR4, posteriormente reduzindo o desenvolvimento do câncer colorretal.^{38,39}

O efeito global dessa sinalização é a regulação positiva de diversos fatores de transcrição, que leva à produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias com capacidade pró tumoral (IL-1 β , TNF- α , IL-6). A atividade dessas moléculas pró-inflamatórias depende do NF- κ B, importante fator de transcrição envolvido nos processos de sobrevivência celular, inflamação, resposta imune e bloqueio da apoptose^{40,41}.

Em outros estudos verificou-se que pacientes com mieloma múltiplo (MM) desenvolveram uma alta expressão de receptores TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9⁴². Além disso, ao analisar dados clínicos desses pacientes juntamente com análises de microarranjo, foi observado que a superexpressão de TLR4 estava associada a um pior prognóstico⁴³. Ainda existem poucos estudos com TLRs e leucemias. Ainda assim, um estudo revelou a expressão de células B precursoras de leucemia linfóide aguda (CBP-LLA). Esse trabalho demonstrou que existe a expressão de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 e TLR9 mas, no entanto, não se sabe se a expressão elevada de TLR3, TLR4 e TLR5, encontrada em algumas amostras, ocorre como consequência da malignidade tumoral ou representa um fenótipo^{44,45}. Além disso, a ativação dos receptores TLR2 e TLR9 mostrou melhorar a resposta imune, por ativar linfócitos T através da produção de IFN- γ ^{46,47}. Por outro lado, a taxa de renovação celular das CBP-LLA não se alterou na presença de ligantes para TLR2, TLR7 e TLR9, apesar de mudança na expressão de marcadores de superfície celular^{47,48}.

MATERIAIS E MÉTODOS

Critérios de Inclusão de Pacientes

Pacientes pediátricos (zero a 18 anos) diagnosticados com LLA no Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, foram incluídos no estudo mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente e/ou seu responsável. Para realização dos experimentos, 26 pacientes foram analisados em seus momentos D0 e D35.

Coleta de Sangue e Medula Óssea

As coletas de sangue periférico e medula óssea dos pacientes foram realizadas apenas quando solicitadas pelo serviço médico, para avaliação de parâmetros clínicos do paciente, minimizando assim possíveis riscos e desconfortos. Estas avaliações acontecem, geralmente, no momento do diagnóstico (antes do início do tratamento, dia zero; D0) e após o início do tratamento, nos dias 14 (D14), dia 28 (D28) e dia 35 (D35). O momento D35 corresponde ao final do término da indução (primeira fase do tratamento de quimioterapia para LLA). Neste período pode se verificar se o paciente reagiu ao tratamento, analisando a presença da doença residual mínima (DRM).

Estima-se que todos os pacientes que coletarem ao diagnóstico passarão pelas próximas etapas de coleta, entretanto esse não é um critério de exclusão, qualquer paciente diagnosticado com LLA, poderá ser eletivo para o estudo independente do momento que for incluído, completando os pacientes do seu grupo.

Foram coletados 4 mL de sangue periférico e/ou 4mL de medula óssea em tubos a vácuo com EDTA para posterior processamento no Laboratório de Câncer e Neurobiologia. Após a coleta no tubo, é separado um volume da amostra (cerca de 300 μ L) em um tubo *ependorf* de 1,5 mL o qual é destinado para extração de RNA total, sendo o volume restantes utilizado para análises de outros parâmetros.

Extração de RNA total

Para a extração de RNA total foi utilizado o kit *PureLink® RNA Mini Kit, Life Technologies®*. Os reagentes que compõe o kit são: tampão de lise, tampões de lavagem I e II, RNase livre de água, filtros, tubos *ependorfs* e tubos de spin. O processo de extração de RNA total é constituído de inúmeras etapas, sendo a primeira dela a lise celular para posterior liberação do material citoplasmático e também do interior do núcleo. Nesta etapa o constituinte principal do tampão de lise, o isotiocinato de guanidina promove a lise celular. Após essa primeira fase é feita uma centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos para precipitar o material mais pesado (proteínas e outras partículas), e deixar no sobrenadante o material mais leve (RNAs e DNA). As etapas seguintes consistem em separar o RNA total desse material que estava no sobrenadante, através das etapas de lavagens posteriores com os tampões utilizando o tubo de spin com filtro em múltiplas centrifugações. Nessas etapas é eluído o DNA e outras partículas contaminantes, permanecendo no tubo de spin (no filtro) o RNA total. A última etapa consiste na eluição do RNA total do tubo de spin com a RNase livre de água para um tubo *ependorf* para posterior armazenamento a -80°C, tratamento com DNase, quantificação no Nanodrop® e processamento do cDNA.

Expressão do RNAm pela técnica de RT-PCR

O RNA total proveniente da extração foi quantificado utilizando o equipamento NanoDrop®1000 nas absorvâncias de 260 e 280nm. Essas absorvâncias são escolhidas pois elas permites quantificar o RNA presente na amostra e também permites de certa forma caracterizar o material presente de acordo com a presença de contaminantes (DNA e proteínas).

Para a reação de transcriptase reversa, 0,5 µg de RNA de cada amostra foi homogeneizado ao SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen), conforme o procedimento descrito pelo fabricante.

O RNA mensageiro (mRNA) foi amplificado usando os *primers* de β-actina, TLR2, TLR3 e TLR4 (todas as sequências foram desenhadas de acordo com Gen Bank). As sequências dos *primers* utilizados são: β-actina, 5' -AAACTGGAACGGTGAAGGTG- 3' (*forward*) e 5' -AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT- 3' (*reverse*); TLR2, 5' -ATTGTGCCCATTTGCTCTT- 3' (*forward*) e 5' - CTGCCCTTGCAGATACCATT- 3' (*reverse*); TLR3, 5' -

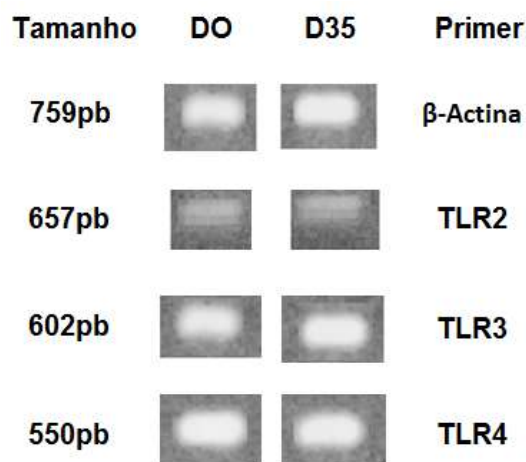
TTCCAGAGCCGTGCTAAGTT- 3' (*reverse*) e 5' - AGCCTTCAAGCACTGATGCT- 3' (*forward*); TLR4, 5' - CAGGGCTTTTCTGACTCGTC- 3' (*reverse*) e 5' - TGAGCAGTCGTGCTGGTATCC- 3' (*forward*). A expressão de β -actina foi utilizada como um controle interno.

Todas amostras foram constituídas de um volume total final de 15 μ l usando 35 ciclos para amplificação que consistirão em 1 min a 95°C, desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 60°C por 30s, e extensão dos *primers* a 72°C por 45s, seguido por uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da reação de PCR foram aplicados no gel de agarose 1% seguindo a técnica de eletroforese. A corrida de eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%, contendo GelRed TM 10X (Biotium, USA) e visualizado em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi confirmado usando Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e a expressão relativa de cada primer determinada por densitometria usando o software *ImageJ* 1.45 para Windows®.

RESULTADOS

Os 26 pacientes diagnosticados com LLA, pela equipe médica do serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que foram incluídos no estudo, todos apresentaram expressão gênica para os receptores testados, tanto no momento D0, quanto no momento D35.

Figura 1. Reação de RT-PCR apresentou expressão dos RNAm β -actina, TLR2, TLR3 e TLR4 em ambos momentos D0 e D35 por RT-PCR. Os produtos do PCR medem 759pb, 657pb, 602pb, 550pb



Fonte: Autor, 2015.

Os 26 pacientes foram distribuídos em grupos e/ou em blocos de tratamento em relação a classificação de risco da doença, de acordo com critérios médicos e características do paciente. Os grupos de classificação são de risco baixo, intermediário e alto; sendo que os grupos baixo e alto têm mais duas subclassificações as quais não serão utilizadas. Os pacientes foram colocados em grupo em relação ao seu risco, uma vez que foi utilizada a mesma classificação do serviço médico. Dos 26 pacientes, 16 estão no grupo de alto risco, 6 estão do grupo intermediário e 4 no grupo de baixo risco. Além dessa classificação, separamos os pacientes de acordo com a linhagem celular (B ou T). Dentre os 26 pacientes, 21 são de linhagens de células B e 5 pacientes de linhagem células T, dos quais 4 estão no grupo de alto risco, padrão este verificado na literatura.

DISCUSSÃO

A interação entre os tumores e o seu microambiente tumoral, e porque não dizer também imunológico, é complexo e difícil de decifrar, mas a sua compreensão é de suma importância para o desenvolvimento de novos marcadores de prognóstico e estratégias terapêuticas. As células tumorais desenvolvem sistemas de autorregulação e também de proteção, se sobressaindo sobre o sistema imunológico. Esse mecanismo anti-imunogênico é a chave para compreender o microambiente tumoral e imunológico e também para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas na imunoterapia.

Não só a presença de certos TLRs em câncer confere um pior prognóstico, mas também toda a maquinaria de moléculas adaptadoras que participam da resposta intracelular desses receptores está envolvida, bem como suas respostas extracelulares. Dentre as respostas celulares, observa-se que, a partir da ativação dos TLRs, há uma consequente resposta inflamatória e imunológica, assim como mecanismos que promovem angiogênese, proliferação, permeabilidade e sobrevivência celular. O efeito global dessa ativação favorece a invasão tecidual, a formação de metástases e a criação de um microambiente tumoral ideal, propiciando condições para a expansão do tumor. Além disso, a própria reação inflamatória causada pela via ativada por TLRs é um fator que aumenta a lesão tecidual, uma vez que as células saudáveis são destruídas e as células tumorais parecem ser mais imunes a esse processo.

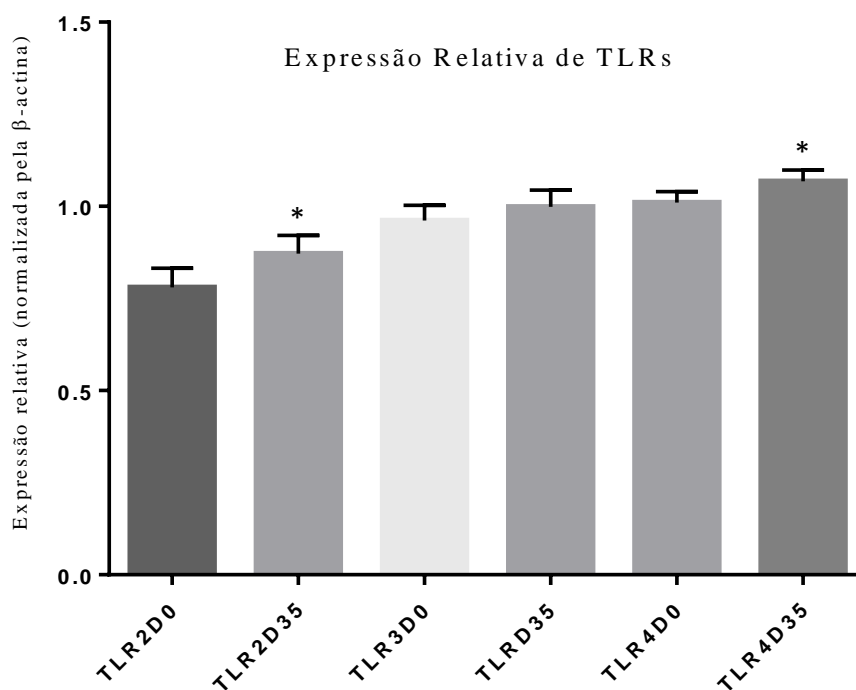
Ainda não estão esclarecidos por quais mecanismos os TLRs promovem o crescimento celular e a própria diferenciação celular, processos que ocorrem em células de origens linfóide

e mieloide. Ademais, não se sabe descrever qual a diferença desses mecanismos em células normais e em células tumorais.

Ao avaliar a expressão de TLR2, TLR3 e TLR4, em valores absolutos, verificamos que houve um aumento dos valores da média e da mediana da expressão relativa desses receptores em relação aos momentos D0 e D35. Esse aumento não foi considerado estatisticamente significativo. Entretanto, em relação ao TLR2, verificou-se que esse aumento foi menor nos pacientes incluídos no grupo de alto risco do que naqueles que compõem os grupos de baixo risco e intermediário ($p < 0,05$). Quanto ao TLR4, foi encontrada uma relação em que o aumento da expressão foi maior nos pacientes dos grupos de risco intermediário e alto do que no grupo de baixo risco ($p < 0,05$). Teste *Chi-Quadrado*. A respeito do momento D35, mostrou-se uma correlação entre os valores da expressão relativa do TLR4, isto é, valores acima do que a mediana desse grupo (expressão de TLR4 no momento D35) e a linhagem celular ou o tipo de LLA que confere uma característica de pior prognóstico, isto é, a característica que é utilizada para definição do grupo de risco da LLA ($p < 0,05$). Teste de correlação de Pearson

Por outro lado, ao analisar os valores de expressão dos receptores corrigidos pela β -actina, foi observado uma diferença na expressão dos TLR entre os momentos D0 e D35, apenas para os TLR2 e TLR4 ($p < 0,05$). Teste de Wilcoxon.

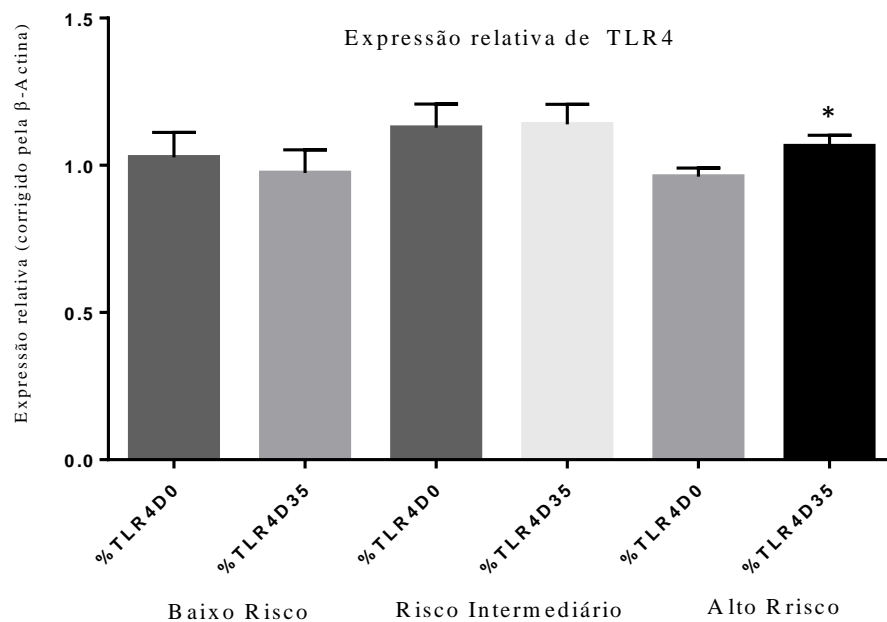
Figura 2. O gráfico mostra a média em valores corrigidos pela β -actina dos TLRs nos momentos D0 e D35. * Houve diferença estatística entre os momentos D0 e D35.



Fonte: Autor, 2015.

Em relação ao TLR4, quando realizada uma análise por grupos de risco, baixo, intermediário e alto; foi observado que há diferença da expressão deste receptor entre os momentos, isto é, foi observado um aumento da expressão entre momentos D0 e D35 ($p < 0,05$). Teste *T Student*.

Figura 3. Gráfico da expressão relativa de TLR4 corrigida pela β -actina do TLR4 entre os momentos D0 e D35 por grupo de risco, baixo, intermediário e alto. * Houve um aumento da expressão de TLR4 entre D0 e D35 nos pacientes do grupo de alto risco.



Fonte: Autor, 2015.

CONCLUSÕES

Esse trabalho revelou que pacientes diagnosticados com LLA apresentam expressão de TLR2, TLR3 e TLR4, entretanto, não podemos afirmar se essa expressão está aumentada em comparação a células normais. Além disso, não podemos afirmar se os TLRs ativam vias que promovem resistência ao tratamento, bem como não podemos demonstrar uma relação entre a expressão dos TLRs e o fenótipo da leucemia. É importante a realização de um estudo a longo prazo, onde será necessário aumentar o número de amostra, bem como analisar outros momentos do tratamento além de D0 e D35.

Esse estudo foi notável ao evidenciar o aumento da expressão dos TLR2 e TLR4 em relação aos momentos D0 e D35, e também revelou sua importância ao demonstrar a correlação entre a expressão de TLR4 e o fenótipo de LLA incluído no grupo de alto risco. Não há como dizer se o tratamento farmacológico interferiu no padrão de expressão gênica. Embora tenha se observado um aumento da expressão de TLRs, esse aumento não foi significativo o suficiente para justificar uma conclusão estatisticamente confiável.

PERSPECTIVAS

Ainda se faz necessária a realização de mais estudos para compreender o papel do TLRs nas leucemias pediátricas, bem como se sua presença (elevada ou não) acarreta em um fenótipo diferenciado. Além disso é importante realizar uma análise da expressão gênica destes TLRs em células normais de indivíduos saudáveis para introduzir um grupo controle negativo mais representativo, afim de que seja possível fazer um estudo de comparação entre as expressões em indivíduos saudáveis e pacientes com LLA. É fundamental a realização de um estudo a longo prazo, onde será necessário aumentar o número de amostra, verificar se TLRs ativam mecanismos de resistência, e investigar se existe algum mecanismo de ação que leve a uma resposta antitumoral de relevância clínica, por meio de agonistas ou antagonistas, bem como analisar outros momentos do tratamento além de D0 e D35.

REFERÊNCIAS

1. Pui CH, Robison LL, Look AT, *et al.* Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;71:1030–1043.
2. Tosi S, Mostafa KY, Owoka T, *et al.* Paediatric acute myeloid leukaemia with the t(7;12)(q36;p13) rearrangement: a review of the biological and clinical management aspects. *Biomark Res*. 2015; 5;3:21.
3. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leucemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114: 937-951.
4. Lai R, Hirsch-Ginsberg CF, Bueso-Ramos C, *et al.* Pathologic diagnosis of acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000;14:1209–1235.
5. Zago MA, Falcão R, Covas D T. *Tratado de Hematologia*. 2013; Rio de Janeiro: Ed. Atheneu.
6. Smith MA, Altekruse SF, Adamson PC, *et al.* Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer*. 2014;120 (16): 2497-506.
7. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, *et al.* eds. *SEER Cancer Statistics Review, 1975 – 2010*. Bethesda, MD, 2013; National Cancer Institute.
8. Hunger SP, Lu X, Devidas M, *et al.* Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2012; 30 (14): 1663-1669.
9. Corrigan JJ, Feig SA. American Academy of Pediatrics: Guidelines for pediatric cancer centers. *Pediatrics*. 2004, 113 (6): 1833-1835.

10. ABRALE. Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. Leucemia Mieloide Crônica. [2015]. Disponível em:< <http://www.abrale.org.br/pagina/leucemia-mieloide-cronica-lmc>>. Acesso em 10 de out. de 2015.
11. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Quimioterapia. 2015. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em 10 de out. de 2015.
12. Milani. R. Mapeamento de vias de sinalização envolvidas na resistência de células leucêmicas a quimioterápicos: uma abordagem computacional. 2013. Disponível em: < <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/112935/mapeamento-de-vias-de-sinalizacao-envolvidas-na-resistencia-de-celulas-leucemicas-a-quimioterapicos-/>>. Acesso em 10 de out. de 2015.
13. Santos, DNS. Células estaminais do cancro do endométrico. 2012.111f. - Universidade de Coimbra (Dissertação de Mestrado) – Coimbra. Disponível em:< <http://hdl.handle.net/10316/22663>>. Acesso em 10 de out. de 2015.
14. Garay RP, Viens P, Bauer J, *et al.* Cancer relapse under chemotherapy: why TLR2/4 receptor agonists can help. *Eur J Pharmacol.* 2007; 563: 1-17.
15. Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther.* 1994; 64: 529-564.
16. de Kivit S, Tobin MC, Forsyth CB, *et al.* Regulation of intestinal immune responses through TLR activation: implications for pro and prebiotics. *FrontImmunol.* 2014; 5:60.
17. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O, *et al.* Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124: 783-801.
18. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004; 16: 3-9.
19. Li X, Jiang S, Tapping RI, *et al.* Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine.* 2010; 49:1-9.

20. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11(5):373–384.
21. Sipos F, Fűri I, Constantinovits M, *et al.* Contribution of TLR signaling to the pathogenesis of colitis-associated cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 28;20(36):12713-21..
22. Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology.* 2011; 140: 1807-1816.
23. Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, *et al.* Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res.* 2009; 69:3105–13.
24. Basith S, Manavalan B, Yoo TH, *et al.* Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Arch Pharm Res.* 2012; 35: 1297-1316.
25. Ridnour LA, Cheng RY, Switzer CH, *et al.* Molecular pathways: toll-like receptors in the tumor microenvironment--poor prognosis or new therapeutic opportunity. *Clin Cancer Res.* 2013; Mar 15;19(6):1340-6
26. Sato Y, Goto Y, Narita N, *et all.* Cancer cells expressing toll-likereceptors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2009 .2: 205–14.
27. Lu Q, Ding H, Li W, *et al.* Role of toll-like receptors in microbiota-associated gastrointestinal câncer metastasis. *J Cancer Res Ther.* 2013; 9:S142–9.
28. So EY, Ouchi T. The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci* 2010; 6: 675-681.
29. Garaude J, Kent A, van Rooijen N, *et al.* Simultaneous targeting of toll- and nod-like receptors induces effective tumor-specific immune responses. *Sci Transl Med.* 2012; 4: 120-126.

30. Drobits B, Holcman M, Amberg N, *et al.* Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest.* 2012; 122: 575-585.
31. Anahit G, Pichugin A, Bagaev A, *et al.* Targeting TLR-4 with a novel pharmaceutical grade plant derived agonist, Immunomax®, as a therapeutic strategy for metastatic breast cancer. *Journal of Translational Medicine.* 2014,12:322.
32. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH, *et al.* Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell.* 2010; 140: 859-870.
33. Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF, *et al.* The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene.* 2014; 33: 3485-3495.
34. Abubakr Ahmed, H. Paul Redmond, Jiang Huai Wang, *et al.* Links between Toll-like receptor 4 and breast cancer. *Oncoimmunology.* 2013; 1; 2(2).
35. Sanjay P, Saurabh S, Vandana A, *et al.* *Pattern Recognition Receptors in Cancer Progression and Metastasis. Cancer Growth Metastasis.* 2015; 8: 25–34.
36. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, *et al.* IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell.* 2009; 15: 103-113.
37. Fukata M, Shang L, Santaolalla R, *et al.* Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17: 1464-1473.
38. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science.* 2007; 317: 124-127.
39. Li Y, Kundu P, Seow SW, *et al.* Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APCMin/+ mice. *Carcinogenesis.* 2012; 33: 1231-1238.

40. Tukhvatulin AI, Gitlin II, Shcheblyakov DV, *et al.* Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF- κ B, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 2013; 81: 3855-3864.
41. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, *et al.* NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 1998; 281: 1680-1683.
42. Xu Y, Yun Zhao, Haiwen H, *et al.*, Expression and function of Tolllike receptors in multiple myeloma patients: Toll-like receptor ligands promote multiple myeloma cell growth and survival via activation of nuclear factor. *British Journal of Haematology.* 2010; 150(5):543–53.
43. Zhan F, Huang Y, Colla S, *et al.* The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006; 108:2020-2028.
44. Chiron D, Bekeredijan DI, Pellat DC, *et al.* Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B-cells. *Blood.* 2008; 12:2205–2213.
45. Iacobucci I, Papayannidis C, Lonetti A, *et al.* Cytogenetic and molecular predictors of outcome in acute lymphocytic leukemia: recent developments. *Current Hematologic Malignancy Reports.* 2012; 7:133–43.
46. Pui CH, Evans WE, *et al.* Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006; 354:166–178.
47. Corthals SL, Wynne K, She K, *et al.* Differential immune effects mediated by Toll-like receptors stimulation in precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology.* 2006; 132: 452–458.
48. Reid GSD, She K, Terrett L, *et al.* CpG stimulation of precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia induces a distinct change in costimulatory molecule expression shifts allogeneic T cells toward a Th1 response. *Blood.* 2005; 105:3641–3647.

6 BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

ABRALE. Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. **Leucemia Linfóide Crônica**. 2015. Disponível em: <<http://www.abrale.org.br/pagina/leucemia-linfoide-cronica-llc>>. Acesso em 10 de out. de 2015.

ABRALE. Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. **Leucemia Mieloide Crônica**. [2015]. Disponível em: <<http://www.abrale.org.br/pagina/leucemia-mieloide-cronica-lmc>>. Acesso em 10 de out. de 2015.

AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI. **O Pathogen recognition and innate immunity**. Cell.124:783-801, 2006.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Do we know what causes chronic lymphocytic leukemia?** 2015. Disponível em :< <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-chroniclymphocyticll/detailedguide/leukemia-chronic-lymphocytic-what-causes>>. Acesso em 10 de out. de 2015.

BEN-AMI O1, FRIEDMAN D, LESHKOWITZ D, *et al.* **Addiction of t(8;21) and inv(16) acute myeloid leukemia to native RUNX1**. Cell Rep. Sep 26; 4(6):1131-43, 2013.

BÉNÉ MC, NEBE T, BETTELHEIM P, *et al.* **Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European Leukemia Net**. Work Package 10. Leukemia;25:567-574, 2011.

BENE, M.C. AND J.S. KAEDA. **How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet.** *Haematologica.* 94(8): p. 1135-50, 2009.

BEZERRA, C. B. **Caracterização da leucemia linfóide aguda (LLA) em crianças e o papel da enfermagem no atendimento oncológico.** 34f. Trabalho de conclusão (Graduação em Enfermagem) – Fundação Universidade do Estado de Mato Grosso. Cáceres, 2013.

BHATIA S, LANDIER W, SHANGGUAN M, *et al.* **Nonadherence to oral mercaptopurine and risk of relapse in Hispanic and non-Hispanic white children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's oncology group.** *J Clin Oncol.*30(17):2094–101, 2012.

BISWAS S. K. & LOPEZ-COLLAZO E. **Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance.** *Trends Immunol* 30, 475–487, 2009.

BRACKETT J, SCHAFFER ES, LEUNG DH, *et al.* **Use of allopurinol in children with acute lymphoblastic leukemia to reduce skewed thiopurine metabolism.** *Pediatr Blood Cancer.* 61(6):1114–7, 2014.

BRÜGGEMANN M, SCHRAUDER A, RAFF T, *et al.* **Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008.** *Leukemia.*24(3):521–535, 2010.

CANCER RESEARCH. **About chemotherapy for chronic lymphocytic leukaemia (CLL).** [2015]. Disponível em: <<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/cll/treatment/chemotherapy/about-chemotherapy-for-chronic-lymphocytic-leukaemia>>. Acesso em 10 de out. de 2015.

CHANG ZL. **Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways**, *Inflamm. Res.* 59, 791-808, 2010.

CHIRON, D., BEKEREDIJAN-DING, I., PELLAT-DECEUNYNCK, C, *et al.* **Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B-cells**. *Blood*.12:2205–2213, 2008.

CONTER V, BARTRAM CR, VALSECCHI MG, *et al.* **Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study**. *Blood*.115:3206-14, 2010.

CORRIGAN JJ, FEIG SA. **American Academy of Pediatrics: Guidelines for pediatric cancer centers**. *Pediatrics* 113 (6): 1833-5, 2004.

DA ANUNCIACÃO SF, ELIAS LFQ, GUIMARÃES DC, *et al.* **Aspectos diagnósticos da leucemia mielóide crônica e detecção de doença residual mínima**. *Goiânia*, v. 35, n. 11/12, p. 1069-1083, nov./dez. 2008.

D'ONOFRIO G, ZINI G, BAIN BJ. **Morphology of Blood Disorders**, 2^a Edição. Wiley-Blackwell. ISBN: 978-1-118-44260), 2014.

FRAZÃO, JB, ERRANTE, PR, CONDINO-NETO, A. **Toll-like Receptors Pathway Disturbances are Associated with Increased Susceptibility to Infections in Humans**. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 61:427-443, 2013.

GANGLOFF M. **Different dimerization mode for TLR4 upon endosomal acidification?**

Trends Biochem Sci., 37, 92-98, 2012.

GAYNON PS, ANGIOLILLO AL, CARROLL WL, *et al.* **Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983–2002: a Children's Oncology Group Report.** Leukemia 24: 285–297, 2010.

GERR H, ZIMMERMANN M, SCHRAPPE M, *et al.* **Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations.** Br J Haematol149(1):84–92, 2010.

GILLET. J.P., GOTTESMAN M.M. **Multi-Drug Resistance in Cancer.** 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-60761-416-6>>. Acesso em 15 de out. de 2015.

GLUNDE K, BHUJWALLA ZM, RONEN SM. **Choline metabolism in malignant transformation.** Nat Rev Cancer.11: 835-848, 2011.

GOLDIE J, COLDMAN A. **The genetic origin of drug resistance in neoplasms: Implications for systemic therapy.** Cancer Res; 44:3643-53, 1984.

GREAVES MF, WIEMELS J. **Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia.** Nat Rev Cancer 3 (9): 639-49, 2003.

RUBER, F., MUSTJOKI, S. AND PORKKA, K. **Impact of tyrosine kinase inhibitors on patient outcomes in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia.** British Journal of Haematology.145: 581–597, 2009.

HAMERSCHLAK, N. **As Leucemias no Brasil**. Revista Onco&. Ano 3nm.14.p. 20-23, nov/dez 2012.

HARSINI, SARA *et al.* **Toll-like receptors in lymphoid malignancies: Double-edged sword**. Critical Reviews in Oncology / Hematology. Volume 89.Issue 2, 262 – 283, 2014.

HEALY J, BÉLANGER H, BEAULIEU P, *et al.* **Promoter SNPs in G1/S checkpoint regulators and their impact on the susceptibility to childhood leukemia**. Blood.109: 683–92, 2007.

HEHLMANN R, HOCHHAUS A, BACCARANI M. **Chronic myeloid leukaemia**. European LeukemiaNet .vol 370, No. 9584, p342–350, 28 July 2007.

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

HOWLADER N, NOONE AM, KRAPCHO M, *et al.*, eds. **SEER Cancer Statistics Review, 1975 – 2010**. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2013.

HUA K, YANG W, SONG H, *et al.* **Up-regulation of miR-506 inhibits cell growth and disrupt the cell cycle by targeting YAP in breast cancer cells**. Int J Clin Exp Med. Aug 15;8(8):12018-27, 2015.

HUNGER SP, LU X, DEVIDAS M, *et al.* **Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group**. J Clin Oncol 30 (14): 1663-9, 2012.

ILYAS, A. M. *et.al.* **Next Generation Sequencing of Acute Myeloid Leukemia: Influencing Prognosis.** 2015.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **A Situação do Câncer no Brasil - Leucemia.**2015
Disponível em: < www.inca.gov.br >. Acesso em 15 de out. de 2015.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Condutas do Inca: Leucemia Mieloide Crônica.** Revista Brasileira de Cancerologia. 49(1):5-8, 2007.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil.** 2015.
Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em 15 de out. de 2015.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Leucemias Agudas na Infância e Adolescência.** Revista Brasileira de cancerologia. 47(3):245-57, 2001.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Quimioterapia.** 2015. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em 15 de out. de 2015.

IRVING J, JESSON J, VIRGO P, *et al.* **Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting.** Haematologica. 94(6):870-4, 2009.

KAWAI T, AKIRA S. **Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity.** Immunity. 34:637–650, 2011.

Kumar H, Kawai T, Akira S. **Toll-like receptors and innate immunity.** Biochem Biophys Res Commun. 30;388(4):621-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.062, 2009.

LAI R, HIRSCH-GINSBERG CF, BUESO-RAMOS C. **Pathologic diagnosis of acute lymphocytic leukemia.** *Hematol Oncol Clin North Am*14:1209–1235, 2000.

LI T.T, OGINO S, QIAN Z.R. **Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: Carcinogenesis to cancer therapy.** *World J. Gastroenterol.* 20:17699–17708, 2014

LI X, JIANG S, TAPPING RI. **Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival.** *Cytokine.* 49:1-9, 2010.

LI Y, SCHWAB C, RYAN SL, *et al.* **Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia.** *Nature* 508 (7494): 98-102, 2014.

LIU GJ, CIMMINO L, JUDE JG, *et al.* **Pax5 loss imposes a reversible differentiation block in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia.** *Genes Dev.*28:1337-50, 2014.

MATLOUB Y, LINDEMULDER S, GAYNON PS, *et al.* **Intrathecal triple therapy decreases central nervous system relapse but fails to improve event-free survival when compared with intrathecal methotrexate: results of the Children's Cancer Group (CCG) 1952 study for standard-risk acute lymphoblastic leukemia, reported by the Children's Oncology Group.** *Blood.* 108(4):1165–73, 2006.

MAZLOUMI SH, MADHUMATHI DS, APPAJI L, PRASANNAKUMARI. **Combined study of cytogenetics and fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) in a tertiary cancer centre in South India.** *Asian Pac J Cancer Prev.*13(8):3825-7, 2012.

MELO JV, HUGHES TP, APPERLEY JF. **Chronic myeloid leucemia.** *Hematology Am Soc Educ Program.* 132-152, 2003.

MEYER C, HOFMANN J, BURMEISTER T, *et al.* **The MLL recombinome of acute leukemias in 2013.** *Leukemia.* 27:2165-76, 2013.

MILANI. R. **Mapeamento de vias de sinalização envolvidas na resistência de células leucêmicas a quimioterápicos: uma abordagem computacional.** 2013. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/112935/mapeamento-de-vias-de-sinalizacao-envolvidas-na-resistencia-de-celulas-leucemicas-a-quimioterapicos/>>. Acesso em 10 de out. de 2015.

MORAES ACR, LICÍNIO MA, PAGNUSSAT L, *et al.* **Síndromes mielodisplásicas: aspectos moleculares, laboratoriais e a classificação OMS 2008.** *Rev Bras Hematol Hemoter.*31(6):463-70. 2009

MORESCO EM, LAVINE D, BEUTLER B. **Toll-like receptors.** *Curr Biol.*, 21, R488-R493, 2011.

MURPHY SL, XU J, KOCHANEK KD. **Deaths: final data for 2010.** *National Vital Statistics Reports*, Vol. 61, No. 4, May 8, 2013.

NCI. National Cancer Institute. **Leukemia.** 2013. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/publications/patient-education/leukemia.pdf>>. Acesso em 15 de out. de 2015.

PAES, ROBERTO A. PINTO, *et al* **Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide: proposta de padronização terminológica em língua portuguesa do grupo de hematopatologia da Sociedade Brasileira de Patologia.** *J. Bras. Patol. Med. Lab.* Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 237-239, 2001.

PARK BS, SONG DH, KIM HM, *et al.* **The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4 – MD2 complex.** *Nature* 458, 1191-1195, 2009.

PRESTON DL, KUSIMI S, TOMONAGA M, *et al.* **Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part IH. Leukemia, lymphoma and multiple mielome, 1950-1987.** *Radiat Res*; 137(2 Supple) S68-97, 1994.

PUI CH, EVANS WE. **Treatment of acute lymphoblastic leukemia.** *N Engl J Med.* 354(2):166-78, 2006.

PUI CH, RELLING MV, DOWNING JR. **Acute lymphoblastic leukemia.** *N Engl J Med*;350(15):1535-48, 2004.

PUI CH, RELLING MV AND DOWNING JR. **Acute lymphoblastic leukemia.** *N Engl J Med.* 350(15):1535-48, 2004.

PUI CH, SANDLUND JT, PEI D, *et al.* **Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital.** *Blood.*104:2690-6, 2004.

PUI CH. **Acute lymphoblastic leukemia in children.** *Curr Opin Oncol*:12(1): 3-12, 2000.

PUI CH. **Treatment of acute leucemias.** Totowa: Humana Press.pp. 3-547, 2003.

REDAELLI A, LASKIN BL, STEPHENS JM, *et al.* **A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL).** *Eur J Cancer Care (Engl).*14:53–62, 2005.

REITER A, SCHRAPPE M, LUDWIG WD, *et al.* **Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86.** Blood.84:3122–33, 1994.

ROBAZZI TC, BARETO JH, SILVA LR, *et al.* **Osteoarticular manifestations as initial presentation of acute leucemias in children and adolescents in Bahia, Brazil.** J Pediatr Hematol Oncol.29:622-626, 2007.

ROBISON, L. L. **Late Effects of Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy in Patients Diagnosed at 0-20 Years of Age.** ASH Education Program Book. (1): 238-242, 2011.

ROGERS GJ, HODGKIN MN, SQUIRES PE. **E-cadherin and cell adhesion: a role in architecture and function in the pancreatic islet.** Cell Physiol Biochem. 20:987–994, 2007.

ROLF N, KARIMINIA A, IVISON S, *et al.* **Heterodimer-specific TLR2 stimulation results in divergent functional outcomes in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.** Eur J Immunol. Jul; 45(7):1980-90, 2015.

SANTOS, DANIELA NOBRE DOS. **Células estaminais do cancro do endométrico.**2012.111f. - Universidade de Coimbra (Dissertação de Mestrado) – Coimbra. Disponível em:< <http://hdl.handle.net/10316/22663>>. Acesso em 10 de out. de 2015.

SARKAR SN, ELCO CP, PETERS KL, *et al.* **Two tyrosine residues of Toll-like receptor 3 trigger different steps of NF-kappa B activation.** J Biol Chem.; 282:3423–3427, 2007.

SCHMIEGELOW K, FORESTIER E, HELLEBOSTAD M, *et al.* **Long-term results of NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies of childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Leukemia*.24:670, 2010.

SCHRAPPE M, HUNGER SP, PUI CH, *et al.* **Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *N Engl J Med*.366(15):1371–81, 2012.

SCHWICKERT TA, TAGOH H, GÜLTEKIN S, *et al.* **Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros.** *Nat Immunol*.15:283-93, 2014.

SCRIDELI AC, ASSUMPCÃO JG, GANAZZA M, *et al.* **Utilização de método simplificado para estudo de doença residual mínima por reação em cadeia da polimerase (PCR) nas fases iniciais do tratamento é capaz de estratificar crianças em grupos de bom e mau prognóstico.** XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica-**SOBOPE**. Gramado, RS. Anais. 2008:30.

SCRIDELI CA, de PAULA QR, BERNARDES JE, *et al.* **Use of simplified strategies to evaluate early treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Leuk Res*; 30(8):1049-52, 2006.

SEIBEL NL, STEINHERZ PG, SATHER HN, *et al.* **Early postinduction intensification therapy improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group.** *Blood*. 111(5):2548, 2008.

SEVILLA DW, COLOVAI AI, EMMONS FN, *et al.* **Hematogones: a review and update.** *Leuk Lymphoma*;51:10-19, 2010h

SHAH A, COLEMAN MP. **Increasing incidence of childhood leukaemia: a controversy re-examined.** Br J Cancer 97 (7): 1009-12, 2007.

SILVA, CAMILA ALVES, *et al.* **Desenvolvimento de painéis de genes para sequenciamento de nova geração no diagnóstico e tratamento de leucemias,** 2015.

SMITH MA, ALTEKRUSE SF, ADAMSON PC, *et al.* **Declining childhood and adolescent cancer mortality.** Cancer .120 (16): 2497-506, 2014.

SOPHIA RAN .**The Role of TLR4 in Chemotherapy-Driven Metastasis.** Cancer Res. 75(12), 2015.

STEPHEN P. HUNGER, M.D., AND CHARLES G. MULLIGHAN, M.D. **Acute Lymphoblastic Leukemia in Children.** N Engl j med.373;16, 2015.

TAKEDA K, AKIRA S. **TLR signaling pathways.** Semin Immunol.;16:3–9, 2004.

TAUB JW, KONRAD MA, GE Y, *et al.* **High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia.** Blood 99 (8): 2992-6, 2002.

TEKGÜNDÜZ E, DEMİR MAND AKPINAR S. **Acute Lymphoblastic Leukemia; Prognostic factors' perspective** Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi. 20(1):57-66, 2010.

TIZIANI S, KANG Y, HARJANTO R, *et al.* **Metabolomics of the Tumor Microenvironment in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia.** 13;8(12), 2013.

VARDIMAN JW, THIELE J, ARBER DA *et al.* **The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leucemia: rationale and important changes.** Blood.114: 937-951, 2009.

VERCAMMEN E, STAAL J, BEYAERT R. **Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3.** Clin Microbiol Rev.; 21:13–25, 2008.