



renorbio
rede nordeste de biotecnologia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**POLIMORFISMOS DOS GENES *MBL2*, *IL-10* E *TNFA* EM
PACIENTES COM LEUCEMIA AGUDA NA INFÂNCIA**

LIDIANE REGIA PEREIRA BRAGA DE BRITTO

RECIFE-PE
2014

Lidiane Regia Pereira Braga de Britto

**Polimorfismos dos genes *MBL2*, *IL-10* e *TNF α* em pacientes com
Leucemia Aguda na Infância**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia – RENORBIO como requisito parcial
para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia
área de concentração Biotecnologia da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dra Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

Co-orientadora: Prof^a Dra Maria Tereza Cartaxo Muniz

Recife, 2014.

Ficha catalográfica

B862p Britto, Lidiene Regia Pereira Braga de
Polimorfismos dos genes *MBL2*, *IL-10* e *TNF α* em
pacientes com leucemia aguda na infância / Lidiene Regia
Pereira Braga de Britto. – Recife, 2014.
114 f.: il.

Orientadora: Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti..
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de
Biotecnologia (RENORBIO).

Ponto focal em Pernambuco - Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Polimorfismos 2. Infância 3. LLA 4. LMA 5. *MBL2*
6. *IL-10* 7. *TNF α* I. Cavalcanti, Maria do Socorro de
Mendonça, orientadora II. Título

CDD 620.8

TERMO DE APROVAÇÃO

LIDIANE REGIA PEREIRA BRAGA DE BRITTO

Polimorfismos dos genes *MBL2*, *IL-10* e *TNF α* em pacientes com Leucemia Aguda na Infância

Tese aprovada pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Renorbio como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia área de concentração Biotecnologia da Saúde

Recife,

Presidente: _____

Membro: _____

Membro: _____

Membro: _____

Membro: _____

Membro: _____

DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio, dedicação,
participação e ensinamentos em todas as etapas
de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À DEUS por colocar grandes oportunidade e conquistas na minha vida. À FAMÍLIA, pois sem o apoio de todos eu não iria almejar e alcançar tantas coisas em minha vida.

Aos meus pais – Luziana Maria e Luis Braga, que sempre me serviram de exemplo e puderam proporcionar a formação que tenho hoje; minha querida Rita Maria, minha segunda mãe, sem a companhia dela em Petrolina este trabalho não teria saído.

Em especial minha filha Luisa Ranzan e meu querido marido Paulo Britto que acompanharam muito de perto todos os passos, conviveram e suportaram os meus momentos de altos e baixos.

Aos meus irmãos (Leandro, Lenio, Luiz Manoel e Luiz Orlando) que me apoiaram, incentivaram e compartilharam comigo todos os momentos.

Às minhas amigas que conquistei no doutorado – Jacyra Salucy e Maria Helena Mariano com as quais compartilhei estudo, discussões, risos e desespero.

As minhas queridas orientadoras Maria do Socorro Mendonça Cavalcanti e Maria Tereza Cartaxo Muniz pelo apoio, dedicação, paciência, e atenção e sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Às minhas amigas do trabalho que me entenderam no momento em que eu mais precisava, em especial Regina Aguiar, Marta Guimarães, Renê Amaral.

À Tássia Cristina que me ajudou muito com os TCLEs e que assim como eu vivenciou de perto a rotina das crianças do CEONHPE; Isabelle Violet que me ajudou no trabalho de “garimpo” dos dados das crianças; aos grandes amigos dos Laboratórios do CEONHPE – Eliane Santos, Marina Fonzar, Bethania Amaral, Paula Valença, Thiago Sampaio, Felipe Ferreira, Nelsione Rocha, Maria Deozete, Carminha, Maíra Mafra, Julienne Coelho, Thalita Sant’Ana, Nara Diniz, Rosângela Cabral, Luana Bomfim, Madalena Santos, Thayllane, Helena Rocha, Pérola Michelle, Adriana Vieira e em especial Elkerlene Santos pela grande ajuda nos momentos mais críticos do trabalho.

À equipe do Laboratório de Vírus – Taciana Mendonça, Rodrigo Feliciano, Carla Mola e Luydson Richardson pela grande ajuda na parte experimental e estatística.

Às médicas do CEONHPE – Terezinha de Jesus, Ednalva Leite, Maryluze Silva pelas orientações clínicas no decorrer do trabalho.

À equipe do CCIH do HUOC, em especial Márcia Melo pelas grandes contribuições e ajuda no trabalho. Aos voluntários do GAC, pois só em presenciar o dia-a-dia do trabalho já é a maior motivação e fortalecimento de espírito. Aos pais das crianças pela força, coragem e amor incondicional que desempenham junto aos seus filhos no momento tão delicado de tratamento da doença.

RESUMO

BRAGA-BRITTO, L. R. P. Polimorfismos dos genes *MBL2*, *IL-10* e *TNF α* em pacientes com leucemia aguda na infância. Tese de Doutorado Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco.

A quimioterapia utilizada no tratamento de leucemias agudas (LA) pediátricas deprime o sistema imune, favorecendo a morbidade e mortalidade por infecções durante a fase de indução do tratamento, ou seja, os primeiros 50 dias. Entretanto, permanecem dúvidas sobre o porquê de algumas dessas crianças desenvolverem infecções severas e fatais. A ocorrência de polimorfismos (SNPs) em regiões promotoras e estruturais de genes de componentes do sistema imune pode estar associada ao padrão de reconhecimento de patógenos, a exemplo da Lectina Ligadora de Manose (MBL) e das citocinas Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α) e interleucina 10 (IL-10). O objetivo deste trabalho foi verificar uma possível associação entre a susceptibilidade à infecção nos pacientes pediátricos com os polimorfismos nas regiões promotoras -550 (alelos H/L), -221 (alelos X/Y) e estrutural éxon 1 (alelos A/O) do gene *MBL2*, das regiões promotoras -1082 (alelos G/A), -819/-592 (alelos C/T) do gene *IL-10* e região -308 (alelos G/A) do gene *TNF α* . Foram avaliados 225 pacientes com LA em tratamento no CEONHPE/HUOC-UPE. Destes, 84% (n=189) tiveram o diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). No grupo geral (LA), houve ausência de associação entre as três regiões polimórficas estudadas do gene *MBL2* com a neutropenia febril (-550 H/L, p=0,912; -221 X/Y, p=0,471; éxon 1 A/O, p=0,138), número de eventos infecciosos (-550 H/L, p=0,912; éxon 1 A/O, p=0,741) e o risco de recaída (-550 H/L, p=0,588; éxon 1 A/O, p=0,882). Entretanto, observou-se que o genótipo AO do gene *MBL2* foi associado aos pacientes pediátricos com LA (p=0,027) e LLA (p=0,038) que apresentavam idade abaixo de 10 anos. Com relação aos polimorfismos dos genes *IL-10* e *TNF α* não foi observada associação com as mesmas situações clínicas anteriormente referidas e nem com a idade dos pacientes. Em conclusão, podemos sugerir que os pacientes pediátricos com idade abaixo de 10 anos e portadores do genótipo AO do gene *MBL*, que determina baixa oligomerização e função biológica comprometida da proteína podem apresentar deficiência na resposta imune.

Palavras-chave: leucemia aguda, polimorfismos, *MBL2*, *IL-10*, *TNF α* .

ABSTRACT

BRAGA-BRITTO, L. R. P. Analyse of *MBL2*, *IL-10* and *TNF α* polymorphisms genes in patients with acute leukemia childhood. Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco.

The chemotherapy used in the treatment of acute leukemias (AL) in pediatric immune system, promoting the morbidity and mortality from infection during the induction phase of treatment, the first 50 days. However, questions remain about why some of these children develop severe and fatal infections. The occurrence of polymorphisms (*SNPs*) in regions associated with regulation of immune system components may be associated with proteins that indicate the recognition of pathogens, such as the mannose-binding lectin (*MBL*) and cytokine tumor necrosis factor alpha (*TNF α*) and interleukin 10 (*IL-10*). The aim of this study was to evaluate the association between susceptibility to infection of pediatric patients and the following polymorphisms: -550 promoter regions (alleles H / L), -221 (alleles X / Y) and structural exon 1 (alleles A / O) *MBL2* gene, the promoter region -1082 (allele G / A), -819/-592 (allele C / T) of the *IL-10* gene region and -308 (allele G / A) gene *TNF α* . The 225 patients were evaluated in the CEONHPE / HUOC-UPE. Of these, 84% (n = 189) were diagnosed with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Overall group (AL), there was no association between the three polymorphic regions studied with febrile neutropenia (-550 H/L, p=0.912; -221 X/Y, p=0.471; exon 1 A/O, p=0.138), number of infectious events (-550 H/L, p=0.912; exon 1 A/O, p=0.741) and the risk of relapse (-550 H/L, p=0.588; exon 1 A/O, p=0.882). However, an association was observed between age and genotype AO of exon 1 in patients younger than 10 years in AL (p=0.027) and ALL (p=0.038). In conclusion, we can suggest that the pediatric patients younger than 10 years, carriers of the *MBL2* genotype AO, that determine low oligomerization and compromised biological function of the protein may have immune response deficiency.

Keywords: acute leukemia, polymorphisms, *MBL2*, *IL-10*, *TNF α*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pag
Figura 1	Processo de Hematopoiese e origem da célula leucêmica	21
Figura 2	Estrutura da MBL	35
Figura 3	Funções da MBL	36
Figura 4	A MBL ligada no <i>Staphylococcus aureus</i> e ativando o processo de fagocitose.	37
Figura 5	A organização genética do <i>MBL2</i> .	38
Figura 6	Estrutura molecular da MBL com os pontos de mutação para a região estrutural exon 1	39
Figura 7	Estrutura da molécula de MBL: A-Estrutura formando oligômeros corretamente. B-Estrutura do MBL não funcional devido à presença de SNPs.	40
Figura 8	Via de sinalização do TNF α .	46
Figura 9	Ativação e função do TNF α em microambiente tumoral.	47
Figura 10	Localização do gene TNF- α na região 6p21.3.	49
Figura 11	Interação entre os microorganismos (protozoário, vírus e bactérias) e a via de sinalização JAK-STAT.	53
Figura 12	Localização do gene <i>IL-10</i>	54

LISTA DE QUADROS

		Pag
Quadro 1	Classificação morfológica das LLA.	25
Quadro 2	Classificação da OMS para a leucemia linfoblástica aguda.	26
Quadro 3	Relação entre a faixa etária, citogenética, biologia molecular com a clínica e evolução dos pacientes LLA.	27
Quadro 4	Classificação do risco de recaída para o protocolo GBTLI-99.	28
Quadro 5	Classificação do risco de recaída do protocolo BFM-02.	30
Quadro 6	Patógenos bacterianos comuns em pacientes neutropênicos.	34
 Artigo 1		
Table 1	Clinical characteristics of pediatric patients with AL during the induction phase of chemotherapy treatment	94
Table 2	Frequency of pathogens in patients with AL and infection during the chemotherapy.	94
Table 3	Association of polymorphism -550, -221 of the promoter region and exon 1 of <i>MBL2</i> gene with febrile neutropenia, number of infections, age and risk of relapse in pediatric patients with AL.	95
Table 4	Association of polymorphisms of exon 1 from the <i>MBL2</i> gene with age in pediatric patients with AL.	96

Table 5	Association of polymorphisms of exon 1 from the <i>MBL2</i> gene with age in pediatric patients with ALL.	96
---------	---	----

Artigo 2

Table 1	Association of polymorphisms -1082G/A, -819C/T, -592C/A of <i>IL-10</i> and -308G/A of <i>TNFα</i> with febrile neutropenia, number of infections, age e risk of relapse in pediatric patients with AL.	107
---------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANC	Contagem absoluta de neutrófilos do inglês <i>absolut neutrophil count</i>
BFM	Grupo Europeu Berlim-Frankfurt-Münster do inglês
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidratos do inglês <i>carbohydrate recognition domain</i>
DD	Domínio de morte do inglês <i>death domain</i>
EBV	Vírus Epstein–Barr do inglês <i>Epstein–Barr Virus</i>
EndoG	Endonucleases G
FAB	Classificação Franco-Americano e Britânica de Leucemias
FADD	Proteína Fas associada ao domínio de morte do inglês <i>Fas-associated death domain</i>
<i>Fas</i>	Proteína <i>Fas</i> mediadora de apoptose
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância
G-CSF	Fatores estimuladores de colônias de granulócitos do inglês <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	Fatores estimuladores de colônias de granulócitos e monócitos do inglês <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HCV	Vírus da hepatite C do inglês
HTLVI	Vírus linfotrópico da célula humana do tipo I do inglês <i>human T-lymphotropic virus</i>
IDSA	Sociedade Americana de Doenças Infecciosas
IFN γ	Inferferon gama
IL-10	Interleucina 10
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JAK-STAT	Via de ativação <i>Janus quinase</i>
LA	Leucemia aguda
LIF	Fator inibidor da leucemia do inglês <i>leukemia inhibitory factor</i>
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
LTA	Ácido lipoteicóico do inglês <i>lipoteichoic acid</i>
MASP-2	Serino protease do inglês <i>Mannan-binding lectin-associated serine protease-2</i>
MBL	Lectina ligadora de manose do inglês <i>mannose binding lectin</i>
MHC	Complexo de histocompatibilidade do inglês <i>major histocompatibility complex</i>

MO	Medula óssea
NIK	Fator de transcrição da via cinase do inglês <i>transcription factor via NF-κB-inducing kinase</i>
NF- κ B	Fator nuclear- κ B do inglês <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Células <i>natural killer</i>
OMS	Organização mundial de saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas do inglês <i>platelet activator factor</i>
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões do inglês <i>Pattern Recognition Receptors</i>
RCC	Taxa de remissão completa
RIP	Serino-proteína quinase de recrutamento do inglês <i>receptor-interacting protein</i>
SC	Sistema complemento
SESPE	Secretaria de Saúde de Pernambuco
SLD	Sobrevida Livre de doença
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SNP	Polimorfismos de um único nucleotídeo do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>
SOBOPE	Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica
TACE	Enzima conversora de TNF α do inglês <i>TNF-converting enzyme</i>
TLR	Receptores <i>Toll-like</i> do inglês <i>Toll-like receptor</i>
TNFR	Receptor de TNF α do inglês <i>TNFα receptor</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa do inglês <i>Tumoral neucrose factor</i>
TRADD	Proteína de domínio de apoptose associada ao receptor 1 do TNF α do inglês <i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF-2	Receptor associado ao TNF do inglês <i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Características gerais das Leucemias agudas	18
2.2 Classificação das Leucemias Agudas	20
2.2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).....	22
2.3 Protocolos de Tratamento quimioterápico das leucemias agudas.....	27
2.4 Neutropenia febril e susceptibilidade às infecções	31
2.5 Lectina ligadora de manose (MBL)	35
2.5.1 Relação entre o gene MBL2 e a LA infantil	42
2.6 Fator de Necrose Tumoral (TNF α)	44
2.6.1 Polimorfismos do gene TNF α e a LA infantil	49
2.7 Interleucina 10 (IL-10).....	51
2.7 Polimorfismos do gene IL-10 e a LA infantil	56
3. OBJETIVOS	58
3.1 Objetivo Geral.....	58
3.2 Objetivos Específicos.....	58
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
5. MANUSCRITOS	78
5.1 MBL2 POLYMORPHISMS DO NOT INFLUENCE INFECTIONS IN PEDIATRIC PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA	79
5.2 LACK OF ASSOCIATION BETWEEN IL-10 AND TNF α POLYMORPHISMS AND FACTORS RELATED TO SUSCEPTIBILITY TO INFECTION IN PEDIATRIC PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA	97
6. CONCLUSÕES	110
7. ANEXO.....	111

1. INTRODUÇÃO

Os pacientes pediátricos com leucemias agudas podem apresentar durante o tratamento quimioterápico manifestações clínicas como imunossupressão e neutropenia febril decorrentes da própria doença e/ou induzidas pelo tratamento. Com o sistema imune deficitário, aumenta a suscetibilidade às infecções, as quais são importantes causas de morbidade e mortalidade. Contudo, não está claro porque algumas crianças desenvolvem infecções fatais e severas e outras não (LAUSEN et al., 2006; GABE et al., 2009).

Diante disto, alguns estudos têm sugerido que a presença de polimorfismos (*SNPs*) em regiões reguladoras dos genes de componentes do sistema imune podem ser responsáveis por alterações na produção de proteínas importantes deste sistema que sinalizam o reconhecimento de patógenos como a lectina ligadora de manose (MBL), e as citocinas pró e anti-inflamatória, fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e a interleucina 10 (IL-10), respectivamente (TURNER, 1996; NAOUM, 2001; GARRED et al, 2006; FRAKKING et al., 2011).

A lectina ligadora de manose (MBL), uma proteína da imunidade inata, ativa uma das vias do sistema complemento e sinaliza o reconhecimento de patógenos. Os polimorfismos do gene *MBL2* nas regiões promotoras (-550H/L, -221X/Y) e estrutural (éxon 1 A/O), determinam um fenótipo de diminuição dos níveis séricos da proteína MBL, bem como afetam a oligomerização da molécula, diminuindo sua funcionalidade (FRAKKING et al., 2011).

Os indivíduos com produção alterada de MBL apresentam imunodeficiências primárias que podem aumentar a frequência de infecções ou agravar o quadro infeccioso em pacientes leucêmicos durante o tratamento quimioterápico (GARRED et al., 2003).

No processo de reconhecimento dos patógenos pelos macrófagos, a MBL se liga às células fagocíticas e induz a liberação das citocinas que influenciam no processo inflamatório (TNF α e IL-10).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma proteína pró-inflamatória com funções na diferenciação e proliferação de células do sistema imune (BAZZONI et al., 1996; LOCKSLEY et al., 2001; ZHOU et al., 2011). A presença de *SNPs* na região -308G/A do gene *TNF- α* pode estar relacionada com diferenças na expressão gênica, secreção e produção desta citocina (HAJJEER et al., 2001). Parnes et al. (2010) afirmam que genótipos de alta produção (-308AA) podem suprimir a hematopoiese em pacientes com doenças onco-hematológicas, agravar a neutropenia febril e desencadear infecções severas.

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina antiinflamatória com função pleiotrópica no sistema imune. Os níveis séricos da IL-10 diferem amplamente entre os indivíduos, possivelmente por causa de polimorfismos na região promotora do gene *IL-10*. Os polimorfismos correspondentes ao baixo nível de IL-10 circulante (-1082 A/A, -592 A/A e -819 T/T) estão associados a uma maior susceptibilidade às infecções em pacientes leucêmicos na vigência do tratamento (BENJAMIN et al., 2012).

Neste contexto, por existirem evidências de que *SNPs* presentes nos genes *MBL2*, *IL-10* e *TNF- α* podem influenciar na imunidade do paciente leucêmico. Portanto, o presente estudo avaliou se a presença destes polimorfismos pode aumentar a susceptibilidade às infecções em pacientes pediátricos com LA durante a fase de indução da quimioterapia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características gerais das Leucemias agudas

As leucemias agudas (LA) abrangem um grupo heterogêneo de enfermidades malignas das células precursoras hematopoéticas. A proliferação clonal destes precursores que perderam a capacidade de se diferenciar leva ao acúmulo excessivo de blastos leucêmicos na medula óssea, ocasionando a síndrome da imunodeficiência medular e a infiltração de diversos tecidos do organismo (GILLIAND et al., 2004). As LAs são classificadas em leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA), cuja subclassificação em grupos é fundamental, uma vez que o tratamento envolve grupos genéticos específicos (HEAD, 2004).

A classificação das leucemias é baseada em critérios, como o tipo celular envolvido, o grau de diferenciação e a evolução clínica seguida na doença. Nas LA ocorre a proliferação de elementos celulares imaturos e rápida evolução clínica. Os sinais e sintomas clínicos mais comuns decorrentes da leucemia são: palidez, fadiga e fraqueza consequentes à anemia devido à escassez eritrocitária, sangramentos (equimoses, petéquias, hemorragias) secundários à plaquetopenia, febre e infecções recorrentes, refletidas pela função fagocitária deficiente secundária ao comprometimento do setor granulocítico (MITTAL e MEEHAN, 2001).

Com relação aos fatores de predisposição e susceptibilidade genética para a leucemia infantil destacam-se a presença de translocações cromossômicas e a hiperdiploidia durante o período fetal e mutação/deleção dos genes das células pluripotentes após o nascimento, associados à exposição aos fatores ambientais, como a radiação ionizante, campo eletromagnético não-ionizante, campo elétrico, resposta às

infecções (EBV, HTLVII e vírus da herpes), consumo de álcool/fumo e drogas citotóxicas durante o período de gestação parental (ÉDEN, 2010).

De acordo com os dados epidemiológicos mundiais, as formas mais frequentes de câncer na infância e na adolescência são as leucemias, principalmente a LLA. As leucemias correspondem a 30% dos casos de câncer em crianças, sendo as leucemias agudas responsáveis por 95% dos casos de leucemias infantis. Os três principais tipos de leucemia pediátrica são: a LLA (75-80%), a LMA (20-25%) e a leucemia mielóide crônica – LMC (5%) (COLBY-GRAHAM e CHORDAS, 2003).

Segundo dados do INCA, a estimativa para o ano de 2013 para os casos de leucemia em adultos e crianças, é de 4.570 novos casos para o sexo masculino e 3.940 para o sexo feminino, correspondendo a cinco casos novos a cada 100 mil homens e quatro casos novos em 100 mil mulheres. Estimativas prevêm 330 novos casos de Leucemias para o estado de Pernambuco, destes, 80 novos casos na capital Recife para o ano de 2013 (INCA, 2013).

A sobrevida no câncer pediátrico está relacionada a fatores do paciente, como sexo, idade, assim como o tipo da leucemia (RUBNITZ et al 2012). É importante salientar que a taxa de sobrevida do câncer no Brasil passou de 35% na década de 60 para cerca de 75% nos dias atuais, dados semelhantes aos países da Europa e EUA, em relação às leucemias, podendo este chegar a 80%. O câncer infantil representa 0,5 a 3% de todos os cânceres, com uma incidência mundial anual de 75 a 140 casos/milhão de habitantes (INCA, 2013).

A mortalidade por câncer no grupo de 0 a 18 anos apresenta-se hoje como uma das principais causas de óbitos, proporcionalmente, na medida em que houve redução das causas relacionadas à prevenção por imunização e outras ações básicas de saúde, assim como, às melhores condições de vida. O câncer aparece entre as cinco principais

causas de óbitos no Brasil desde os primeiros anos de vida, porém, é na faixa etária dos cinco aos 18 anos, que frequentemente recebe menor prioridade das ações de vigilância em saúde, incluindo-se atenção básica, que o câncer representa a primeira causa de óbitos por doença, se não forem considerados os óbitos por causas externas (acidentes e violência) (INCA, 2013).

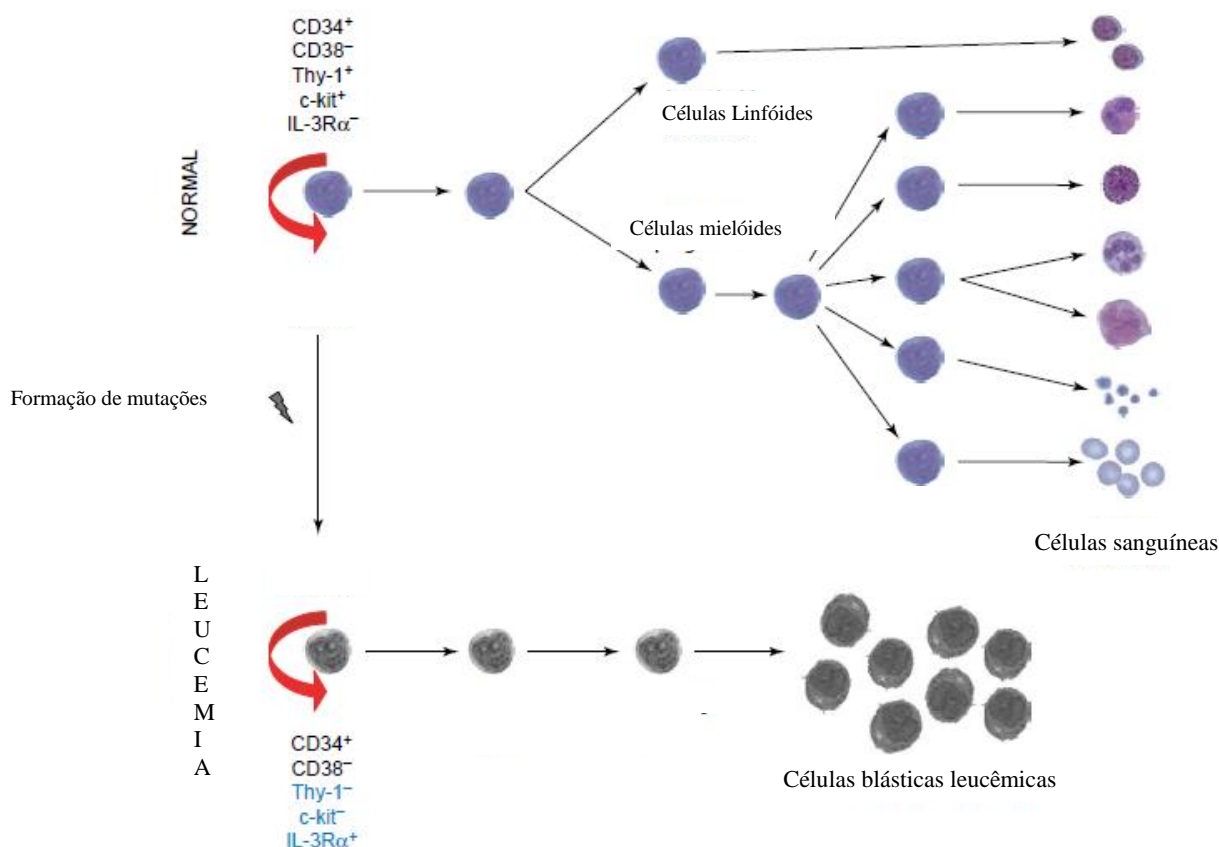
Em Pernambuco, o levantamento de casos da Secretaria de Saúde, no ano de 2003, revela que o câncer é a segunda causa de óbito na faixa etária de 5 a 14 anos numa proporção de 1/600 crianças e 1/300 adolescentes (SESPE, 2008).

2.2 Classificação das Leucemias Agudas

A Leucemia é uma doença clonal de células precursoras hematopoiéticas e desenvolve-se através de uma série de mutações no clone. A produção das células sanguíneas ocorre a partir do processo de hematopoiese durante este processo há a renovação, proliferação, diferenciação e maturação celular (SACHS, 1995).

É um processo complexo regulado pela expressão coordenada de diversos fatores de transcrição, os quais são ativados ou inibidos de acordo com o produto final da hematopoiese (PUI *et al.*, 2004). Admite-se que todas as células do sangue derivam de um único tipo celular da medula óssea, por isso chamada célula-tronco pluripotente. Estas células proliferam e formam duas linhagens: a das células linfóides, que vai formar linfócitos, e das células mielóides, que origina os eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas (Figura 1) (WANG e Dick, 2005).

Figura 1 - Processo de Hematopoiese e origem da célula leucêmica.



Fonte: Wang e Dick (2005).

As primeiras células sanguíneas do embrião surgem muito precocemente (19º dia de gestação), no mesoderma do saco vitelino. Esta fase da hemocitopoese, denominada mesoblástica, é caracterizada pelo desenvolvimento. Posteriormente, o fígado funciona temporariamente como órgão hemocitopoético. Esta fase, denominada hepática, é caracterizada pelo desenvolvimento de eritroblastos, granulócitos e monócitos; as primeiras células linfóides e megacariócitos aparecem. A hemocitopoese hepática, extravascular, é muito importante durante a vida fetal, com o pico de atividade ao redor de 3-4 meses de gestação e declinando gradualmente até o nascimento (ZON, 1995).

Outros órgãos em desenvolvimento como o baço, o timo e linfonodos também contribuem para a hemocitopoese, especialmente para a produção de linfócitos. Porém, no segundo mês de vida intra-uterina tem início a formação de medula óssea hematogênica (vermelha) em seu interior, dando início à fase medular da hemocitopoese. À medida que a ossificação pré-natal do resto do esqueleto avança, a medula óssea se torna cada vez mais importante como órgão hemocitopoético, alcançando um pico de atividade próximo ao nascimento. Na vida pós-natal, os eritrócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas se originam a partir de células-tronco da medula óssea vermelha (ZON, 1995; WANG e DICK, 2005).

A formação das células leucêmicas é proveniente de um clone de células que carregam defeitos em seu DNA, diversas alterações genéticas adquiridas recorrentes tem sido identificadas na LLA, concorrendo para sua etiopatogênese. Entre outras estão, a expressão aberrante de proto-oncogenes, translocações cromossômicas que dão origem a fusões gênicas que codificam quinases ativas e fatores de transcrição alterados, alterações no número de cópias cromossômicas (especialmente hiperdiploidia envolvendo mais de 50 cromossomos) e mutações gênicas específicas. Estas alterações genéticas contribuem para a transformação leucêmica da célula tronco hematopoiética ou suas progenitoras, alterando o processo regulatório normal, mantendo ou acentuando uma ilimitada capacidade de autorrenovação, subvertendo o controle normal da proliferação, bloqueando a diferenciação e promovendo resistência aos sinais de morte celular (apoptose) (PUI *et al.*, 2008).

2.2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

A leucemia linfoblástica aguda é uma doença maligna de células progenitoras linfóides que afeta crianças e adultos, com pico de prevalência entre as idades de dois e

cinco anos. A origem da doença é baseada em uma teoria na qual várias alterações genéticas ocorreram na célula progenitora ou precursora hematopoiética que comprometem as vias de diferenciação das células T e B, incluindo mutações que conferem a capacidade de auto-renovação ilimitada, tornando-se um clone neoplásico que se encontra ainda numa fase precoce de diferenciação com bloqueio na sua maturação (PUI et al., 2008).

Os blastos leucêmicos primeiramente infiltram a medula óssea, podendo ocupar de 20-30% do total de células nucleadas, chegando a 80-100% de ocupação. A primeira consequência é a supressão do processo normal de hematopoiese, na qual os pacientes com leucemias agudas apresentam alteração na distribuição dos leucócitos, resultando em uma resposta inflamatória insatisfatória, mesmo às pequenas infecções (KINLEN, 2004; PUI et al., 2008). Uma vez na corrente sanguínea, os blastos podem então infiltrar os órgãos, com uma preferência para os linfonodos, baço, fígado, gengiva, órbita ocular, sistema nervoso central, testículos e pele. Os sinais e sintomas mais frequentes são febre, adenomegalias, manifestações hemorrágicas, palidez, hepatomegalia, esplenomegalia, fadiga e dor óssea (WITTE et al., 2002).

As características morfológicas ou mesmo citoquímicas dos linfoblastos podem ser indistinguíveis em muitos casos de leucemias agudas, desta forma, a classificação da doença está aliada, em conjunto, ao uso das técnicas de imunofenotipagem, biologia molecular e citogenética (WITTE et al., 2002; PUI et al., 2008).

A classificação Franco-Américo-Britânica (FAB) para as leucemias linfoblásticas consiste em três categorias (L1, L2, L3) (Quadro 1), através de um sistema de pontuação, onde são considerados os parâmetros: relação núcleo-citoplasmática, presença e número de nucléolos, regularidade da membrana nuclear, tamanho da célula (CAVE et al., 1998).

Além dos critérios FAB, as LLAs passaram a ser classificadas segundo a presença de antígenos de superfície, por um painel de associações lineares monoclonais, sendo agrupadas de acordo com a linhagem celular (B e T), caracterizadas de acordo com o estágio maturativo: a de linhagem B em pró-B, CALLA e pré-B e a de linhagem T em pró-T, T intermediária e T madura (BENE et al., 1995).

A partir de 2008, a classificação de tumores hematopoiéticos e tecidos linfóides pela Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu alterações cromossômicas específicas recorrentes da LLA e suas fusões gênicas correspondentes junto com a morfologia, citoquímica e imunofenotipagem. As características clínicas também estão sendo utilizadas para definir entidades individuais dentro da LLA de linhagem B (LLA-B) (Quadro 2). Embora várias alterações cromossômicas e mutações gênicas específicas ocorram também na LLA de linhagem T (LLA-T), elas não são usadas para definir entidades individuais. Os casos de LLA-B que não têm anormalidades citogenéticas são consideradas como “de outra forma não especificada” (VARDIMAN et al., 2009).

O curso clínico natural deste diversificado grupo de neoplasias pode ser fatal em termos de dias, semanas ou meses a partir do diagnóstico. Isto se deve, principalmente, às complicações advindas da insuficiência medular, podendo ser citadas como as mais comuns: infecções ligadas à neutropenia e hemorragias relacionadas à trombocitopenia. Apesar da clínica comum entre si, as características hematológicas e prognósticas destas doenças são distintas e, portanto, sugerem possuir diferentes trajetórias patogênicas (CLARKE e GLASER, 2000).

Quadro 1 - Classificação morfológica das LLA, de acordo com a FAB.

Subtipo	Descrição
L1	Células pequenas, com citoplasma escasso, nucléolo regular e pequeno, as células blásticas são de aparência homogênea, podendo apresentar pequenas fendas ou dobras na cromatina nuclear. A relação núcleo-citoplasmática é alta e a cromatina nuclear é delicada na maioria dos blastos. A vascularização do citoplasma é variável. Os nucléolos nem sempre são proeminentes, e quando visíveis são únicos e de pequeno tamanho, corresponde a 90% dos casos na infância;
L2	Células maiores e heterogêneas, nucléolos evidentes, citoplasma mais abundante, aparece como uma proliferação de células de tamanho variável com baixa relação núcleo-citoplasmática. A vascularização do citoplasma é variável. Usualmente, o contorno nuclear é regular, mas pode apresentar um percentual de blastos com membrana dobrada e em formas de fendas, com nucléolos múltiplos facilmente visualizados, corresponde de 5 a 15% de todos os casos de LLA, sendo mais comum no adulto;
L3	Células de médio e grande tamanho com forma nuclear redonda ou levemente oval com contornos regulares e citoplasma intensamente basofílico, um ou mais nucléolos proeminentes estão presentes na maioria das células. A vascularização do citoplasma é proeminente. A cromatina nuclear é finamente pontilhada e homogênea. Corresponde de 1 a 3% de todos os casos de LLA.

FONTE: CAVE et al., 1998; SOARES et al., 2000; LITTLE et al., 2002; MORÁN, 2005; CARNEIRO et al., 2007.

Quadro 2 - Classificação da OMS (2008) para a leucemia linfoblástica aguda.

Neoplasias de precursores linfóides
<p>As leucemias agudas de linhagem ambígua</p> <p>Leucemia aguda indiferenciada</p> <p>Fenótipo misto leucemia aguda com t (9;22) (q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></p> <p>Fenótipo misto leucemia aguda com t (v;11q23); rearranjo <i>MLL</i></p> <p>Fenótipo misto leucemia aguda, B-mielóide, NOS</p> <p>Fenótipo misto leucemia aguda, T-mielóide, NOS</p> <p><i>Natural killer</i> (NK) células de leucemia linfoblástica / linfoma</p>
<p>B leucemia linfoblástica / linfoma</p> <p>B leucemia linfoblástica / linfoma, NOS</p> <p>B leucemia linfoblástica / linfoma com anormalidades genéticas recorrentes</p> <p>B leucemia linfoblástica / linfoma com t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL 1</i></p> <p>B leucemia linfoblástica / linfoma com t(v;11q23); rearranjo <i>MLL</i></p> <p>B leucemia linfoblástica / linfoma com t(12;21)(p13;q22) <i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i></p> <p>B leucemia linfoblástica / linfoma com hiperdiploidia</p> <p>B leucemia linfoblástica / linfoma com hipodiploidia</p> <p>B leucemia linfoblástica / linfoma com t(5;14)(q31;q32) <i>IL3-IGH</i></p> <p>B leucemia linfoblástica / linfoma com t(1;19)(q23;p13.3); <i>Tcf3-PBX1</i></p> <p>Leucemia linfoblástica T / linfoma</p>

FONTE: Vardiman et al., 2009.

No quadro 3, pode-se observar a relação entre as frequências das alterações genéticas e tipo de prognóstico (favorável e desfavorável) entre os grupos de crianças e lactentes (idade de 0-2 anos) com LLA. A definição destas variáveis e a idade são importantes, pois permitem um melhor manejo terapêutico destes pacientes (CHAUFFAILLE et al., 2003; WANG e DICK, 2005).

Quadro 3 – Relação entre a faixa etária, citogenética, biologia molecular com a clínica e evolução dos pacientes com LLA.

Faixa etária	Alterações detectadas	Associação clínica	Evolução
Crianças	t(1;19)/ <i>E2A-PBX1</i> ou t(17;19)	LLA-B	Prognóstico favorável
	<i>TEL(ETV6)/AML1(RUNX1)</i> , que corresponde à t(12;21), invisível pelo cariótipo	LLA-B	Prognóstico desfavorável e alto risco de recaída
	Hiperdiploidia (>50 cromossomos)/ <i>TEL-AML1</i>	LLA	Prognóstico favorável
	t(9;22)/ <i>BCR-ABL</i> ou t(4;11)/ <i>MLL-AF4</i>	LLA	Prognóstico desfavorável
Lactentes	Rearranjos no gene <i>MLL</i> , no 11q23: t(9;11), t(11;19) e t(4;11)/ <i>MLL-AF4</i> , esta última mais frequente	Observados em 80% dos casos de LLA.	Possibilidade elevada de falha terapêutica

FONTE: Adaptado de Chauffaille et al., 2003; Pui et al., 2008.

2.3 Protocolos de Tratamento quimioterápico das leucemias agudas

O protocolo de tratamento quimioterápico para as Leucemias Agudas mais utilizado nos principais centros de oncologia pediátrica do Brasil é o GBTLI-99 (SOBOPE, 2000), o qual é baseado em achados clínicos e laboratoriais para o estabelecimento de dosagem farmacológica. Este, por sua vez, estabelece dois grupos: baixo risco de recaída e alto risco de recaída (Quadro 4). E, de acordo com as fases de tratamento pode-se ter: indução, consolidação de remissão, intensificação, consolidação tardia e manutenção.

De acordo com o protocolo GBTLI-99 a fase de indução é caracterizada pelo uso de drogas citotóxicas tais como: prednisona, vincristina, daunorubicina e metotrexato durante os três primeiros meses de tratamento, a depender da resposta ao quimioterápico.

A duração da fase de manutenção é de 24 horas quando na ausência de recidiva do paciente, os principais quimioterápicos são: 6-mercaptopina e metotrexato.

Quadro 4 – Classificação do risco de recaída para o protocolo GBTLI-99.

Fatores	Baixo Risco	Alto Risco
Idade	≥ 1 ano < 9 anos	< 1 ano ≥ 9 anos
Leucometria ao diagnóstico	$< 5000/\text{mm}^3$ ao diagnóstico	$> 5000/\text{mm}^3$ ao diagnóstico
Leucometria no dia 7 de tratamento	$< 5000/\text{mm}^3$ no dia 7 de tratamento	$\geq 5000/\text{mm}^3$ no dia 7 de tratamento
Blastos no dia 14 de tratamento	Ausência de blastos periféricos	Presença de blastos periféricos
Comprometimento medular no dia 14 de tratamento	Baixo comprometimento medular no dia 14 de tratamento	Comprometimento medular extenso no dia 14 de tratamento

FONTE: SOBOPE, 2000.

Outros fatores são considerados neste protocolo, tais como: a influência das características dos pacientes no momento do diagnóstico (idade, sexo, estado nutricional, linhagem das células leucêmicas e citogenética), nas taxas de remissão clínica completa (RCC), e sobrevida global. Ainda, são avaliadas por este protocolo as toxicidades hematopoiéticas, gastrointestinal, hepática, número de infecções e dias de hospitalização nos grupos alocados para a terapia de indução (SOBOPE, 2000).

O objetivo do tratamento de indução da remissão é erradicar mais de 99% da carga de células leucêmicas iniciais e restaurar o desempenho normal e saudável da hematopoiese. Esta abordagem inclui a administração de um glicocorticoide (prednisona ou dexametasona), vincristina, e, pelo menos, um terceiro fármaco (asparaginase, antraciclina, ou ambos). Um regime de indução de três drogas parece suficiente para a maioria dos casos. Crianças em alto risco são tratadas com quatro ou mais fármacos na

fase de indução, podendo ter uma remissão clínica em 96-99% das crianças e 78-93% de adultos (PUI et al., 2008).

Uma elevação de mortes relacionadas ao tratamento, geralmente por infecções e complicações decorrentes da terapia com dexametasona (VEEMAN et al., 2009), também foi observada, limitando sua utilização. A utilização de prednisona em combinação com L-asparaginase também tem sido relacionada com aumento do número de eventos trombóticos em crianças com LLA (ATHALE et al., 2003).

A L-asparaginase possui a vantagem de ter baixo efeito mielossupressor e de distúrbios gastrintestinais em comparação com outros agentes utilizados na LLA. Sua inclusão no tratamento aumentou imensamente o número de pacientes que entraram em remissão, principalmente na LLA-T. O uso da combinação MADIT (metotrexato, citarabina e dexametasona intratecal) está presente em quase todas as etapas do protocolo GBTLI-99 (SOBOPE, 2009).

Em estudo sobre a avaliação de quatro protocolos consecutivos de tratamento (1991 a 2006), em 847 crianças com LLA, foi observado que a idade ao diagnóstico possui um forte prognóstico, e que crianças entre 1-9 anos responderam melhor ao tratamento do que adolescentes e crianças com idade acima de 9 anos. Quanto a sobrevida livre de eventos as estimativas foram de 88% para crianças de 1-9 anos, 73% para adolescentes com idades entre 10-15 anos, 69% para aqueles com mais de 15 anos e 44% para os bebês com menos de 12 meses (HILDEN et al., 2006; PIETERS et al., 2007; PUI et al., 2008).

Em relação à LMA o tratamento geralmente consiste na combinação de uma antraciclina (daunorubicina ou idarubicina), e citarabina (LÖWENBERG et al., 2003; TALLMAN et al., 2005). A terapia consiste em duas fases: a primeira tenta produzir a remissão completa, onde se espera um comprometimento medular com menos de 5% de

blastos, contagem de neutrófilos superior a 1000 e contagem de plaquetas superior a 100.000. A segunda fase da terapia tem como objetivo prolongar a remissão completa, uma vez que o paciente se mantém em remissão por três anos. e a probabilidade de recaída brusca é menor que 10% (CHENSON et al., 2003).

O protocolo desenvolvido pelo grupo Europeu Berlim-Frankfurt-Münster (BFM), é outro esquema de tratamento quimioterápico que pode ser utilizado para o tratamento de LLA e LMA em crianças e adolescentes até 15 anos de idade, com obtenção de uma sobrevida livre de doença de 64%, nos três grupos de risco: risco intermediário, alto risco e baixo risco (BFM, 2002) (Quadro 5).

Quadro 5 – Classificação do risco de recaída de acordo com o protocolo BFM 2002.

Alto risco	Risco intermediário	Baixo Risco
Estado da medula óssea em M3 no dia 15 ≥ 1.000 blastos/ μL M2 ou M3 no dia 33 Presença t(9;22) [BCR/ABL] ou t(4;11) [MLL/AF4]	Estado da medula óssea em M3 no dia 15 e M1 no dia 33 < 1.000 blastos/ μL < 1 ano ou ≥ 6 anos WBC $\geq 20,000/\mu\text{L}$	Estado da medula óssea em M1 ou M2 no dia 15 e M1 no dia 33 < 1.000 blastos/ μL ≥ 1 ano – < 6 anos WBC $< 20,000/\mu\text{L}$

FONTE: BFM, 2002

A associação de uma antraciclina com citarabina (ARA C) é o esquema terapêutico mais eficaz, observando-se remissão em 75-80% dos casos. O acréscimo de agentes citotóxicos (etoposide, fludarabine, topotecan), tem sido utilizado por alguns protocolos, porém permanece discutível se eles melhoram esses percentuais de remissão. Apesar do elevado índice de remissão, 90% dos pacientes apresentam recaída, caso não recebam quimioterapia de consolidação e de intensificação. A consolidação/intensificação tem como finalidade, portanto, a erradicação de células leucêmicas

residuais não detectadas pelos métodos utilizados para avaliar a remissão (ESTEY e DOHNER, 2006).

Em dois estudos realizados com pacientes adultos, a manutenção prolongada após quatro cursos de consolidação intensiva não melhorou a sobrevida livre de doença (SLD). Por outro lado, Bücchern et al (2001) demonstraram que a SLD em 5 anos é de 25% para pacientes que receberam manutenção e de apenas 13% para os que não receberam esse tratamento.

No entanto, pacientes com idade acima de 50 anos têm uma pior sobrevida do que pacientes jovens (≤ 18 anos) e isto pode estar associado a marcadores genéticos que estão associados a um pior prognóstico na LMA, presença dos cariótipos: $inv(3)(q21q26)$ ou $t(3;3)(q21;q26)$; -7 ; $t(6;9)$; $t(6;11)$; $t(11;19)(q23;p13.3)$; -5 ; $del(5q)$, mutações nos genes *MLL1*, *BAALC*, receptores de tirosina-quinase – *FLT3/ITD*, *RAS* e *KIT* (CALIGIURI et al., 1998; CARE et al., 2003; SCHNITTGER et al., 2006; CARIOLI et al., 2006).

A alteração celular apresentada na leucemia em associação com o uso de quimioterápicos gera uma forte imunossupressão nos pacientes leucêmicos, sendo que os pacientes infantis ficam ainda mais debilitados (SILVA, 2013). Entretanto, a quimioterapia baseada em drogas citotóxicas é a mais utilizada para as LAs, pois possui uma eficácia maior, porém aumenta os riscos à infecção e danos na mucosa gastrointestinal (ESTEY e DOHNER, 2006).

2.4 Neutropenia febril e susceptibilidade às infecções

A neutropenia é definida como a redução de contagem absoluta de neutrófilos abaixo da que seria esperado em um indivíduo de mesmo sexo, idade, estado fisiológico e origem étnica. Neutropenia refere-se à contagem total de neutrófilos

<1500 células/mm³, com previsão de queda nos dois dias consecutivos (48h). A gravidade da neutropenia, chamada de neutropenia profunda, quanto ao risco de infecção relaciona-se com o número total de neutrófilos, sendo considerado maior o risco infeccioso naquela em que há uma contagem global ≤ 100 células/mm³. A maioria dos episódios de neutropenia febril é tratada sem identificação do sítio ou agente etiológico, como febre de origem indeterminada (DANILATOU, 2003; MASCHMEYER et al., 2003; IDSA, 2011).

A incidência de febre relacionada à neutropenia é de 10-50% nos pacientes com tumores sólidos de até 80%, nas neoplasias hematológicas após pelo menos um ciclo de quimioterapia (TORRES e TABAK, 2011). Na neutropenia, entende-se, por febre, uma medida única de temperatura oral $\geq 38,3^{\circ}\text{C}$, ou uma temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$ por 1 hora contínua ou em dois episódios com intervalo de, pelo menos, 12 horas (FREIFELD et al., 2011; IDSA, 2011; DEVITA et al., 2012).

Febre durante a neutropenia induzida pela quimioterapia pode ser a única indicação de infecção grave subjacente, porque os sinais e sintomas de inflamação normalmente são atenuados (IDSA, 2011).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) descreveu um protocolo de utilização de agentes antimicrobianos no tratamento de pacientes com câncer com relato de febre e neutropenia induzida por quimioterapia. Neste, a maioria dos especialistas consideram pacientes de alto risco aqueles com febre prolongada (duração >7 dias) e neutropenia profunda ($\text{ANC} \leq 100$ células/mm³ após a quimioterapia), co-morbidades, incluindo hipotensão, pneumonia, início recente de dor abdominal ou alterações neurológicas (IDSA, 2011).

Pacientes neutropênicos afebris que têm novos sinais ou sintomas sugestivos de infecção devem ser avaliados e tratados como de alto risco (IDSA, 2011). Vale salientar

que no paciente neutropênico devem ser consideradas as etiologias não infecciosas de febre, como aquelas decorrentes de uso de hemoderivados, fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF), utilizado para o tratamento da neutropenia em pacientes submetidos à quimioterapia de altas dosagens, pois estimula a expansão clonal de granulócitos e macrófagos (BENJAMINI et al., 2002; MENDES et al., 2007).

Pacientes de alto risco necessitam de hospitalização para antibioticoterapia e dentre os mais utilizados estão: cefepima, carbapenem (meropenem ou imipenem - cilastatina), ou piperacilina - tazobactam, fluoroquinolonas e/ou vancomicina). Estes pacientes são acometidos com maior frequência por bactérias resistentes: *Staphylococcus aureus* metilina-resistente, enterococo resistente à vancomicina, bactérias gram-negativas produtoras de β -lactamase, organismos produtores de carbapenemase, incluindo *Klebsiella pneumoniae* (IDSA, 2011). Segundo Mendes et al. (2007), as bactérias são as principais responsáveis pela infecção durante a neutropenia febril em pacientes em tratamento quimioterápico. Dentre estas, destacam-se o *Stafilococos* coagulase-negativo, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* e não-fermentadoras gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas sp.*) (Quadro 6).

O aumento de casos de infecção por bactérias decorre do uso de dispositivos invasivos, especialmente os catéteres de longa permanência, e antimicrobianos de amplo espectro (HUGHES et al., 2002; MENDES et al., 2007).

Até o final da década de 1990, havia um panorama de predomínio de bactérias gram-negativas observadas em pacientes oncológicos neutropênicos dos principais centros de oncologia dos Estados Unidos. No ano de 2011, foi observado que bactérias gram-positivas são responsáveis por 60-70% dos episódios documentados de neutropenia febril nos EUA (IDSA, 2011).

Quadro 6 - Patógenos bacterianos comuns em pacientes neutropênicos.

Bactérias gram-positivas	Bactérias gram-negativas
<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> , incluindo resistentes a meticilina.	<i>Klebsiella sp.</i>
<i>Enterococcus sp.</i> , incluindo resistentes a vancomicina.	<i>Enterobacter sp.</i>
<i>Streptococcus viridans</i> (grupo)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Citrobacter sp.</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

FONTE: IDSA guideline (2011).

As complicações infecciosas são as principais causas de morbidade e mortalidade na criança e no adolescente imunocomprometido em tratamento oncológico. A prevalência de sepsis em crianças entre um e nove anos de idade é de 12,8%, sendo maior ainda para aquelas com idade entre 10 e 19 anos (17,4% dos casos). Há uma letalidade maior (16%) nos pacientes oncológicos com sepsis, que na população em geral (10%) (MENDES, 2007; IDSA guideline, 2011).

Fatores como internamento hospitalar recente, uso prévio de antimicrobianos profiláticos ou terapêuticos, intensidade e tempo de neutropenia, uso de cateteres venosos centrais de longa permanência ou outros dispositivos invasivos devem ser considerados no monitoramento dos processos infecciosos (MASCHMEYER et al., 2003; MENDES et al., 2007; HENTRICK et al., 2014).

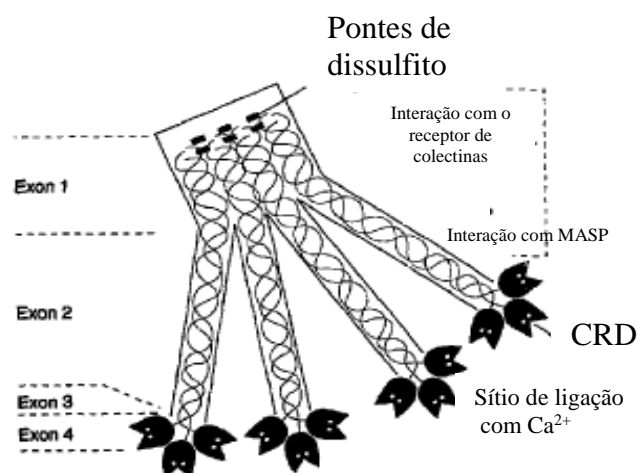
A neutropenia febril em pacientes leucêmicos e o aumento de infecções durante o tratamento quimioterápico parecem estar associados a polimorfismos de genes que

codificam proteínas do sistema imune, tais como os genes *MBL2*, *TNF- α* e *IL-10* (NETH et al., 2001; PARNES et al., 2010; VANSKA et al., 2012)

2.5 Lectina ligadora de manose (MBL)

A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína da imunidade inata, encontrada em mamíferos e pássaros, codificada pelo gene *MBL2*. Ela é classificada como lectina cálcio-dependente, pertencente à família das colectinas, por apresentar uma região semelhante ao colágeno e outra com domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (TURNER et al., 2000). Esta lectina atua ativando uma das vias do sistema complemento (SC) e apresenta, como unidade básica estrutural, cadeias polipeptídicas organizadas em tripla hélice, as quais se agregam para formar tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros, responsáveis pela fixação do complemento (WORTHLEY et al., 2005) (Figura 2).;

Figura 2 – Estrutura da MBL.



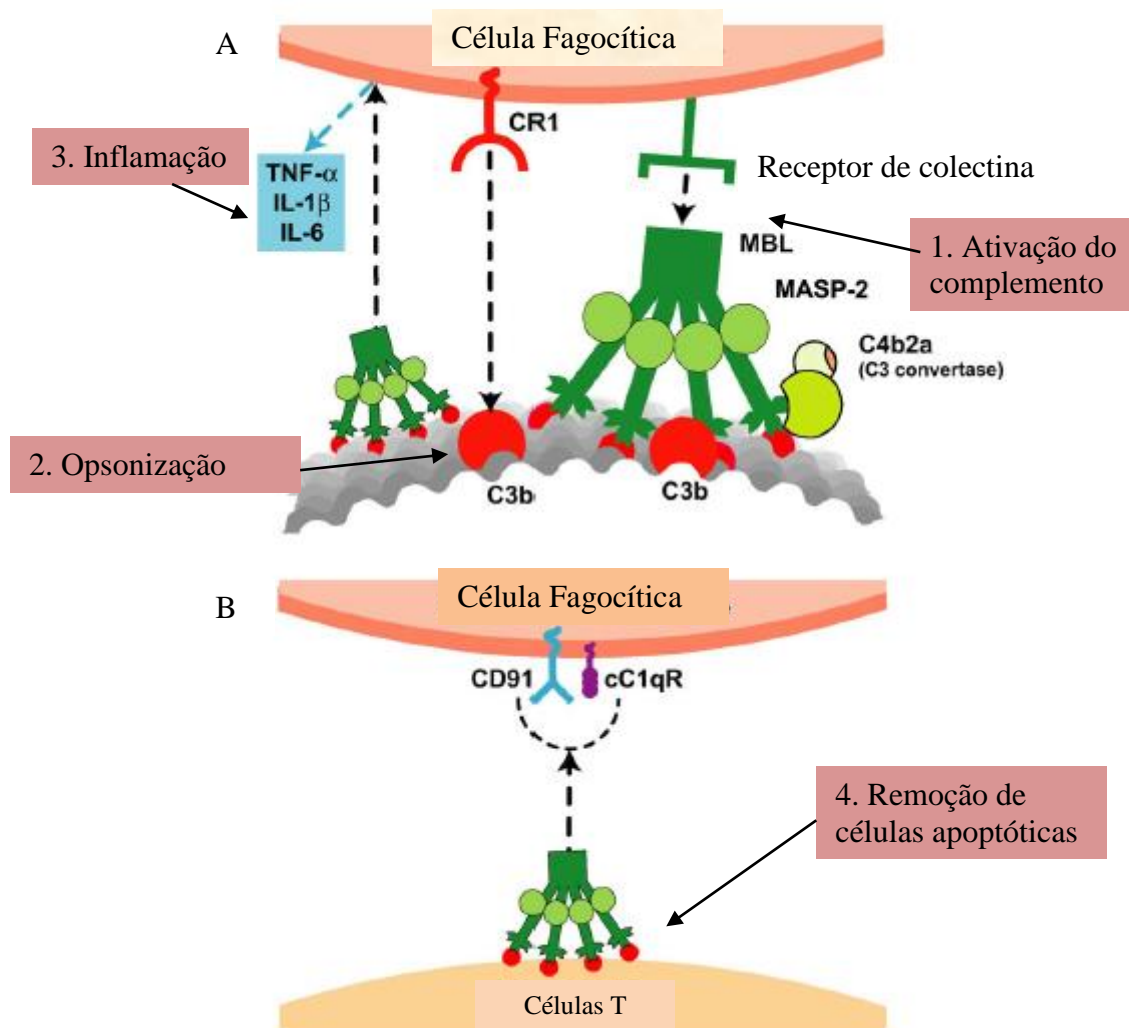
Fonte: Turner (1996).

Para ativação do SC é necessário que a MBL esteja associada a uma serino protease chamada MASP-2, formando um complexo que se liga ao patógeno e, assim,

ativa uma cascata de proteínas do SC. Esta ativação leva à remoção dos microorganismos por fagocitose ou destruição dos patógenos pela opsonização e ação do sistema complemento (GARRED et al., 2003; LAUSEN et al., 2006).

Além de ativar o SC a MBL desempenha outras funções como, a promoção da opsonização e da fagocitose, modulação da inflamação e remoção de células apoptóticas (Figura 3) (OGDEN et al., 2001, TURNER, 2003).

Figura 3 – Funções da MBL

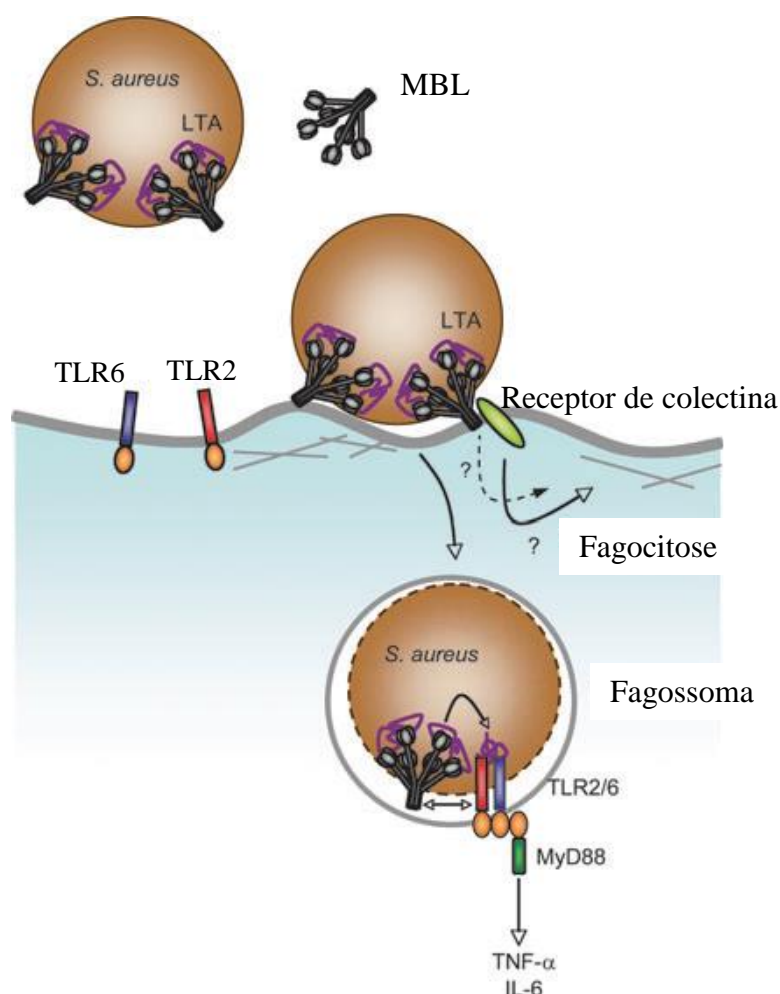


Fonte: Turner et al. (2003).

Legenda: 1) Ativa o complemento; 2) Promove opsonização e fagocitose; 3) Participa da modulação da inflamação; 4) Participa da remoção de células apoptóticas.

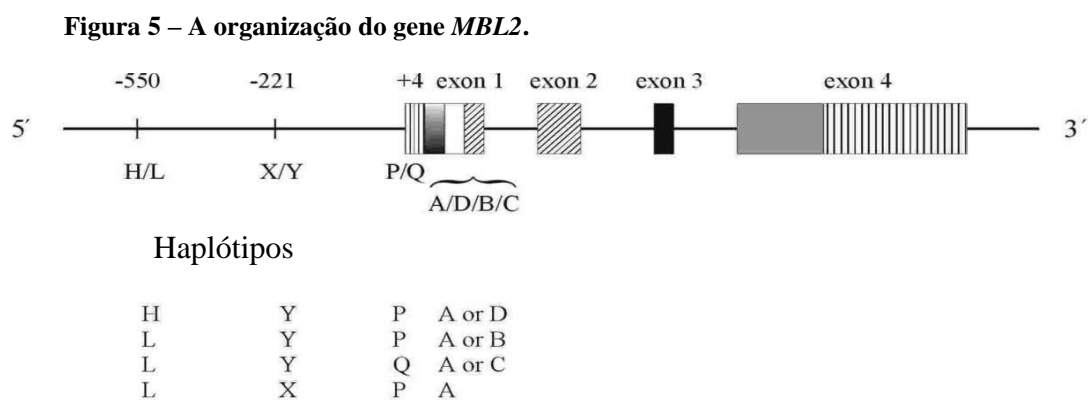
Ip et al (2009) descreveram em estudo *in vitro* sobre o processo de fagocitose intermediado pela MBL na superfície do *Staphylococcus aureus*. O processo inicia com o reconhecimento e ligação da MBL ao ácido lipoteicóico (LTA) presente na superfície do patógeno, após a ligação MBL-LTA haverá a ativação de receptores de colectina presente na superfície dos macrófagos, que irão desencadear o reconhecimento para a fagocitose pelo fagossoma através dos receptores *Toll-like* (TLR2/6), que por sua vez irão iniciar uma cascata de eventos, pela ligação TLR2/6 e MyD88 (gene 88 de resposta primária de diferenciação mielóide), que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-6) (Figura 4).

Figura 4 – Ligação da MBL ao *Staphylococcus aureus* e ativação do processo de fagocitose.



Fonte: Ip et al.(2009).

A região estrutural do gene *MBL2* (localizado na região 10q21-23) é constituída por quatro éxons: o éxon 1 (A/O) codifica a região N-terminal rica em cisteína e parte da região de domínio do colágeno, responsável pela formação da tripla-hélice das estruturas colagenosas. O éxon 2 é responsável pelo restante da região de domínio do colágeno e o éxon 3 pela região do pescoço, hidrofóbica. Já o éxon 4 codifica a região C-terminal (THIEL et al., 2006; DOMMETT et al., 2006). Na região do pescoço, cada cadeia adota uma estrutura espiralada de encaixe. A região N-terminal é importante para a efetiva oligomerização através de pontes dissulfeto intercadeia (TURNER, 2003; FUJITA et al., 2004). A região promotora do gene (-550 H/L e -221 Y/X) também determina os níveis séricos de MBL, regulando a expressão da proteína (Figura 5) (SILVA,2010; GARRED, 2008).

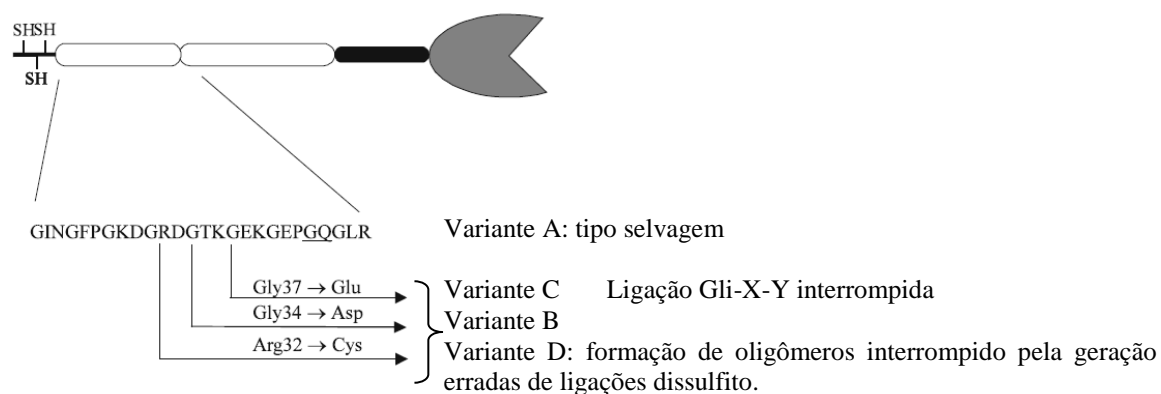


Forte: Petersen et al (2001).

Os polimorfismos do exon 1 da região estrutural do gene *MBL2* ocorrem nos códons 52 (rs5030737) (Arginina→Cisteína, alelo *D*), código 54 (rs1800450) (Glicina→Ácido aspártico, alelo *B*), e código 57 (rs1800451) (Glicina→Ácido glutâmico, alelo *C*) no éxon 1 da região estrutural do gene *MBL2*, e estas variantes são

designadas coletivamente de “O” e o alelo selvagem denominado de “A” (Figura 6) (WORTHLEY, 2005; BROWN et al., 2006; MANGANO et al., 2008; SILVA, 2010).

Figura 6 – Estrutura molecular da MBL com os pontos de mutação da região estrutural exon 1 do gene *MBL2*.

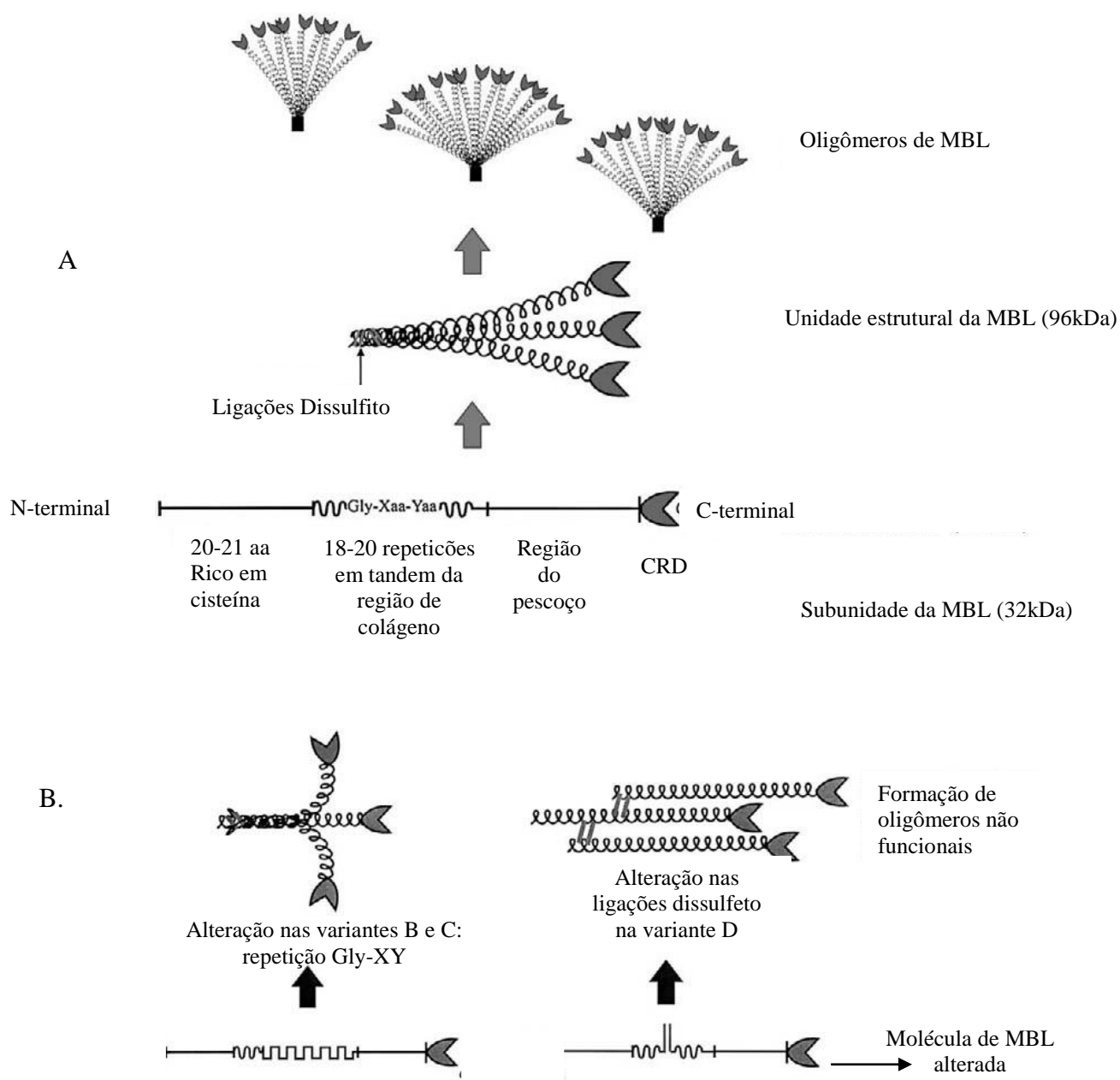


Fonte: Petersen et al. (2001).

O alelo A, em homozigose, é responsável pela expressão de níveis normais de MBL, enquanto que heterozigotos, para um dos alelos polimórficos, têm diminuição de 1-10% nos níveis de MBL. Os homozigotos (O/O) para a região estrutural têm nível muito baixo de MBL sérica com redução de até 90% (LITZMAN et al., 2008).

Na literatura, a incidência do genótipo O/O pode variar de 3-16%, dependendo do grupo étnico estudado (LIPSCOMBE et al., 1992). Em geral, cerca de 4% da população humana são deficientes de MBL, esses SNPs produzem uma forma instável e incorreta de oligomerização da MBL, causando diminuição da MBL funcional no soro, reduzindo, conseqüentemente, a capacidade para ativar o sistema do complemento (Figura 7) (LIPSCOMBE et al., 1992; PETERSEN et al., 2001; EISEN et al., 2003).

Figura 7 – Estrutura da molécula de MBL.



Fonte: Eisen et al. (2003).

Legenda: A-Estrutura formando oligômeros corretamente. B-Estrutura do MBL não funcional devido à presença de *SNPs*.

A mutação na variante B (exon 1) ocorre em cerca de 26% da população caucasiana, enquanto a mutação na variante C é característica das populações da África Subsaariana com uma frequência de 50-60% (TURNER, 1996)

Na região promotora do gene *MBL2*, há duas regiões polimórficas, a -550 H/L (rs11003125) e a -221 X/Y (rs7096206), ambas resultantes da troca de guanina por citosina (G→C) e possui uma mutação na região não-traduzida +4 pb P/Q com uma substituição de citosina por timina (C→T) (BOUWMAN et al., 2006). Esses alelos combinam-se originando vários haplótipos. O haplótipo HY resulta em níveis altos de MBL, enquanto o LX induz a produção de baixos níveis desta lectina. Na população caucasiana o polimorfismo da região -221 encontra-se numa frequência de 12% (TURNER et al., 2003).

Os sítios polimórficos da região promotora estão associados a diferentes níveis séricos de MBL independente dos alelos variantes, estando intimamente ligados. Devido ao desequilíbrio da ligação, apenas cinco haplótipos (HYA, LYA, LXA, HYO LYO) são comumente encontrados. O haplótipo HYA/LYA está associado a altas concentrações plasmáticas de MBL, enquanto o LXA/HYO/LYO estão associados a baixas concentrações (MADSEN et al., 1998; GARRED et al., 2006; BOUWMAN et al., 2006).

Os alelos H/L e P/Q possuem uma influência mínima na concentração da MBL circulante. O alelo variante X é o que mais afeta negativamente a produção sérica de MBL (KOCH et al. 2001; HANSEN et al., 2004; MANGANO et al., 2008). Conseqüentemente, a determinação do polimorfismo Y/X, na região promotora, é a mais importante para uma leitura funcional do genótipo (BOUWMAN et al., 2006).

Em relação à associação dos haplótipos com a severidade da doença, Mendonça et al. (2010) observaram em 85 crianças com anemia falciforme uma associação entre os haplótipos relacionados a intermediário/baixa expressão para MBL e a presença de mais de um evento de crise vaso-oclusiva ($p=0,0188$).

Halla et al (2010) observaram em 186 pacientes adultos com o vírus da hepatite C (HCV), que a frequência de genótipos relacionada à baixa produção de MBL foi maior em pacientes com HCV do que no grupo controle ($p=0,0001$). Além disso, a frequência do haplótipo variante, HYO, foi maior em pacientes com fibrose grave (F4) (10,7%) do que em pacientes com fibrose moderada F1/F2 (3,4%). Estes resultados levaram a conclusão de que alelos variantes de MBL que expressam níveis baixos de MBL estão associados à susceptibilidade com infecção por HCV e que a herança do haplótipo HYO pode ser associada com a gravidade de fibrose hepática.

2.5.1 Relação entre o gene *MBL2* e a LA infantil

A presença de polimorfismos do gene *MBL2* (-550, -221 e exon 1) parecem predispor as pessoas a um amplo quadro de doenças infecciosas, principalmente, em crianças, podendo desenvolver infecção do trato respiratório, otite média e diarreia crônica (SUMMERFIELD, 2003).

Indivíduos com baixa concentração sérica de MBL circulante são mais vulneráveis à infecção especialmente quando combinada com uma deficiência imunológica secundária. A deficiência de MBL (<100ng/mL) demonstra ser um fator de risco para infecção em crianças realizando tratamento quimioterápico (KILPATRICK, 2002).

Estudos em crianças com imunossupressão resultante do tratamento para mieloma múltiplo (MOLLE et al, 2006) e após um transplante alogênico (MULLIGHAM e BARDY, 2004) mostraram uma associação significativa entre a presença dos polimorfismos do gene *MBL2* e gravidade das infecções.

No estudo de Schmiegelow et al. (2002) em 137 crianças com LLA, com idade entre dois a sete anos, foi observada associação entre os genótipos de menor expressão para MBL (XA/O e O/O) ($p < 0,04$) com a idade (média de 3,9 anos), indicando uma relação entre o sistema imune e o risco de desenvolver LLA na infância.

Neth et al. (2001) analisaram os polimorfismos do gene *MBL2* em 100 crianças que receberam quimioterapia e observaram que crianças que carregavam os genótipos O/O e A/O apresentaram o dobro de dias de neutropenia febril em comparação com pacientes com o genótipo AA ($p=0,014$). Ainda demonstrou que do grupo de pacientes internados na UTI, todos apresentaram o genótipo de baixa expressão para MBL.

Em estudo com 110 crianças com LLA em tratamento quimioterápico, foi observado que 61% dos pacientes apresentaram neutropenia febril severa (< 100 células/ μ L) e também que durante os dias 1, 3 e 5 da neutropenia febril, os pacientes que apresentaram os haplótipos de alta (HYA/HYA, HYA/LYA, HYA/LXA, LYA/LYA, LYA/LXA) e intermediária (LXA/LXA, HYA/O, LYA/O) expressão para MBL tinham o nível sérico aumentado nesses dias (1000-24000 μ g/L), porém para quem possuía o haplótipo de baixa expressão (LXA/LXA, O/O) a concentração sérica apresentava-se < 500 μ g/L durante este período (FRAKKING et al., 2006).

Quando foi comparado o grupo de crianças com LLA de idade $< 2,5$ anos com o grupo com idade $> 2,5$ anos durante tratamento quimioterápico, Lausen et al. (2006), não observaram uma associação significativa entre os genótipos de baixa expressão para MBL com o risco de infecção. Porém, eles puderam observar uma alta frequência de febre ($p<0,004$), eventos de infecção ($p=0,025$), dias com neutropenia ($p<0,001$) e uma alta frequência de terapia antimicrobiana ($p=0,0007$) no grupo de crianças com idade $< 2,5$ anos.

A imunossupressão severa em pacientes com LAs que são submetidos à quimioterapia pode reduzir a função da MBL, uma vez que haverá uma quantidade menor de células fagocíticas funcionais, conseqüentemente um déficit na opsonização intermediada pela MBL (VEKEMANS et al., 2007). Klein e Kilpatrick (2004) sugeriram que a MBL é menos eficiente em pacientes tratados com quimioterapia intensiva, porque a função da MBL, na maioria dos casos, depende da função dos fagócitos.

Estudos tem demonstrado que a administração da infusão da MBL tem melhorado o estado de gravidade da neutropenia em crianças e adultos com câncer durante a quimioterapia. O uso da infusão durante o tratamento quimioterápico tem demonstrado que evita complicações, diminui o tempo de internamento, os custos com medicamentos e os quadros de infecções (FRAKKING et al., 2009; BROUWER et al. 2009). No entanto, vários testes clínicos ainda são realizados, pois há questionamentos importantes tais como os efeitos após a suspensão da infusão (BAX et al 1999).

Jack et al (2001) afirmaram que a MBL também influencia na produção de citocinas, o que pode agravar o estado de neutropenia febril e a susceptibilidade às infecções nos pacientes leucêmicos em tratamento pediátrico.

2.6 Fator de Necrose Tumoral (TNF α)

O fator de necrose tumoral alfa (TNF α) é uma citocina pró-inflamatória envolvida na inflamação sistêmica e na regulação, diferenciação e proliferação de células do sistema imune. Ela também interage com células tumorais para desencadear a citólise ou morte celular, por este motivo tem sido alvo de vários estudos relacionados à patogênese do câncer (BAZZONI et al., 1996; LOCKSLEY et al., 2001; ZHOU et al., 2011).

O TNF α foi isolado, em 1975, a partir do soro de ratos tratados com endotoxina bacteriana que induzia a necrose hemorrágica de tumores. Uma década após o seu isolamento, o TNF α foi caracterizado como fator de diferenciação de linfócitos T. Em 1984, o gene do TNF α humano foi clonado e vários experimentos clínicos foram realizados para investigar o papel desta citocina no câncer (LOCKSLEY et al., 2001; BALKWILL, 2009).

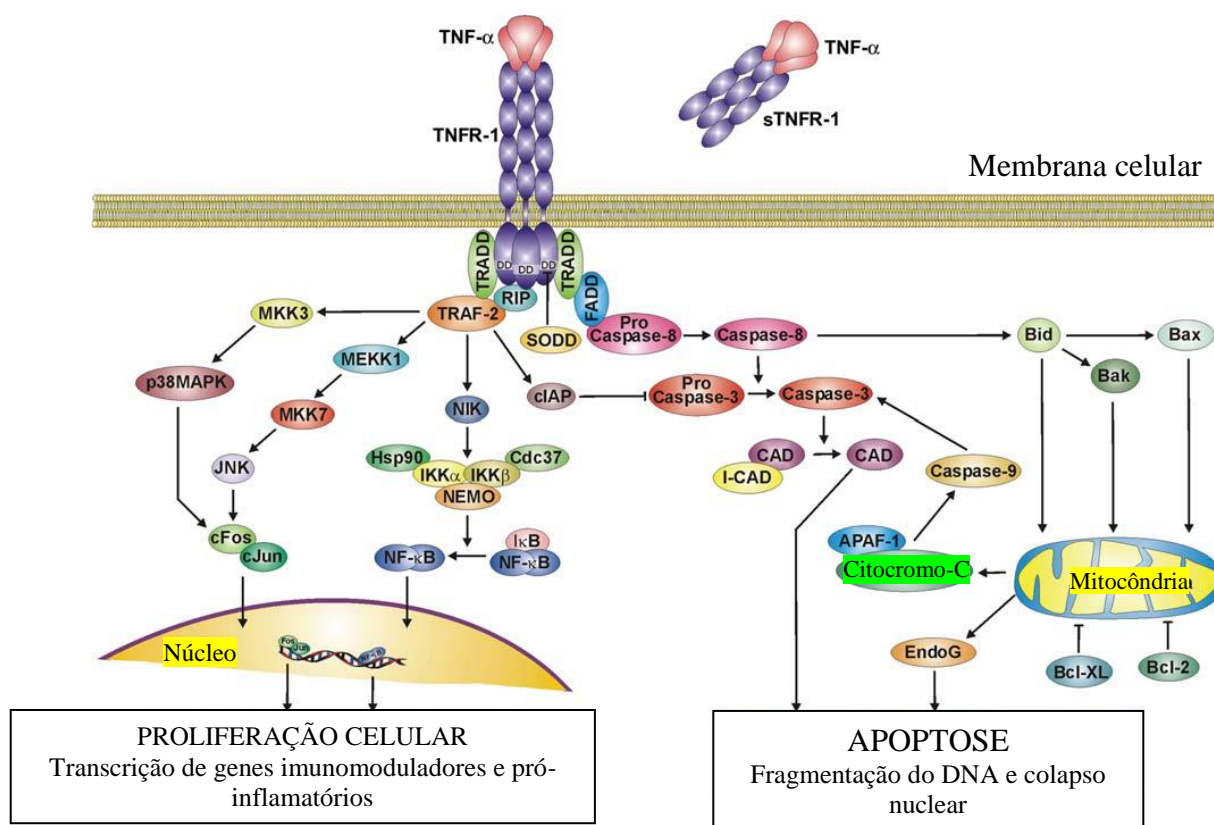
Esta citocina é produzida principalmente por macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B, células *natural killer* (NK) e também por fibroblastos, queratinócitos, células do músculo liso e células tumorais (WANG et al., 1999). Os monócitos humanos são a principal fonte de síntese de TNF α e normalmente o nível plasmático de TNF α é baixo.

Nas células, o TNF α é sintetizado como pró-TNF (26 kDa), e é liberado após a clivagem pela enzima conversora de TNF α (TACE). O TNF α atua via dois receptores distintos; TNFR-1 e TNFR-2, e embora a afinidade para o receptor TNFR-2, seja cinco vezes maior do que para a TNFR-1, este último, inicia as atividades biológicas do TNF α , tais como proliferação celular e apoptose. O TNFR-1 é expresso em todos os tipos de células, enquanto o TNFR-2 tem um papel intracelular durante o processo de estimulação do sistema imune. A principal diferença entre os dois tipos de receptores é a presença do domínio (DD) no TNFR-1, responsável pela ativação da apoptose. Além da sinalização apoptótica, o TNFR-1 é capaz de transduzir sinais de sobrevivência celular (Figura 8) (HORSSSEN et al., 2006).

Após a ligação do TNF α ao receptor TNFR-1 associado ao domínio de apoptose TRADD, as proteínas adaptadoras do receptor que interagem com as proteínas (RIP) se ligam ao fator associado ao TNFR-2 (TRAF-2) e também a proteína *Fas* associada ao FADD. Por sua vez, estas proteínas adaptadoras irão recrutar moléculas-chave que são responsáveis pela sinalização intracelular. O evento final nesta sinalização apoptótica é

a ativação de endonucleases, como EndoG, resultando na fragmentação do DNA. Em paralelo, o TRAF-2 irá iniciar vias de sinalização da transcrição de genes imunomoduladores e pró-inflamatórios, a partir da ativação do fator de transcrição da via cinase (NIK) que inicia uma cascata de reações que resultam na ativação do fator nuclear kB (NF-kB) no núcleo da célula, este por sua vez irá iniciar a proliferação celular (DEVIN et al, 2000; DOLCET et al, 2005; HORSSSEN et al., 2006).

Figura 8 – Via de sinalização do TNF α .



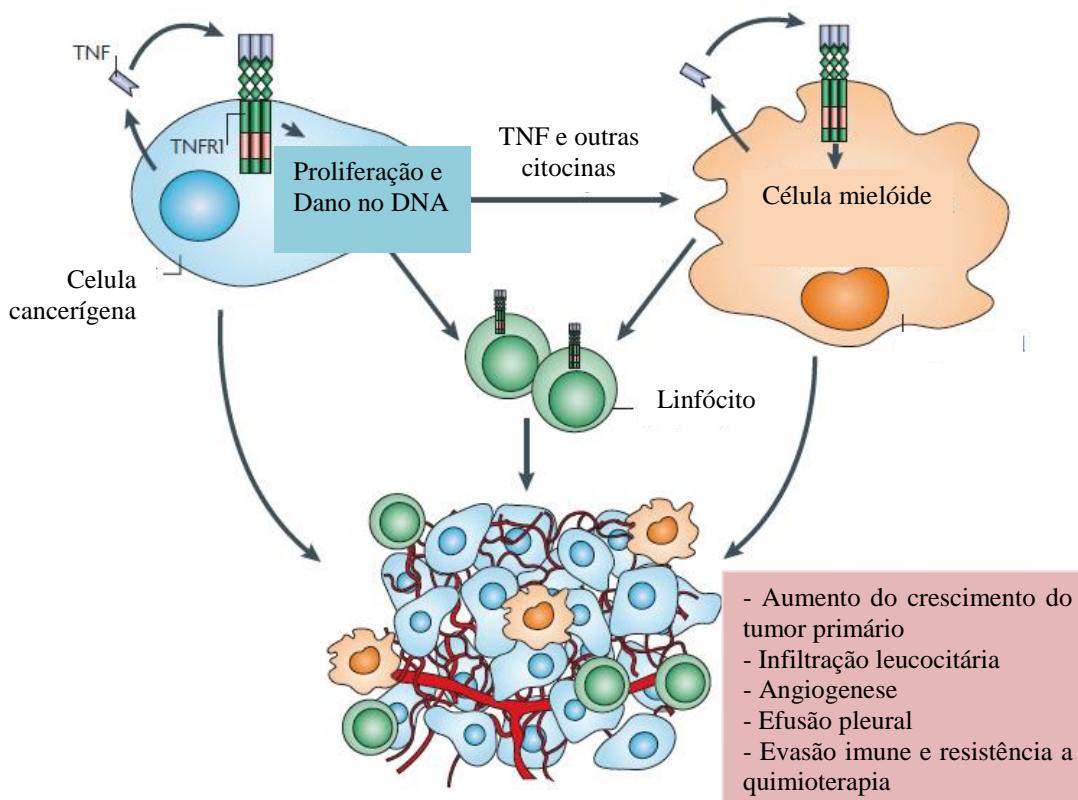
Fonte: Horssen et al. (2006).

O NF- κ B é um importante fator de transcrição nuclear em linfócitos B que está envolvido na promoção da expressão de mais de 150 genes da resposta imune, inflamação e oncogênese. A ativação de NF- κ B não está relacionada somente a eventos da progressão neoplásica, mas está associado também a um mecanismo de resistência

das células neoplásicas aos agentes quimioterápicos anti-neoplásicos. NF-kB não se apresenta constitutivamente ativado em células normais, exceto em linfócitos T e B, monócitos e astrócitos (HORSSSEN et al., 2006).

No microambiente tumoral, o TNF α atua principalmente através do receptor TNFR1 de forma autócrina e parácrina. As ações autócrinas causam mais danos genéticos para as células malignas ou células com potencial maligno, estimulando a remodelação da matriz extracelular e aumentando o crescimento do tumor primário. O TNF α também induz a uma expressão adicional, aumentando a produção de outras citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocina nas células malignas. Esta combinação de citocinas e quimiocinas pode atuar sobre os linfócitos contribuindo para a imunossupressão local e resistência à quimioterapia (Figura 9) (BALKWILL et al., 2009).

Figura 9 – Ativação e função do TNF em microambiente tumoral.



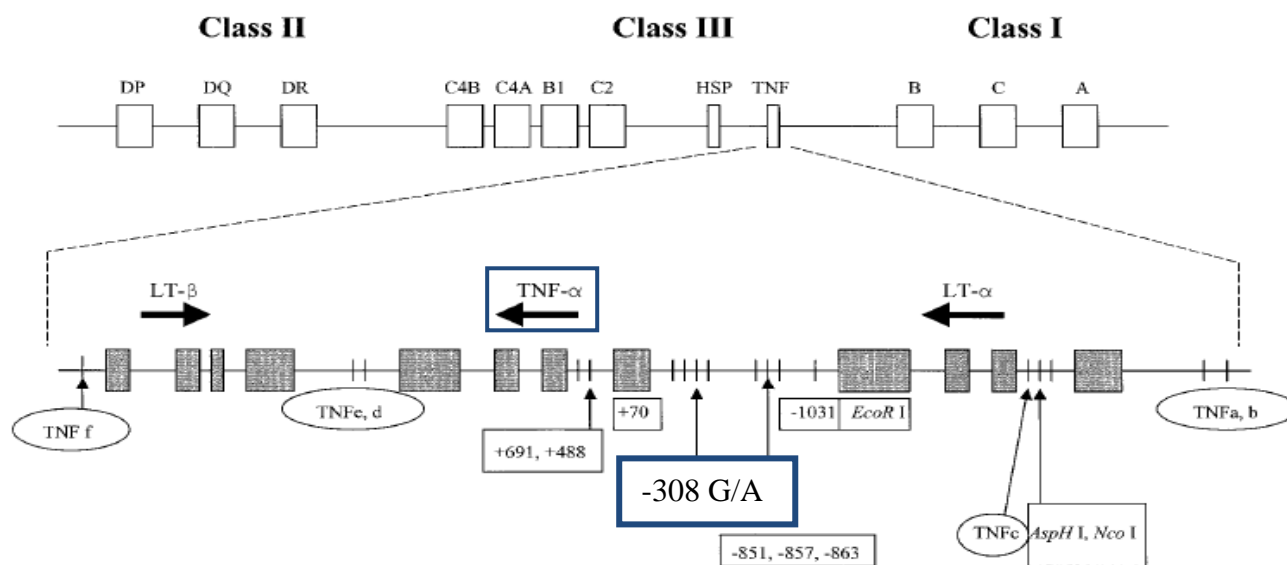
Os patógenos bacterianos induzem a produção de TNF α , através dos receptores *Toll-like* (TLRs) e do NF-kB. Este TNF α irá induzir uma cascata biológica complexa que envolve quimiocinas, citocinas e fator endotelial de aderência, que recruta e ativa os neutrófilos, macrófagos e linfócitos em locais de danos e infecção. A sinalização do TNFR1 é essencial para a defesa contra agentes infecciosos, tais como: *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania spp.*, tripanossomas e *Salmonella spp.* (LOCKSLEY et al., 2001).

O TNF α também é chamado de “pirogênio endógeno” devido ao fato de causar febre. A temperatura corporal elevada é benéfica para as defesas do organismo porque a resposta imune adaptativa se torna mais intensa, e também a maioria dos patógenos cresce menos eficientemente em temperaturas elevadas (LOCKSLEY et al., 2001; BENJAMIN et al. 2007)

A restrição da produção de TNF α pode levar a ineficiência dos mecanismos funcionais, podendo causar inflamação crônica e choque séptico, levando até a uma sepsis sistêmica e falência de órgãos (BALKWILL et al., 2009).

O TNF α é uma proteína de 17-kDa, composta de 157 aminoácidos, formando um homotrímero e é codificada pelo gene *TNF α* , na região 6p21.3. Variações na produção de TNF α podem ser atribuídas ao polimorfismo (rs1800629) na região promotora do gene que consiste na substituição de uma guanina (G) por adenina (A) na posição -308 (Figura 10) (HELLMIG et al., 2005; JRAD et al., 2007).

Figura 10 – Polimorfismo do gene *TNF- α* na região 6p21.3.



Fonte: Tsukamoto et al. (1998) (com adaptações).

O alelo -308A está associado com níveis mais elevados desta citocina (HAJJEER et al., 2001; WUNDERINK et al., 2003) e portadores do genótipo AA tem maior produção de *TNF α* quando comparado ao genótipo GG. Esta elevação pode ter como consequências o agravamento de processos patológicos (WILSON et al., 1997).

2.6.1 Polimorfismos do gene *TNF α* e a LA infantil

Estudos relatam que em indivíduos com quadros infecciosos os níveis séricos de *TNF α* ficam elevados, mesmo em pacientes pediátricos com LLA e neutropenia febril (MAZUR et al., 2004). O estudo de Powers et al (2007), em adultos, descreve a associação entre o polimorfismo -308A/A e a progressão da Síndrome Mielodisplásica (SMD) ($p=0,02$). Parnes et al. (2010) observaram em 328 pacientes adultos com esta doença uma maior expressão de *TNF- α* -308A/A associado com neutropenia ($p = 0,04$)

e a gravidade da anemia, sugerindo que a grande expressão de TNF- α pode suprimir a hematopoiese em pacientes com SMD e agravar a oncogênese.

Wunderink et al. (2003) relatam que pacientes que utilizam quimioterápicos apresentam maior suscetibilidade a diferentes graus de resposta inflamatória pelas infecções e que a presença de alelo -308A pode agravar os sintomas nos pacientes com linfoma.

Foi observada associação entre o polimorfismo G308A e o risco de recaída (alto, intermediário e baixo) quanto aos protocolos de tratamento BFM86 e BFM90 (95% IC=0.53 - 2.56, $p= 0.697$) em pacientes pediátricos com LLA (STANULLA et al., 2001).

Lauten et al (2002) avaliando 135 pacientes pediátricos com LLA não encontraram associação dos polimorfismos -308G/A com o risco de recaída, nem com a resposta a prednisona. No entanto, aqueles pacientes heterozigotos que tinham fatores de risco para recaída, tais como, contagem inicial elevada de leucócitos, imunofenótipo e baixa resposta a prednisona eram maus respondedores, apresentando 14,5 vezes mais chances de recaída ($p<0,03$).

Vários estudos sobre o polimorfismo do gene *TNF α* sugerem uma interrelação entre este gene e a interleucina 10 (IL-10), pelo fato de que estas citocinas possuem a capacidade de alterar o equilíbrio entre as respostas das células Th1 e Th2, podendo contribuir para a patogênese e prognóstico de câncer (BALKWILL et al., 2009; YANG et al., 2011).

2.7 Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 é uma das mais importantes citocinas antiinflamatórias da resposta imune, além de possuir uma importante função como imunomoduladora. É produzida por células T ativadas (Th2), macrófagos e monócitos ativados, células B ativadas e mastócitos. É um potente inibidor de citocinas do perfil Th1, incluindo IL-2 e IFN- γ . Além da inibição destas citocinas, a IL-10 inibe também, a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC), fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), fator inibidor da leucemia (LIF) e fator ativador de plaquetas (PAF). Atua também como fator de crescimento para mastócitos e induz diferenciação e proliferação de linfócitos B, facilitando a resposta imune (POWRIE et al., 1993; SKINNIDER e MAK, 2002).

Nos últimos anos, a IL-10 tem atraído interesse pela sua função de modulador chave da resposta imune inata nos processos inflamatórios, pois vários estudos têm revelado novas funções desta citocina no controle do sistema imune após invasão de microorganismos oportunistas. Há um interesse na identificação de como PRRs (Receptores de Padrões de Reconhecimento) e receptores *Toll-like* (TLRs) coordenam suas ações após detectar microorganismos pela via de ativação Janus quinase – transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK-STAT) (KUWATA et al., 2003; CAREY et al., 2012).

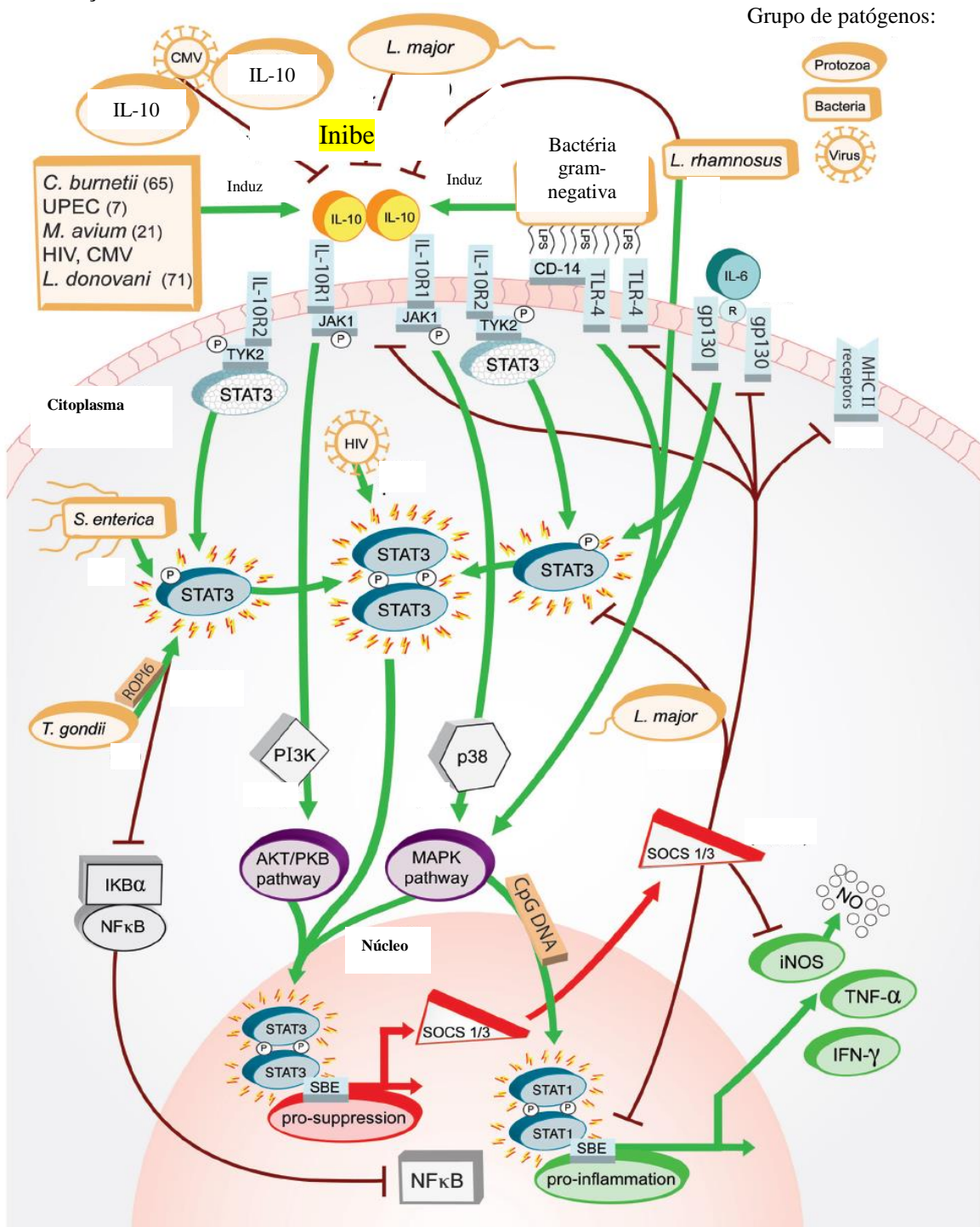
Na via de sinalização JAK-STAT ocorre ligação da IL-10 ao seu receptor celular que induz a dimerização ou polimerização dos receptores na superfície celular. A sinalização inicia-se pela ativação de quinases JAK, uma família de tirosina-quinase citosólicas que interagem com os domínios citoplasmáticos do receptor. Essa interação leva a fosforilação de tirosinas presentes tanto no domínio citoplasmático do receptor

quanto numa família de fatores de transcrição conhecidos como STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Após a fosforilação, esses fatores de transcrição dimerizam e, em seguida, se translocam do citoplasma para o núcleo onde se ligam a regiões de ativação nucleares (BENJAMIN et al., 2012).

A IL-10 se liga ao seu receptor, IL-10R1, com alta afinidade (kd ~ 35-200pM) que utiliza uma subunidade acessória para a sinalização, a IL-10R2. A ativação que acontece após a ligação da IL-10 a seus receptores, ocorre em função da regulação gênica da fosforilação das tirosinas-quinase (JAK) que desencadeia a dimerização de STATs que se deslocam para o núcleo, atuando sobre genes-alvo, que podem inibir a expressão de genes que codificam outras citocinas (HO et al., 1993; SPASOVA et al., 2005; SWIATEK et al., 2012).

Na Figura 11 observa-se a interação de diferentes patógenos na via de sinalização JAK-STAT. O patógeno *T. gondii* ativa a sinalização JAK-STAT com resposta anti-inflamatória, via STAT3 pelos receptores da IL-10, para provocar a supressão na liberação de TNF- α durante a infecção. *C. burnetii*, *M. avium*, *S. agalactiae* e outros microorganismos gram-negativos induzem a síntese de IL-10, em contrapartida os protozoários como *L. major* e *L. rhamnosus* inibem a produção de IL-10. A ativação de IL-6 (pelo receptor gp130), MHC classe II (histocompatibilidade) induzem a ação dos seguintes mediadores: NO (óxido nítrico), TNF α (fator de necrose tumoral alfa) e IFN γ (interferon gama) que irão influenciar na atuação da IL-10 (CAREY et al., 2012).

Figura 11 – Interação entre os microorganismos (protozoário, vírus e bactérias) e a via de sinalização JAK-STAT.

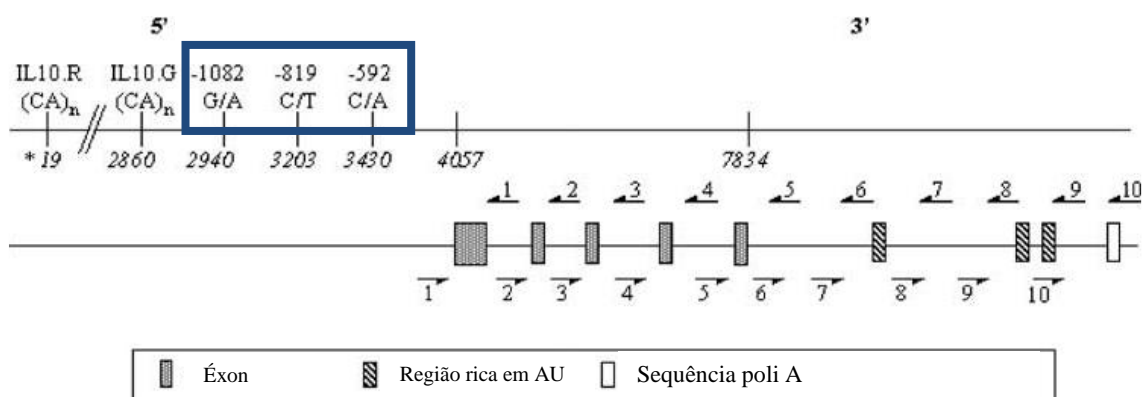


Fonte: Carey et al., 2012

O gene *IL-10* contém cinco éxons e ocupa aproximadamente 5,1 kb entre as regiões 1q31 e 1q32 (ESKDALE et al., 1999). A região promotora do gene *IL-10* possui mais de 100 polimorfismos descritos depositados no banco de dados dbSNP (NCBI,

National Center for Biotechnology Information). Os polimorfismos bem caracterizados na porção proximal da região promotora do gene *IL-10*, por possuírem efeito funcional, encontram-se nas posições -G1082A(rs1800870), -C819T(rs1800871) e -C592A(rs1800872) (Figura 12). Estudos afirmam que uma alteração nesta região promotora modifica o mecanismo de produção e regulação da IL-10 (TURNER et al, 1997; ESKDALE et al., 1999; GIBSON et al., 2001).

Figura 12 – Localização dos polimorfismos do gene *IL-10* na região promotora -1081G/A, -819C/T, -592C/A.



Fonte: Whittington et al., 2003.

O gene *IL-10* possui 3 SNPs na região promotora proximal: -1082(G/A), -819(C/T) e -592(C/A). Na posição -1082 podem ser encontrados os nucleotídeos G ou A; na posição -819 ocorre a transição C/T e na posição -592 C/A. As frequências alélicas para o polimorfismo -1082 têm sido descritas para populações de diferentes etnias. Nas populações caucasóides saudáveis, a frequência do alelo A varia de 0,47 a 0,60 e do alelo G de 0,37 a 0,52. O alelo -592C é bastante frequente em europeus e africanos (0,817 e 0,661, respectivamente), enquanto que em chineses sua frequência é de apenas 0,327. Em irlandeses a frequência do alelo A é 0,183 e em indivíduos de

península arábica a frequência deste alelo é 0,247. Em indivíduos africanos (Zulus), a frequência do alelo A é 0,339 e em uma população do extremo oriente (chineses de Singapura), a frequência alélica é 0,673 (MEENAGH, et al 2002). Visentainer et al (2012) observaram que em duas regiões brasileiras (Maringá e Campinas) há uma maior frequência do alelo A para -1082G/A e do alelo C para -819 e -592.

Os níveis de IL-10 diferem amplamente entre os indivíduos, possivelmente em razão de polimorfismos na região promotora do gene *IL-10* (GAO et al., 2009). Além disso, o fenótipo das células envolvidas nas interações anti-inflamatórias desta citocinas é pouco conhecido, havendo necessidade de estudos que envolvam a investigação da influência destes polimorfismos na expressão desses fenótipos (LU YONG-LIANG et al., 2010).

O genótipo -1082 G/G está associado com alta produção de IL-10 (TURNER et al., 1997; Suarez et al., 2003) e os genótipos -1082 G/A e A/A estão correlacionados com produção intermediária e baixa, respectivamente (TURNER et al., 1997; REUSS et al., 2002). Polimorfismos na posição -819C/T e -592C/A não tiveram nenhuma influência na produção de IL-10 (TURNER et al., 1997). Porém no estudo de Cleirice et al. (1994), há relatos de que os alelos -592A/-819T estejam associados a baixa produção da proteína.

Os alelos T e C na posição -819 do gene *IL-10* estão em desequilíbrio de ligação com os alelos A e C da posição -592, respectivamente, ou seja, esta associação não aleatória de alelos de diferentes regiões de um gene ocorre frequentemente numa população, portanto, suas frequências tem sido descritas por inferência mostrando que estes alelos, -819C/-592C e -819T/-592A, são herdados juntos (TOUNTAS et al., 1996; TURNER et al., 1997; ESKDALE et al., 1999; KOSS et al., 2000; KUBE et al., 2001; LAZARUS et al., 2002).

Uma combinação de alelos destas diferentes regiões do gene *IL-10* é denominada de haplótipo, assim, estes fazem três diferentes haplótipos putativos: GCC (haplótipo de alta expressão de *IL-10*) (TURNER et al., 1997; HAANPAA et al., 2002; KURZAWSKI et al., 2005; OPDAL et al., 2003), ACC e ATA (haplótipos de baixa expressão de *IL-10*) (ESKDALE et al., 1999; LAZARUS et al., 2002; KNAPP et al., 2003)

Eskdale et al (1999) observaram uma variabilidade individual na produção da *IL-10* entre indivíduos de genótipos de alta e baixa produção, podendo atingir diferenças de até dez vezes na produção.

Domènech et al, (2007) observaram que a desregulação da produção de *IL-10* parece desempenhar um papel em doenças linfoproliferativas, tais como linfoma e é hipotetizado que a existência de polimorfismos nas regiões promotoras da *IL-10* (-C819T, -C592A) predispõe para produção de altos níveis desta citocina.

Em estudo de meta-análise, Ding et al (2013) observaram que a presença do polimorfismo -592C/A contribui para a susceptibilidade ao câncer, principalmente câncer gástrico e linfoma não-Hodgkin.

2.7 Polimorfismos do gene *IL-10* e a LA infantil

Pacientes com LA apresentam alteração na distribuição dos leucócitos, tornando-se impossível uma resposta inflamatória satisfatória, mesmo às pequenas infecções. Devido à neutropenia, esses pacientes estão susceptíveis às infecções virais, bacterianas e fúngicas. E a *IL-10* é um importante regulador da proliferação e diferenciação das células B, então, a presença de polimorfismos do gene da *IL-10* podem constituir um marcador de gravidade da resposta à infecção em pacientes leucêmicos, fornecendo

importantes subsídios que podem levar ao monitoramento de infecções e suas implicações durante o tratamento (LUCZYNSKI et al., 2004; DJURDJEVIC et al., 2009). Além disto, a avaliação dos polimorfismos do gene *IL-10* podem constituir um marcador de gravidade da resposta à infecção em pacientes leucêmicos (MCKENNA, 2000).

Com relação ao tratamento quimioterápico, Lauten et al (2002), observaram em 135 crianças com LLA, um efeito protetor da -1082G/G com uma melhor resposta à prednisona ($p=0,049$). Franchimont et al (1999) observaram que a IL-10 elevada pode aumentar a sensibilidade de monócitos humanos à dexametazona e ser um potente regulador de receptores de glicocorticóide.

Sendo assim, a análise de polimorfismos do gene da IL-10 em pacientes com LA pode favorecer uma melhor estratificação do grupo de pacientes bem como promover um melhor direcionamento para o tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a associação entre os polimorfismos das regiões promotoras e estrutural do gene *MBL2* e regiões promotoras dos genes *IL-10* e *TNF α* com os fatores que influenciam na susceptibilidade à infecção em pacientes pediátricos com LA, durante a fase de indução do tratamento quimioterápico no CEONHPE/HUOC/UPE.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência e verificar se há associação entre o polimorfismo da região promotora -221 X/Y, -550 H/L e região estrutural éxon 1 do gene *MBL2* com neutropenia febril, eventos de infecção, idade e risco de recaída na fase de indução do tratamento quimioterápico em pacientes com LA;
- Determinar a frequência e verificar a associação entre o polimorfismo das regiões promotoras -1082 G/A, -819 C/T e -592 C/A do gene *IL-10* com neutropenia febril, eventos de infecção, idade e risco de recaída na fase de indução do tratamento quimioterápico em pacientes com LA;
- Determinar a frequência e verificar a associação entre o polimorfismo -308 G/A da região promotora do gene *TNF α* com neutropenia febril, eventos de infecção, idade e risco de recaída na fase de indução do tratamento quimioterápico em pacientes com LA;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRZARGAR, A. A.; BAGHERI, M.; GHAVAMZADEH, A. et al. Cytokine gene polymorphism in Iranian patients with chronic myelogenous Leukaemia. **International Journal of Immunogenetics**. v32, p167–171, 2005.

ATHALE, U.H.; CHAN, A.K.C. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Part II. Pathogenesis of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: effects of the disease and therapy. **Thromb Res**. v 111,p199-212, 2003

BALKWILL F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**. v 9, 2009.

BARRETO, J. H.; MENDONÇA, N. Diagnóstico precoce do câncer na criança e no adolescente. **Clinica ONCO um recurso da vida**, 2001.

BAZZONI, F.; BEUTLER, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. **N Engl J Med**. v334, p1717–1725, 1996.

BENE, M.C.; CASTOLDI, G.; KNAPP, W. et al. Proposal for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL) **Leukemia**. v9, p1783-86, 1995.

BENJAMIN L, D.; CHEE, K.; TAN, A. et al. Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. **FEMS. Immunol Med Microbiol**.v64, p 295–313, 2012.

BROUWER, N.; FRAKKING, F.; VAN DE WETERING, M. et al. Mannose-binding lectin (MBL) substitution: recovery of opsonic function in vivo lags behind MBL serum levels. **The Journal of Immunology**, v183, p 3496-504, 2009.

CALIGIURI, M.A.; STROUT, M.P.; LAWRENCE, D. et al. Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. **Cancer Res.** v58, p 55–59, 1998.

CALIGIURI, M.A e BLOOMFIELD, C.D. Molecular biology of leukemia. **In:** De Vita Vt Jr, Hellman S, Rosemberg SA, editors. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 2389-404. 2001

CARE, R.S.; VALK, P.J. GOODEVE, A.C. et al. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. **Br J Haematol**; v121, p 775–77, 2003.

CAREY, A.; TAN, C. K.; ULETT, G. C. Infection-induced IL-10 and JAK-STAT: A review of the molecular circuitry controlling immune hyperactivity in response to pathogenic microbes. **Landes Bioscience.** v1, n3, p159–167, 2012.

CARIOLI R.; BEGHINI A.; GRILLO, G. et al. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. **Blood.** v 107, p 3463–68. 2006.

CLARKE, C.A.; GLASER, S.L. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 3;342(5), p 358-9, 2000.

CLERICI, M. et al role of interleukin-10 in T-helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. ***J Clin Invest***; 93:768-75, 1994.

COLBY-GRAHAM, M.F.; CHORDAS, C. The childhood leukemias. ***J Pediatric.*** n.18, p. 87-95, 2003.

COUPER, K.N.; BLOUNT, D.G.; RILEY, E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. ***J Immunol.*** v180, p 5771–5777, 2008.

CRAFT, A.W. Childhood cancer – mainly curable so where next? ***Acta Paediatrica.*** v89, p386–392, 2000

DANILATOU, V.; MANTADAKIS, E.; GALANAKIS, E. et al. Three cases of viridans group streptococcal bacteremia in children with febrile neutropenia and literature review. ***Scand J Infect Dis.*** v35, p 873-6, 2003

DEUS, D. M. V.; SOUZA, P. R. E.; MUNIZ, M.T.C. High FLT3 expression and IL10 (G1082A) polymorphism in poor overall survival in calla acute lymphoblastic leukemia. ***Mol Biol Rep.*** v 40, p1609–1613, 2013.

DEUS, D. M. V.; LUGO, K. A.; MUNIZ, M. T. C. Clinical Study Influence of IL10(G1082A) and TNF α (G308A) Polymorphisms on the Survival of Pediatric Patients with ALL. **Leukemia Research and Treatment**. ID 692348. p1-6, 2012.

DING, Q.; SHI, Y.; FAN, B. et al. The interleukin-10 promoter polymorphism rs1800872 (-592C>A), contributes to cancer susceptibility: meta-analysis of 16,785 cases and 19,713 controls. **Plos One**. v8(2), p 1-9, 2013.

DJURDJEVIC, P.; ZELEN, I.; RISTIC, P. et al. Role of decreased production of interleukin-10 and interferon-gamma in spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia lymphocytes in vitro. **Arch Med Res**. v40, p357-63, 2009.

DEVIN, A.; COOK, A.; LIN, Y. et al. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. **Immunity**. v12, p 419–429, 2000.

DOLCET X, LLOBET D, PALLARES J et al. NF-kB in development and progression of human cancer. **Virchows Arch**. v446, p475–482, 2005.

DOMÈNECH, Y.B., et al., Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. **Haematologica**. v92, p. 1475-1481, 2007.

EDEN, T. Aetiology of childhood leukaemia. **Cancer Treatment Reviews**. v36, p 286–297, 2010.

ESKDALE J, et al. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. **Genes Immun.** v1, n2, p 151-5, 1999.

ESTEY, E.; DÖHNER, H. Acute myeloid leukaemia. **Lancet.** v368, p 1894–907, 2006.

FRAKKING, F.N.J; VAN DE WETERING, M. D.; BROUWER, N.; et al The role of mannose-binding lectin (MBL) in paediatric oncology patients with febrile neutropenia. **European Journal of Cancer.** n 42, p909-916, 2006.

FRAKKING, F. N. J.; BROUWER, N. et al Safety and pharmacokinetics of plasma-derived mannose-binding lectin (MBL) substitution in children with chemotherapy-induced neutropenia. **European Journal of Cancer.** n45, p505-512, 2009

FRAKKING et al. Mannose-Binding Lectin (MBL) and the Risk for Febrile Neutropenia and Infection in Pediatric Oncology Patients With Chemotherapy, **Pediatr Blood Cancer.** v57, p89-96, 2011.

FRANCHIMONT, D; MARTENS, H.; HAGELSTEIN, M.T.; LOUIS, E.; DEWE, W.;CHROUSOS, G.P.; BELAICHE, J.; GEENEN, V. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. **J Clin Endocrinol Metab.** 84: 2834–2839, 1999.

FOSP. FUNDAÇÃO ONCOCENTRO DE SÃO PAULO. Dados epidemiológicos da cidade de São Paulo. 2008.

GABE, C.; ALMEIDA, D.R.; SIQUEIRA,L.O. Avaliação de eventos infecciosos oportunistas em crianças portadoras de leucemias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v31, n2, p 74-79, 2009.

GAO, Q. J. et al. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C vírus infection. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 44, p. 5610-5619, 2009.

GARRED, P.; LARSEN, F.; SEYFARTH, J. et al. Mannosebinding lectin and its genetic variants. **Genes Immun**. n.7, p. 85-94, 2006.

GARRED P, LARSEN F, MADSEN HO, KOCH C. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. **Mol immunol**. v40, p73-84, 2003.

GILLILAND, D.G.; GRIFFIN, J.D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**. v100, p1532-1542, 2002.

GIBSON AW, et al. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. **J Immunol**, v166, p3915-22, 2001.

HAANPAA, M.; NURMIKKO, T.; HURME, M. Polymorphism of the IL-10 gene is associated with susceptibility to herpes zoster. **Scand J Infect Dis**, v. 34, p. 112-114, 2002.

HALLA, M. C.; CARMO, R. F.; VASCONCELOS, L. R. S.; PEREIRA, L. B. Association of hepatitis C virus infection and liver fibrosis severity with the variant alleles of MBL2 gene in a Brazilian population. **Human Immunology**. v 71, p 883–887, 2010.

HAJJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. TNF- α gene polymorphism: clinical and biological implications. **Microscopy Research and technique**. v50, p216-228, 2000.

HEAD, D.R. Classification and differentiation of the acute leukemias. **In: Wintrobe's Clinical Hematology**. GREER, J P; FOERSTER, J; LUKENS, J N; RODGERS, G M; PARASKEVAS, F; GLADER, B. 11th, Bippincott Williams & Wilkins, p. 2063-2076. 2004.

HILDEN, J.M.; DINNDORF, P.A.; MEERBAUM, S.O. et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. **Blood**.v108, p 441–51, 2006.

HO, A.S.; LIU, Y.; KHAN, T.A. et al. A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. **Proc Natl Acad Sci**. v90, p11267-71, 1993.

HORSSSEN, R.; TEN HAGEN, T. L. M.; EGGERMONT, A. M. M. TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. **The oncologist**. v11, p397–408, 2006.

IDSA Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. Institute of Education on January 22, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Instituto Nacional de Câncer-INCA. Rio de Janeiro. p. 146, 2013.

JACK, D. L.; KLEIN, N. J.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunological Reviews**. v 180, p 86–99, 2001.

JONES, G.; KONSLER, G.; PUSEK, S. Infection risk factor in febrile, neutropenic children and adolescents. **Pediatric Hematol Oncol**. n.13, p. 217-229, 1996.

JRAD, B. B. H.; CHATTI, A.; LAATIRI, A. et al. Tumor necrosis factor promoter gene polymorphism associated with increased susceptibility to non-Hodgkin's lymphomas **European Journal of Haematology**, v. 78, no. 2, p. 117–122, 2007.

KILPATRICK, D. C. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. **Transfusion Medicine**. n 12, p 335-351, 2002.

KINLEN, L. Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology. **Oncogene**. v 23, p 6341–6348, 2004.

KLEIN, N.J.; KILPATRICK, D.C. Is there a role for mannan/mannose-binding lectin (MBL) in defence against infection following chemotherapy for cancer? **Clin Exp Immunol**. v138(2), p 202-4, 2004.

KNAPP, S et al. Interleukin 10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. **Immunogenetics**. v. 55,p 362-369, 2003.

KUBE, D et al Simultaneous analysis of interleukin-10 gene microsatellites and single-nucleotide polymorphisms in parallel with tumour necrosis factor and interferon-gamma short tandem repeats by fluorescence-based polymerase chain reaction. **Genes Immun**. v.4, p. 459-468, 2003.

KURZAWSKI, M. et al. Frequencies of the common promoter polymorphisms in cytokines genes in a Polish population. **Int J Immunogenet**, v. 32, p. 285-291, 2005.

KOSS, K.; FANING, G.; WELSH, K. et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in English and Polish healthy controls. Polymerase chain reaction haplotyping using 30 mismatches in forward and reverse primers. **Gene Immun**, v. 1, p. 321-324, 2000.

KUWATA, H.; WATANABE, Y.; MIYOSHI, H.; YAMAMOTO, M. et al. IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages. **Blood**. v102, p 4123-9, 2003.

LAUSEN, B.; SCHMIEGELOW, K.; ANDREASSEN, B.; MADSEN, H. O.; GARRED, P. Infections during induction therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia – no association to mannose-binding lectin deficiency. **Eur J. Haematol.** n. 76, p. 481-487, 2006.

LAUTEN, M.; MATTHIAS, T; STANULLA, M; BEGER, C; WELTE, K; SCHRAPPE, M. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. **Leukemia**, v. 16, n. 8, p. 1437–1442, 2006.

LAZARUS, R.; KLIMECKI, W. T.; PALMER, L. J. et al Single-Nucleotide Polymorphisms in the Interleukin-10 Gene: differences in Frequencies, Linkage Disequilibrium Patterns, and Haplotypes in Three United States Ethnic Groups. **Genomics**. v 80, n 2, p223-228, 2002.

LECH-MARANDA, E.; MLYNARSKI, W.; GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK, O. et al. Polymorphisms of TNF and IL-10 Genes and Clinical Outcome of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. **Genes, Chromosomes & Cancer**. v 52, p287–296, 2013.

LIPSCOMBE, R.J.; SUMIYA, M.; HILL, A.V. et al. High frequencies in African and non-african populations of independent mutation in the mannose binding protein gene. **Hum Mol Genet.** v1, p709-15, 1992.

LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell.** v 104, p487–501, 2001.

LÖWENBERG, B.; GRIFFIN, J.D.; TALLMAN, M.S. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003:82-101.

LUCZYNSKI, W; STASIAK-BARMUTA, A. KRAWCZUK-RYBAK, M et al. Immunologic monitoring of maintenance therapy for acute lymphoblastic leukaemia in children-preliminary report. **Pediatr Blood Cancer.** 2004;42:416-420.

LU YONG-LIANG et al. Allele polymorphisms of interleukin-10 and hepatitis B, C virus infection. **Chinese Medical Journal.** v.123, n. 10, p 1338-134, 2010.

MASCHMEYER, G. Treatment strategies for invasive fungal infections. **Mycoses.** v46; n2, p1-2, 2003.

MAZUR, B.; MERTAS, A.; SON´TA-JAKIMCZYK, D. et al. Concentration of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-ALPHA in children with acute lymphoblastic leukemia after cessation of chemotherapy. **Hematol Oncol.** v 22, p 27–34, 2004.

MCKENNA SJ. Leukemia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v89, p137-9, 2000.

MEENAGH A, et al, Frequency of Cytokine Polymorphisms in Populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. **Human Immunology.** v63, p 1055-1061, 2002.

MENDONÇA, T.F.; OLIVEIRA, M.C.V.C.; VASCONCELOS, L.R.S.; PEREIRA, L.M.M.B. et al. Association of variant alleles of MBL2 gene with vasoocclusive crisis in children with sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases.** v44, p 224–228, 2010.

MITTAL, P.; MEEHAN, K. R. The Acute Leukemias. **Hospital Physician**, May, p37-44, 2001.

MOLLE, I.; PETERSLUND, N.A.; THIEL, S.; STEFFENSEN, R. MBL2 polymorphism and risk of severe infections in multiple myeloma patients receiving high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.** v38(8), p 555-60, 2006

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.** v 19, p 683–765, 2001.

MULLIGHAN, C.G.; BARDY, P.G. Mannose-binding lectin and infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. **Leuk. Lymphoma**. v45, p247–256, 2004.

MORAN, Q.F.B. Importancia del laboratorio en el diagnóstico y pronóstico de leucemia aguda linfoblástica de la infancia. **Acta Pediatr Mex**. v26, n3, p129-36, 2005.

NETH, O.; HANN, I.; TURNER, M.W.; KLEIN, N.J. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. **Lancet**. v358, p614–618, 2001.

NITSCH-SCHMITZ, D.P.; ROHDE, M.; CHHATWAL, G.S. Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. **Thromb Haemost**. v98, n3, p488-96, 2007.

NOWAK-GÖTTL, U.; KENET, G.; MITCHELL, L.G. Thrombosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia: epidemiology, aetiology, diagnosis, prevention and treatment. **Best Pract Res Clin Haematol**. v22(1), p 103-14, 2009.

OPDAL, S. H.; OPSTAD, A.; VEGE, A.; ROGNUM, T. O. IL-10 gene polymorphisms are associated with infectious cause of sudden infant death. **Hum Immunol**. v. 64, p. 1183-2118, 2003.

PARNES, A.; NIKIFOROW, S.; BERLINER, N.; VANASSE, G. Single nucleotide polymorphisms in the human TNF gene are associated with anaemia and neutropenia in

a cohort of patients with de novo myelodysplastic syndrome. **British Journal of Haematology**. v150, p 700–730, 2010.

PETERSEN, S.V.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Mol Immunol**. Aug;38 (2-3):133-49. Review, 2001.

PETERSLUND, N.A.; KOCH, C.; JENSENIUS, J.C.; THIEL, S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. **Lancet**. v358, p637–638, 2001.

PIETERS, R.; SCHRAPPE, M.; DE LORENZO, P. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomise trial.I. **Lancet**.v 370, p 240–50, 2007.

POWRIE, F.; MENON, S.; COFFMAN, R.L. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. **Eur J Immunol**. v23(11), p3043-9, 1993

POWERS, M. P.; NISHINO,H. et al Polymorphisms in TGF and TNF are associated with the myelodysplastic syndrome phenotype. **Arch Pathol Lab Med**. v 131, 2007.

PUI, C.; ROBISON, L. L.; LOOK, T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**. v371, p1030-43, 2008.

PUI C. H.; RELING M.V.; DOWNING, JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*; v350, p 1535–48, 2004.

REUSS, E. et al Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors-a twin study. **Genes Immun**, v. 3, p. 407-413, 2002.

RUBNITZ, J. E. How I treat pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, n 25, v 119, 2012.

SACHS, L. The adventures of a biologist: prenatal diagnosis, hematopoiesis, leukemia, carcinogenesis, and tumor suppression. *Adv Cancer Res.* 66:1-40. Review, 1995.

SESPE. Secretaria de Saúde de Pernambuco. Levantamento dos casos de câncer no estado de Pernambuco. 2008.

SUAREZ, A. et al. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. **Transplantation**, v.75, p. 711-717, 2003.

SUMMERFIELD, J. A. Clinical potential of mannose-binding lectin-replacement therapy. **Biochemical Society Transactions.** v 31, part 4, 2003.

STELIAROVA-FOUCHER, S C; KAATSCH, P.; BERRINO, F. et al. Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and

adolescents in Europe since the 1970s (the ACCISproject): an epidemiological study. **Lancet**. 11-17;364(9451):2097-105, 2004.

SCHNITTGER, S.; BACHER, U.; KERN, W.; HAFERLACH, C.; HAFERLACH, T. JAK2 seems to be a typical cooperating mutation in therapy-related t(8;21)/AML1-ETO-positive AML. **Leukemia**. v21(1), p 183-4. 2007.

SCHNITTGER, S.; KOHL, T.M.; HAFERLACH, T. et al. KIT-D816 mutations in AML1-ETO positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. **Blood**. v107, p 1791-99, 2006.

SKINNIDER, B.F.; MAK, T.W. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. **Blood**. v 15, n 99(12), p 4283-97, 2002.

SUMMERFIELD JA. Clinical potential of mannose-binding lectin-replacement therapy. **Biochem Soc Trans**. v31, p770-3, 2003.

SPASOVA, M.I.; TERZIEVA, D.D.; TZVETKOVA, T.Z. et al. Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, and C-reactive protein in febrile neutropenia in children with malignant diseases. **Folia Med (Plovdiv)**. v47, p46-52, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA.SOBOPE. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância-GBTLLA-1999. Campinas; 2000.

SWIATEK, B.J. Is interleukin-10 gene polymorphism a predictive marker in HCV infection? **Cytokine Growth Factor**. v23, p 47-59, 2012.

STANULLA, M.; SCHRAUDER, A.; WELTE, K.; SCHRAPPE, M. Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genetic polymorphisms and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study of patients treated with BFM therapy. **BMC Blood Disorders**, v 1, n 2, 2001.

TALLMAN MS. New strategies for the treatment of acute myeloid leukemia including antibodies and other novel agents. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2005:143-50.

TOUNTAS, N. A.; COMINELLI, F. Identification and initial characterisation of two polymorphisms in human interleukin-10 promoter. **Eur Cytokine Netw**. v. 7, p. 578, 1996.

TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today**.17:532-540. 1996

TURNER, M.W. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. **Immunobiol**.199:327-339. 1998

TURNER, D.M.; WILLIAMS, D.M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, M.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet**, v. 24, p. 18, 1997.

TSUKAMOTO, K.; OHTA, N.; SHIRAI, Y.; EMI, M. A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNFA alpha) locus. **J Hum Genet.** v43, p278–279, 1998.

VANSKA, M.; KOIVULA, I.; JANTUNEN, E. et al. IL-10 combined with procalcitonin improves early prediction of complications of febrile neutropenia in hematological patients. **Cytokine.** v60, p787-792, 2012.

VISENTAINER, J. E. L.; SELL, A. M; SILVA, G.C et al. TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. **International Journal of Immunogenetics.** v35, p287–293, 2008.

VEERMAN, A.J.; KAMPS, W.A.; VAN DEN BERG, H.; VAN DEN BERG, E. et al. Childhood Oncology Group Dexamethasone-based therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the prospective Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) protocol ALL-9 (1997-2004). **Lancet Oncol.** v10(10), p 957-66, 2009.

WANG, C.Y.; CUSACK, J.C.; LIU, R et al. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. **Nat Med.** v5, p412–417, 1999.

WHITTINGTON, H.A.; FREEBURN, R.W.; GODINHO, S.I.H. et al. Analysis of an IL-10 polymorphism in idiopathic pulmonary fibrosis. **Genes and Immunity.** v 4, p258–264, 2003.

WILSON, A.G.; SYMONS, J.A.; MCDOWELL, T.L. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proc Natl Acad Sci.** v94, p3195–9, 1997.

WITTE, T.; OOSTERVELD, M.; SPAN, B.; MUUS, P.; SCHATTENBERG, A. Stem cell Transplantation for leukemias following myelodysplastic syndromes or secondary to cytotoxic therapy. **Rev Clin Exp Hematol.** v 6, p72-85, 2002

WUNDERINK, R.G. Science review: genetic variability in the systemic inflammatory response. **Clinical Care.** v7, p308-314, 2003.

YANG, Y.; LUO, C.; FENG, R et al. The TNF- α , IL-1B and IL-10 polymorphisms and risk for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. **J Cancer Res Clin Oncol.** v137, p 947–52, 2011.

YAO, C.J.; DU, W.; CHEN, H.B. et al. Association of IL-10 Gene Polymorphism with Acute Myeloid Leukemia in Hunan, China. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.** v 14, p2439-42, 2013.

YOUNG, B.S.; MANTEL, C.; BROXMEYER, H.E. Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. **Immunol Rev.** v 17, p 150–74, 2000.

ZHOU, P.; GUO-QIANG LV; WANG, J.; CHENG-WAN LI et al. The TNF-Alpha-238 Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-Analysis. **Plos one.** v 6, i 7, p 1-5, 2011.

5. MANUSCRITOS

5.1 *MBL2* POLYMORPHISMS DO NOT INFLUENCE INFECTIONS IN PEDIATRIC PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA

5.2 LACK OF ASSOCIATION BETWEEN *IL-10* AND *TNF α* POLYMORPHISMS AND FACTORS RELATED TO SUSCEPTIBILITY TO INFECTION IN PEDIATRIC PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA

MANUSCRITO 1**5.1 *MBL2* POLYMORPHISMS DO NOT INFLUENCE INFECTIONS
IN PEDIATRIC PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA**

Artigo submetido a *Molecular Biology Report*
Fator de impacto 2.506 (B1 – Biotecnologia)

***MBL2* polymorphisms do not influence infections in pediatric patients with acute leukemia**

Lidiane Regia Pereira Braga de Britto^{1,3,4}, Tassia Cristina da Silva^{1,2,3}, Karine Eboli Lopes^{1,2,3}, Ednalva Pereira Leite³, Maria Tereza Cartaxo Muniz^{1,2,3,4}, Maria do Socorro Mendonça Cavalcanti^{1,2,4}

¹Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Pediatric Oncohematological Center, Oswaldo Cruz University Hospital, Recife, Pernambuco, Brazil

³Postgraduate Program RENORBIO, Brazil

Abstract: Patients under treatment for acute leukemia (AL) can develop infection during the 50 days of the induction phase of chemotherapy, in part, this is a consequence of the state of neutropenia, which occurs during this period. With a deficient immune system, increases the susceptibility to infections, which are important causes of morbidity and mortality. The presence of polymorphisms, mostly the ones with single nucleotide (SNPs) in promoter and structural regions of genes that encode proteins of the immunological system are responsible for alterations in the production of important proteins that participate in the pathogen recognition, such as mannose binding lectin (MBL). The objective of this study was to verify the association between the polymorphisms of the promoter region -550 (alleles H/L), -221 (alleles Y/X) and structural exon 1 (alleles A/O) of *MBL2* gene with susceptibility to infections in pediatric patients with acute leukemia during the induction phase of chemotherapy. The identification of polymorphisms of exon 1 was performed through real-time PCR with melting temperature analysis and polymorphisms in the promoter region at positions -221 and -550 were identified by qPCR using labeled probes (Taqman®). 225 patients with AL in treatment were evaluated CEONHPE/HUOC-UPE, 189 of them had ALL and 36 AML. Regarding the factors related to susceptibility of infection, in 225 patients with AL, no association was found between the genotypes of three polymorphic

regions of the *MBL2* gene when analyzed for the presence/absence of febrile neutropenia (-550 H/L- p=0.912, -221 X/Y- p=0.471, exon 1 A/O -p=0.138), number of infectious events (-550 H/L- p=0.912, exon 1 A/O - p=0.741) and risk of relapse (-550 H/L (p=0.588), exon 1 A/O (p=0.882) for the disease. However, it was observed an association between the genotype AO from exon 1, and patients under 10 years old, in ALL (p=0.038) as well as in AL (p=0.027). These results suggest that there is no association between the polymorphisms of the *MBL2* gene with infectious events and febrile neutropenia in pediatric patients with AL, and that the genotype AO corresponding to the phenotype of MBL oligomerization deficiency, was associated with patients under 10 years old, thus being able to determine impairment of immunity.

Keywords: infections, polymorphism, *MBL2*, acute leukemia, febrile neutropenia

Introduction

Leukemia is a malignant neoplasm that affect leukocytes, characterized by abnormal proliferation of blast cells of myelocytic or lymphocytic lineage in the bone marrow and peripheral blood which tend to replace normal leukocyte cells, differing in their clinical aspects, as well as in the course of disease and response to treatment [1]. Acute leukemia (AL) may have lymphoid (ALL) or myeloid (AML) origins, being ALL and AML more prevalent in childhood (85% of cases) and in adults (80% of cases), respectively [2, 3]. ALL and AML pediatric patients can develop, immunosuppression during the first 50 days of treatment, because of the glucocorticoids drugs [4-7]. Also, chemotherapy causes neutropenia and a greatly increased susceptibility to infection. Infectious complications are the main cause of morbidity and mortality in AL. It has been estimated that up to 50% of patients suffer of recurrent infections, especially involving mucous membranes [8].

The pathogenesis of infection in AL is multifactorial, but cell-mediated immunity and complement activity have been correlated to the immunodeficiency status. Genetic variation of innate immunity components may influence infection susceptibility [9,10].

The mannose-binding lectin 2 (*MBL2*) gene is a member of the innate immune system and encoded the MBL protein that plays an important role in the identification of pathogens as a pattern recognition molecule, leading to opsonization and activation of the complement system [7]. This gene is localized in the chromosome 10 (10q11.2-11) [8] and single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 1 of *MBL2* present allelic variant B at codon 54 (G54D, rs1800450), variant C at codon 57 (G57E, rs1800451) and variant D at codon 52 (R52C, rs5030737), collectively termed as allele “O”, while the wild-type allele is called “A”.

Additionally, two relevant SNPs in the promoter region at positions -550 (H/L) and -220 (X/Y) have been identified as regulators of protein expression [11-13]. All three alleles (H, X and O) have a profound dominant effect on the level of MBL in serum, even in the heterozygous situation, by decreasing the level of functional MBL in approximated 90% [6-7]. A poorly defined proportion (roughly 10%) of the population with the lowest MBL concentration is thought to be MBL insufficient and more vulnerable to a variety of infections and noninfectious disorders [14]. The opsonic defect could be found in a 5-8% proportion of apparently healthy population [15]. Several reports have suggested that MBL is also an important predictor of infection among patients who received chemotherapy [16-18].

More than a decade ago, Neth et al [16] found that the duration of febrile neutropenic episodes in children with cancer on chemotherapy is longer in O alleles carriers, compared to wild-type homozygotes. Schlapbach et al [19] found that very low

MBL levels are associated with more frequent febrile neutropenia episodes, mainly due to severe bacterial infections. Huh et al. [20] analyzed 266 adult with sepsis and observed that the genotype AA for exon 1 ($p=0.001$) and H/H -550 ($p=0.025$) were associated with the progression to severe sepsis and septic shock.

Thus, the AA allele can confer the phenotype disadvantages in some circumstances such as in sepsis. Accumulating evidence indicates that loss MBL protein function resulting from polymorphisms in the *MBL2* gene, is one of the most common genetic influence on immune response; this has been associated with recurrent episodes of infection in several diseases, including hematological malignancies [16-19]. Therefore, is relevant to understand the role of MBL in the process of infection in immunosuppressed patients and to contribute to the immunological monitoring of that patients during chemotherapy treatment.

The aim of this study was to verify the possible association between the polymorphisms in the promoter -550 (alleles H/L), -221 (alleles Y/X) and exon 1 (alleles A/O) structural regions of *MBL2* gene with the susceptibility to infections in pediatric patients with acute leukemia during the induction phase of chemotherapy.

Material and Methods

Patients and sample

In this study, the group was composed of 225 (aged ≤ 18 years) pediatric patients, with acute lymphoblastic leukemia ($n=189$) and acute myeloid leukemia ($n=36$), from the Centro de Oncohematologia Pediátrica - Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), Recife, Brazil, since January/2004–December/2013. Clinical characteristics of patients (including occurrence of infections) were obtained through the medical files. Patients were classified with febrile neutropenia according IDSA [20]. The febrile neutropenia

fever was defined as a single oral temperature of $\geq 38.3^{\circ}\text{C}$ or an oral temperature of $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ that persists for over than one hour and neutropenia was defined as an absolute neutrophil counts (ANC) $\leq 1500 \text{ cell}/\text{mm}^3$. The number of infections was defined on the basis of positive blood culture performed during the period of induction treatment. The treatment was in accordance with the protocols for the treatment of childhood acute leukemia (GBTLI99-protocol of Brazilian group for treatment of lymphoblastic leukemia in childhood and BFM 2002 - International Berlin-Frankfurt-Muenster Study Group)[22,23]. The study has been approved by the Ethics Committee for human research of the Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil (CAAE: 0186.0.106.000-10) and informed consent was obtained from patients or parents.

Extraction of genomic DNA and genotyping of *MBL2* gene

The DNA was obtained from bone marrow and peripheral blood leucocytes samples by the phenol-chloroform technique, according to Sambrook and Russel [24]. The *MBL2* SNPs -550 and -221, and exon 1 were genotyped using Rotor Gene-6000 apparatus (Corbett Research, Sydney, Australia). The fluorophore SYBR GREEN® was utilized in the assay for exon 1 polymorphism (A/O), in accordance with Hladnik et al [25]. The primers used for exon 1 genotyping were as follows: forward primer: 5'-AGGCATCAACGGCTTCCCA-3'; reverse primer: 5'-CAGAACAGCCCAACACGTACCT-3'. Melting curve profiles were obtained using the dissociation software of the Rotor Gene-6000. All three variant alleles of exon 1 were grouped as allele O, whereas the wild-type allele was called A. The promoter polymorphisms were detected using Taqman® SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Applied Biosystems, Foster City, CA), the primers and probes used were as follows: (-550) 5'-CCAACGTAGTAAGAAATTTCCAGAGA- 3' forward; 5'-

CAACCCAGCCCAGAATTAAGT- 3' reverse; and (-550): 5'-VIC-CCTGTCTAAAACACC-MGB -3' (allele L), 5'-FAM-AGCCTGTGTAAAAC-MGB-3' (allele H); and (-221) 5'-GCACGGTCCCATTGTTCTCA-3' forward; 5'-GCGTTGCTGCTGGAAGACTATAAA-3' reverse; (-221) 5'-FAM-CATGCTTTCCGTGGCAGMGB- 3' (allele Y), 5'-VIC-CATGCTTTCCGTGGCAG-MGB-3' (allele X), respectively.

Statistical analysis

The differences in genotypes from each polymorphic position were assessed by G Williams Test using the BioEstat version 6.0 (Brazil), with the level of significance at $p \leq 0.05$. For each SNP, we did unconditional logistic regression to compute odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI). We tested a different genetic additive model (Cochran–Armitage test). Hardy–Weinberg equilibrium was tested for each SNP by comparing observed with expected frequencies using a χ^2 test. The difference was considered statistically significant when the p value was ≤ 0.05 .

Results

In the present study, of 225 pediatric patients with acute leukemia, which 189 (84%) presented ALL and 36 (16%) AML. From this total, 54% are male. The table 1 describes the clinical characteristics of the patients, and we observe that 121/189 (64%) and 26/36 (72%) of the patients with ALL and AML, respectively, presented febrile neutropenia. In relation to the number of infections 110/187 (59%) of patients with ALL and 20/36 (56%) with AML presented more than two infectious event during the induction phase of treatment. 108/179 (60%) of the patients with LLA evaluated presented age less than 10 years and 124/151 (82%) of the patients at high risk for

relapse. When we analyze the types of pathogens associated with infections during the induction phase of chemotherapy in patients with AL, it was observed that the most frequent gram-negative pathogens was *Klebsiella pneumoniae* (16%) and among the gram-positive, the *Staphylococcus epidermis* (31%) (Table 2). Regarding to the distribution of *MBL2* polymorphisms gene, the study population is in Hardy-Weinberg equilibrium as to the polymorphisms of exon 1 and -221, -550 of the promoter region of this gene. In the patients with AL, no association was found between the polymorphisms -550 H/L, -221 X/Y of promoter region and exon 1 A/O of structural region of *MBL2* gene with febrile neutropenia, number of infections and the risk of relapse (Table 3). However, an association was found between the genotype AO in the group of patients with AL under 10 years old ($p=0.038$) (Table 4). In relation to the patients with ALL also was not found an association between polymorphisms of promoter region (-550 H/L, -221 X/Y) and the exon 1 with febrile neutropenia, number of infections and the risk of relapse. In the same way, the association was found between the genotype AO in the group of patients with ALL with age less than 10 years ($p=0.027$) (Table 5).

Discussion

In the present study we evaluated a total of 225 pediatric patients with acute leukemia, from these 84% presented ALL and 54% were male. Regarding the gender, the data of this study are consistent with those presented by Gabe et al. [26] which showed that leukemia are more common in males, but the reasons for this are unknown, it can be linked to genetic or hormonal factors. In the present study we observed that febrile neutropenia was present in 64% of the patients with ALL and 72% with AML during the induction phase of chemotherapy. Lausen et al. [8] studying 137 children

with ALL observed a high frequency of febrile neutropenia ($p > 0.001$) in the group of children with age < 2.5 years when compared to the group with age > 2.5 years. Frakking et al. [27] observed that in 110 children with ALL in chemotherapy treatment, 61% presented severe neutropenia (< 100 cell/ μ L). In this study we found that 59% with ALL and 56% with AML presented more than two infectious events during the induction period of chemotherapy. Our findings corroborate with those founded by Lausen et al. [8] who observed a high number of events of infection ($p = 0.025$) in children with ALL. Schlapbach et al. [19] and Ghazi et al. [28] observed a high frequency of episodes of infection in pediatric oncology patients during chemotherapy and also an association with the low serum levels of MBL.

As for the pathogens identified from the results of blood culture described in the medical records, the data obtained are consistent with the IDSA [21] which reports that pediatric patients with acute leukemia have presented infection with the most common causative agents the *Klebsiella sp.* and *Staphylococcus sp.* According to Viscoli et al. [29] these bacterias are endogenous, presents in the microbiota of the body and the predominance of these is justified by immunosuppression and the constant utilization of catheters in patients on chemotherapy. Furthermore, the large use of catheters predisposes the occurrence of local infections and septicemias by *Staphylococcus sp.* coagulase-negative and *S.aureus*, besides the gram-negative commonly associated to the longer time to permanence [30].

The genotype of the three polymorphic regions of the *MBL2* gene (-550 H/L,-221X/Y, exon 1 A/O) were not associated to the patients that have AL and ALL with febrile neutropia, number of infectious events and relapse risk. Lausen et al [8] also did not find an association between the MBL deficiency and the frequency of infections in

children in the phase of induction. Rubnitz et al [31] did not find association between low MBL serum levels and the infection in pediatric patients with acute leukemia.

The literature reports that severe immunosuppression in patients with acute leukemia submitted to chemotherapy can have reduced function of MBL, since there will be a lower amount of functional phagocyte cells, consequently an opsonization deficit mediated by MBL [32,33]. Frakking et al. [34] in a study of meta-analysis suggest that the non-association between infection and *MBL2* polymorphisms in pediatric oncology patients during chemotherapy may be explained by the decrease of the phagocytic activity in consequence of neutropenia which leads to impaired immunity and increased susceptibility to infection. Nitsche-Schmitz et al.[35] also explain that the heterogeneity results in the literature about infection resulting MBL deficiency can be explained by the fact that some microorganisms are intracellular facultative pathogens, who suffers the action of the innate immune system only when exposed to the extracellular environment, this also can influence not only the bacterial persistence, but also the progression of infections. In the present study we found an association between the genotype AO and the group of patients with AL and ALL under 10 years old ($p=0.038$ and $p=0.027$, respectively). These results are in agreement with the association that Schmiegelow et al. [9] that found low production of functional MBL genotypes (exon 1 A/O) in ages from 2 to 7 years in ALL patients. Turner et al [36] related that children with age between 6 to 24 months do not have a proper mechanism of MBL opsonization due to the innate immune system that is still in phase of maturation. Viscole et al [29], Hartel et al [37] e Jones et al [38] described that the age and type of tumor are relevant risk factors to febrile neutropenia in pediatric oncology patients. Frankking et al [34] observed that the association between MBL deficiency and the increased risk of infection in pediatric patients with cancer must be

considerated depending on the stratification of age, tumor type and intensity of chemotherapy. Finally, ours results show an association of the AO genotype that determines a low production of functional MBL in the group of patients with AL and ALL under the age of ten years. Furthermore, these data need to be evaluated in association with the determination of MBL serum concentrations in different phases of the chemotherapy, tumor type, stratification by age and type of chemotherapy, so we can assess the actual role of these polymorphisms in susceptibility to infections in these group of patients.

Acknowledgments

We thank the patients and their families, whose collaboration and understanding have made this work possible. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank the clinical support of Dr. Ednalva Pereira Leite (CEONHPE) and Dr. Vera Lúcia Lins de Morais (CEONHPE).

References:

1. Pui C. H.; Relling M.V.; Downing, Jr. (2004) Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*; v350, p 1535–48,
2. Colby-Graham, M.F.; Chordas, C. (2003) The childhood leukemias. *J Pediatric*. n.18, p. 87-95, 2003.
3. Pui, C.; Robison, L. L.; Look, T. (2008) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 371:1030-43.
4. Sumiya M, Super M, Tabona P (1991) Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 337:1569-1570.

5. Mayani H. (1996) Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leuk.* 10:1041-1047.
6. Turner MW. (1996) Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today.* 17:532-540.
7. Turner MW. (1998) Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunobiol.* 199:327-339.
8. Lausen, B.; Schmiegelow, K.; Andreassen, B.; Madsen, H. O.; Garred, P. (2006) Infections during induction therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia – no association to mannose-binding lectin deficiency. *Eur J. Haematol.* 76: 481-487.
9. Schmiegelow, K. Garred, P.; Lausen, P. B.; Andreassen, B.; Petersen, B. B. L.; Madsen, H. O. (2002) Increased frequency of mannose-binding lectin insufficiency among children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 10:100:3757-3760.
10. Kilpatrick, D. C. (2002) Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1572: 401-413.
11. Madsen HO, Satz ML, Høgh B, et al. (1998) Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol.* 161:3169-3175.
12. Eisen DP, Minchinton RM. (2003) Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 37:11:1496-505.
13. Berning T, Breunis W, Brouwer N, et al. (2005) An analysis of genetic variation across the MBL2 locus in Dutch Caucasians indicates that 3' haplotypes could modify circulating levels of mannose-binding lectin. *Human Genet.*; 118:404-415.
14. Hansen S, Holmskov U. (1998) Structural aspects of collectins and receptor for collectins. *Immunobiol.* 199:165-189.

15. Madsen HO, Garred P, Thiel S, et al. (1995) Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol.* 155:3013-3020.
16. Neth O, Hann I, Turner MW, et al. (2001) Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: A prospective study. *Lancet.*358:614-618.
17. Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, et al. (2001) Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet.*358:637-638.
18. Mullighan CG, Heatley S, Doherty K, et al. (2002) Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood.*;99:3524-3529.
19. Schlapbach, L.J.; Aebi, C.; Otth, M.; Luethy, A.R.; Leibundgut, K.; Hirt, A.; Ammann, R.A. (2007) Serum levels of mannosebinding lectin and the risk of fever in neutropenia pediatric cancer patients. *Pediatr Blood Cancer.*49:11-16.
20. Huh, J. W.; Song, K.; Yum, J.; Hong, S.; Lim, C.; Koh, Y. (2009) Association of mannose-binding lectin-2 genotype and serum levels with prognosis of sepsis. *Critical Care.*13:6:2-9.
21. IDSA Guideline 2010. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. Institute of Education on January 22, 2011.
22. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância-GBTLI-LLA-1999, 2000.

23. ALL IC-BFM 2002. A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. Final Version of Therapy Protocol from May 3, 2002.
24. Sambrook J, Russel D. (2002) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. 3:2344.
25. Hladnik U, Braida L, Boniotto M, Pirulli D, Gerin F, Amoroso A, Crovella S. (2002) Single-tube genotyping of *MBL-2* polymorphisms using melting temperature analysis. Clin Exp Med. 2:105-108.
26. Gabe, C.; Almeida, D.R.; Siqueira, L.O. (2009) Avaliação de eventos infecciosos oportunistas em crianças portadoras de leucemias. Rev Bras Hemat Hemot. 31:2: 74-79.
27. Frakking, F.N.J; Van de Wetering, M. D.; Brouwer, N.; Dolman, K. M.; Geissler, J.; Lemkes, B.; Caron, H. N.; Kuijpers, T.W. (2006) The role of mannose-binding lectin (MBL) in paediatric oncology patients with febrile neutropenia. European Journal of Cancer. 42:909-916.
28. Ghazi, M.; Isadyar, M.; Gachkar, L.; Mahmoudi, S.; Goudarzi, H. Eslami, G.; Pourakbari, B.; Fallah, F. (2002) Serum levels of mannose-binding lectin and the risk of infection in pediatric oncology patients with chemotherapy. J Pediatr Hematol Oncol. 34:2.
29. Viscoli C, Varnier O, Machetti M. (2005) Infections in patients with febrile neutropenia: Epidemiology, microbiology, and risk stratification. Clin Infect Dis 40:S240–S245.
30. Donowitz G.R. (2001) Infections in the neutropenic patient -new views of an old problem. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 113-39.

31. Rubnitz, J.E.; Howard, S.C.; Willis, J.; Pui, C.H.; Pounds, S.; Hayden, R.T. (2008) Baseline mannose binding lectin levels may not predict infection among children with leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 50:866-868.
32. Bergman et al. (2003) Low levels of mannose-binding lectin do not affect occurrence of severe infections or duration of fever in acute myeloid leukaemia during remission induction therapy. *Eur J Haematol* 70:91–97.
33. Vekemans M, Robinson J, Georgala A, Heymans C, Muanza F, Paesmans M, (2007) Low mannose-binding lectin concentration is associated with severe infection in patients with hematological cancer who are undergoing chemotherapy. *Clin Infect Dis*. 44(12):1593-601.
34. Frakking, F.N.; Israëls, J.; Kremer, L.C.; Kuijpers, T.W.; Caron, H.N.; Van de Wetering, M.D. (2011) Mannose-Binding Lectin (MBL) and the Risk for Febrile Neutropenia and Infection in Pediatric Oncology Patients With Chemotherapy, *Pediatr Blood Cancer*.57:89-96;
35. Nitsche-Schmitz DP, Rohde M, Chhatwal GS. (2007) Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. *Thromb Haemost*. 98(3):488-96.
36. Turner, M.W.; Super, M.; Singh, S.; Levinsky, R.J. (1991) Molecular basis of a common opsonic defect. *Clin Exp Allergy* 21:182–188.
37. Hartel, C.; Deuster, M.; Lehrnbecher, T.; Schultz, C. (2007) Current approaches for risk stratification of infectious complications in pediatric oncology. *Pediatr Blood Cancer*. 49:767–773;
38. Jones, G.; Konsler, G.; Pusek, S. (1996) infection risk factor in febrile, neutropenic children and adolescents. *Ped Hematol Oncol*. 13: 217-229.

Table 1 – Clinical characteristics of pediatric patients with AL during the induction phase of chemotherapy treatment

Risk factor	AL	
	ALL	AML
Febrile Neutropenia	N = 189	N=36
Presence	121(64%)	26(72%)
Absence	68(36%)	10(28%)
Infections number	N = 187	N = 36
<2	77(41%)	16(44%)
≥2	110(59%)	20(56%)
Age	N = 179	N = 34
<10 years	108(60%)	17(50%)
≥10 years	71(40%)	17(50%)
Risk of relapse	N = 151	N = 35
High risk	124(82%)	09(26%)
Low risk	27(18%)	26(74%)

Table 2 - Frequency of pathogens in patients with AL and infection during the chemotherapy.

Pathogens	Frequence (n=105)
Gram negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i>	05%
<i>Klebsiella sp.</i>	10%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	07%
<i>Klebsiella pneumoneae</i>	16%
<i>Acinetobacter sp.</i>	11%
<i>Serratia marcescens</i>	05%
<i>Proteus mirabilis</i>	01%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	01%
Gram positive bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i>	10%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31%
<i>Staphylococcus coagulase negative</i>	01%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	01%
<i>Streptococcus viridans</i>	01%

Table 3 – Association of polymorphism -550, -221 of the promoter region and exon 1 of *MBL2* gene with febrile neutropenia, number of infections, age and risk of relapse in pediatric patients with AL.

<i>MBL2</i> Genotypes	Febrile neutropenia		p*	OR	95% IC	p**
	Presence n=147 (%)	Ausence n=78 (%)				
-550H/L						
HH	13(09%)	07(09%)	0.912	1	REFERENCE	NA
HL	57(39%)	34(44%)		0.903	0.328-2.484	0.954
LL	77(52%)	37(47%)		1.120	0.412-3.043	0.972
HL/LL	134(91%)	71(91%)		1.016	0.388-2.661	0.831
-221 X/Y						
XX	01(01%)	02(3%)	0.471	1	REFERENCE	NA
XY	46(31%)	30(38%)		3.067	NA	0.733
YY	100(68%)	46(59%)		4.348	0.384-49.177	0.505
XY/YY	146(99%)	76(97%)		3.842	0.343-43.051	0.574
Éxon 1 A/O						
AA	87(59%)	38(49%)	0.138	1	REFERENCE	NA
AO	49(33%)	37(47%)		0.578	0.326-1.025	0.082
OO	11(07%)	03(04%)		1.661	0.422-6.069	0.697
AO/OO	60(41%)	40(51%)		0.655	0.377-1.138	0.173
Infections number						
<i>-550H/L</i>	< 2	≥ 2	p*	OR	95% IC	p**
	n=93(%)	n=130 (%)				
HH	08(09%)	12(09%)	0.927	1	REFERENCE	NA
HL	40(43%)	50(38%)		1.200	0.447-3.218	0.909
LL	45(48%)	68(52%)		0.992	0.376-2.620	0.816
HL/LL	85(91%)	118(91%)		1.080	0.423-2.758	0.939
-221 X/Y						
XX	0	03(02%)	NA	1	REFERENCE	NA
XY	35(35%)	46(35%)		NA		
YY	58(58%)	81(62%)				
XY/YY	93(100%)	127(98%)				
Éxon 1 A/O						
AA	49(53%)	76(58%)	0.741	1	REFERENCE	NA
AO	39(42%)	46(35%)		1.315	0.753-2.296	0.411
OO	05(05%)	08(06%)		0.969	0.299-3.134	0.805
AO/OO	44(47%)	54(42%)		1.263	0.739-2.160	0.471
Risk of relapse						
<i>-550H/L</i>	High	Low	p*	OR	95% IC	p**
	n=133(%)	n=53(%)				
HH	12(09%)	04(08%)	0.792	1	REFERENCE	NA
HL	49(37%)	24(45%)		0.681	0.198-2.334	0.751
LL	71(53%)	25(47%)		1.270	0.328-3.868	0.896
HL/LL	120(90%)	49(92%)		0.816	0.251-2.655	0.961
-221 X/Y						
XX	02(02%)	0	NA	1	REFERENCE	NA
XY	41(31%)	18(34%)		NA		
YY	90(68%)	35(66%)				
XY/YY	131(98%)	53(100%)				
Éxon 1 A/O						
AA	74(56%)	30(57%)	0.882	1	REFERENCE	NA
AO	50(38%)	21(40%)		0.965	0.497-1.873	0.948
OO	09(07%)	02(04%)		1.824	0.372-8.944	0.693
AO/OO	59(44%)	23(43%)		1.040	0.547-1.976	0.965

P* - G Williams Test; p** - Odds Ratio; NA: non analysed

Table 4 – Association of polymorphisms of exon 1 from the *MBL2* gene with age in pediatric patients with AL.

Genotype	Age		p*	OR	95% IC	p**
	< 10 n=125(%)	≥ 10 n=88(%)				
-550H/L						
HH	13(10%)	05(06%)	0.309	1	REFERENCE	NA
HL	56(45%)	33(38%)		0.653	0.213-1.995	0.629
LL	56(45%)	50(57%)		0.431	0.143-1.293	0.202
HL/LL	112(90%)	83(94%)		0.519	0.178-1.512	0.332
-221 X/Y						
XX	01(01%)	02(02%)	0.624	1	REFERENCE	NA
XY	49(39%)	28(32%)		3.500	NA	0.648
YY	75(60%)	58(66%)		2.586	NA	0.835
XY/YY	124(99%)	86(98%)		2.883	NA	0.758
Exon 1 A/O						
AA	63(50%)	56(64%)	0.038	1	REFERENCE	NA
AO	57(46%)	25(28%)		2.026	1.121-3.664	0.027
OO	05(04%)	07(08%)		0.635	0.190-2.114	0.658
AO/OO	62(50%)	32(36%)		1.722	0.985-3.009	0.076

P* - G Williams Test; p** - Odds Ratio; NA: non analysed

Table 5 - Association of polymorphisms of exon 1 from the *MBL2* gene with age in pediatric patients with ALL.

Genotypes	Age		p*	OR	95% CI	P**
	< 10 N=108	≥ 10 N=71				
-550H/L						
HH	12(11%)	04(06%)	0.408	1	REFERENCE	NA
HL	47(44%)	27(38%)		0.580	0.170-1.978	0.557
LL	49(45%)	40(56%)		0.408	0.122-1.364	0.225
HL/LL	96(89%)	67(94%)		0.477	0.147-1.545	0.323
Cochran test			0.748			
-221 X/Y						
XX	01(1%)	02(03%)	0.545	1	REFERENCE	NA
XY	45(42%)	23(32%)		3.913	0.337-45.459	0.584
YY	62(57%)	46(65%)		2.696	NA	0.811
XY/YY	107(99%)	69(97%)		3.101	NA	0.712
Cochran test			0.769			
Exon 1 A/O						
AA	54(50%)	45(63%)	0.027	1	REFERENCE	NA
AO	51(47%)	20(28%)		2.125	1.108-4.075	0.033
OO	03(03%)	06(08%)		0.417	0.098-1.761	0.383
AO/OO	54(50%)	26(37%)		1.731	0.938-3.194	0.108
Cochran test			0.038			

P* - G Williams Test; p** - Odds Ratio; NA: non analysed

MANUSCRITO 2**5.2 LACK OF ASSOCIATION BETWEEN *IL-10* AND *TNF α* POLYMORPHISMS AND FACTORS RELATED TO SUSCEPTIBILITY TO INFECTION IN PEDIATRIC PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA**

Artigo a submetido à *Human Immunology*
como *Brief Communication*
Fator de impacto: 2.298 B1 (Biotecnologia)

Lack of association between *IL-10* and *TNF α* polymorphisms and factors related to susceptibility to infection in pediatric patients with acute leukemia

Lidiane Regia Pereira Braga de Britto^{a,b,c}, Tassia Cristina da Silva^{a,b}, Ednalva Pereira Leite^b, Maria Tereza Cartaxo Muniz^{a,b}, Maria do Socorro Mendonça Cavalcanti^a

^aUniversidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

^bCentro de Oncohematologia Pediátrica, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil

^cPrograma de pós-graduação RENORBIO, Brasil

Abstract: Patients under treatment for acute leukemia (AL) develop infection during the 50 days of induction phase of chemotherapy treatment, in part this is consequence of neutropenic status, which occurs in this period. It is suggested that alterations in cytokines, such as *IL-10* and *TNF α* involved in the inflammatory process and regulation of proliferation of phagocytic cells can be associated to infection. The objective of this study was verify the association of -1082G/A, -819C/T, -592C/A of *IL-10* and -308G/A of *TNF α* polymorphisms with febrile neutropenia, infections and risk of relapse in pediatric patients with AL in chemotherapy treatment. 225 patients with AL from Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco (CEONHPE/HUOC/UPE) were evaluated and the polymorphisms of *IL-10* and *TNF α* genes were determined by qPCR (Taqman®) and PCR-RFLP, respectively. No association was observed between polymorphisms of these genes with febrile neutropenia, number of infections, age and risk of relapse in pediatric patients with AL in chemotherapy treatment.

Key-Words: acute leukemia, polymorphisms, interleukin 10, tumor necrosis factor alpha.

1. Introduction

The acute leukemias (AL) are characterized by a malignant transformation that can occur during any stage of differentiation of lymphoid or myeloid cells, which explains the heterogeneity of the disease. The acute leukemias can be derived from B or T lymphoid and myeloid lineage[1,2]. In AL, one of the major complications of leukemia patients is immunosuppression and febrile neutropenia, due to the disease itself and/or induced by chemotherapy[3].

Luczynski et al [4] observed qualitative and quantitative changes in immunity during the maintenance therapy using the protocol of treatment BFM (International Protocol of the Study Group Berlin-Frankfurt-Muenster) in children with ALL. Studies report that the interleukin 10 (IL-10) and the tumor necrosis factor (TNF α) can be markers of severity of response to infection in leukemic patients during the chemotherapy treatment [6].

The IL-10 has pleiotropic effects in immunoregulation and inflammation, and can influence many aspects of the immune response [7]. The *IL-10* gene is located in the chromosome 1 and its promoter region is polymorphic [8]. The polymorphism of promoter region -1082 influences in plasma levels of IL-10, and adenine in this position defines the allele *IL-10A*, while guanine in the same position defines the allele less common *IL-10G*. Patients homozygous for the *IL-10G* present high plasma expression of IL-10 [9]. The alleles that present thymine (T) and cytosine (C) in position -819 of promoter region of *IL-10* gene are in unbalanced binding with alleles A and C of position -592 of *IL-10* gene, respectively; thus, this non-random association of alleles in different regions of the gene occurs frequently in a population; therefore, their frequencies have been described by inference, consequently, the alleles -819C/-592C and -819T/-592A are inherited together [10].

The TNF- α is a proinflammatory cytokine with a role in differentiation and proliferation of cells of the immune system, it also plays a key role in apoptosis and cell survival [14]. The TNF α also can influence in transcriptional activity of others cytokines during the infectious process. The polymorphism in promoter region of TNF α gene consists of the replacement of a guanine (G) for adenine (A) in position -308G/A. The allele -308A is associated with the highest serum levels of this cytokine. The plasmatic levels of TNF α has been associated with adverse prognosis in patients with solid tumors and malignant diseases of lymphoid origin [14-16].

The objective of this study was verify the possible association of polymorphisms in regions -1082G/A, -819C/T, -592C/A of the gene *IL-10* and -308G/A of *TNF α* gene with febrile neutropenia, number of infections and risk of relapse in pediatric patients with AL during the induction phase of chemotherapy.

2. Material and methods

2.1 Study Population

The 225 pediatric patients with AL (with age \leq 18) were evaluated, which 189 with ALL and 36 with AML. The patients were attended in Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (CEONHPE/HUOC/UPE), Recife, Brazil, during the period of 2004, january to 2013, December. The diagnosis of febrile neutropenia was performed according to the IDSA[17]. The number of infections was defined based on results of hemoculture during the 50 days of induction phase of the chemotherapy treatment, using the GBTLI [18] and BFM [19] protocols. This study was approved by the Ethics Committee in research with human beings Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil (CAAE: 0186.0.106.000-10).

2.2 Genomic DNA extraction and genotyping of *IL-10* and *TNF α* genes

The DNA was isolated from blood leucocytes of bone marrow obtained through the puncture of the iliac crest and peripheral blood by Technique Phenol-Chloroform [20]. The polymorphism of *TNF- α* gene (rs1800629) was determined by PCR-RFLP according to Cabrera et al. [21], and the genotyping of the regions -1082 (rs1800896) and -819 (rs1800872) was determined using Taqman® probe (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2.3 Statistical analysis

The data analysis was performed using the BioEstat 5.0 program. The Qui-square (χ^2) test was utilized to verify if the observed genotype frequencies is adjusted with its expected. Hardy–Weinberg equilibrium was tested for each SNP by comparing observed with expected frequencies using a χ^2 test. The qualitative variables were analyzed using the Williams G test and odds ratio (OR) with confidence intervals of 95% seeking to determinate if the different categories are associated. In all these applied tests, the level of significance considered was $p < 0.05$.

3. Results and discussion

In present study, of 225 pediatric patients with acute leukemia, 189 (84%) presented ALL. From this total, 54% are male, proportion M/F of 1,17, average of patients age < 10 years (3,7 years) and > 10 years (14 years).

In this study was observed that the febrile neutropenia was presente in 64% of the patients with ALL during the induction phase of chemotherapy treatment. It was observed that 59% of the patients with ALL presented more than two infectious events during the induction period of the chemotherapy treatment. Caver et al [23] and Luczynski et al [4] also observed an elevated number of episodes of infections in children with ALL during the chemotherapy treatment.

Regarding to the age, 60% of the patients with ALL evaluated presented age under 10 years. Lauten et al [24] analyzing 87/135 (64%) patients with ALL and age between 1-9 years observed that patients showing poor response were stratified into the high risk group and therefore underwent a more intensive treatment. Benjamini et al [25] suggested that in clinical studies, the age may be a relevant factor in analyze of role of cytokines during the infection, mainly in the ages at which the innate immune system is still in maturation phase.

Concerning the distribution of genotypic frequencies, the polymorphisms -1082(IL-10) and -308 (*TNF α*) are not in acord Hardy-Weinberg. In table 1 is observed no association between the genotypes of polymorphic regions -1082G/A, -819C/T, -592C/A of *IL-10* gene with febrile neutropenia, number of infectious events, age and relapse risk in patients AL and ALL during the phase of induction of chemotherapy. Marino et al [26] also did not find an association between the polymorphism -1082G/A of *IL-10* gene with susceptibility to infection in pediatric patients with ALL under treatment with BFM ALL 2000 protocol. Deus et al [27] observed that the genotype IL10/AA was associated with a worse survival when compared to others genotypes of -1082G/A region in 105 pediatric patients with ALL which were treated by GBTLI99 protocol.

In the present study we did not find association of the polymorphism -308G/A of *TNF α* gene with febrile neutropenia, number of infectious events, age and risk of relapse in patients with AL during the induction phase of chemotherapy. Stanulla et al [28] and Lauten et al [24] also did not observe an association between the polymorphism -308G/A and the risk of relapse in pediatric patients with ALL treated by BFM86 and BFM90 protocol.

Therefore, the lack of association between the polymorphisms of *IL-10*(-1082G/A, -819C/T, -592C/A) and *TNF α* (-308G/A) genes in patients with AL during the induction phase, do not exclude the involvement of these risks factors with infection, once that other factors, such as nutritional state before the treatment, toxicity and types of chemotherapy can influence this risk. For a better understanding of the importance of clinical response of children with AL in chemotherapy treatment in relation to the polymorphisms in *IL-10* and *TNF α* genes, prospective studies should be developed.

4. References

1. Pui, C.; Robison, L. L.; Look, T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; 371:1030-43.
2. Mórán, Q.F.B. Importancia del laboratorio en el diagnóstico y pronóstico de leucemia aguda linfoblástica de la infância. *Acta Pediatr Mex* 2005;26(3):129-36.
- 3.
4. Luczynski, W.; Stasiak-Barmuta, A.; Krawczuk-Rybak, M et al. Immunologic monitoring of maintenance therapy for acute lymphoblastic leukaemia in children- preliminary report. *Pediatr Blood Cancer* 2004;42:416-420.
5. Wunderink, R.G. Science review: genetic variability in the systemic inflammatory response. *Clinical Care* 2003;7:308-314.
6. Hajjeer, A. H.; Hutchinson, I. V. *TNF- α* gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microscopy Research and technique* 2000;50:216-228.

7. Gibson, A.W.; Edberg, J.C.; Wu, J. et al. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;15;166(6):3915-22.
8. Eskdale J, et al. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immun* 1999; 1(2): 151-5.
9. Lazarus, R.; Klimecki, W. T.; Palmer, L. J. et al Single-Nucleotide Polymorphisms in the Interleukin-10 Gene: differences in Frequencies, Linkage Disequilibrium Patterns, and Haplotypes in Three United States Ethnic Groups. *Genomics* 2002. v 80, n 2, p223-228.
10. Moore, K.W.; De Waal Malefyt, R.; Coffman, R.L. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* v 19, p 683–765, 2001.
11. Couper, K.N.; Blount, D.G.; Riley, E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008;180:5771–5777.
12. Horssen, R.; Ten Hagen, T. L. M.; Eggermont, A. M. M. TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *The oncologist* 2006;11:397–408.
13. Warzocha, K.; Bienvenu, J.; Ribeiro, P. et al. Plasma levels of tumour necrosis factor and its soluble receptors correlate with clinical features and outcome of Hodgkin's disease patients. *Br J Cancer* 1998; 77: 2357–2362.
14. Warzocha, K.; Ribeiro, P.; Bienvenu, J. et al. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood* 1998;91: 3574–3581.

15. Dosquet, C.; Coudert, M.C.; Lepage, E. et al. Are angiogenic factors, cytokines, and soluble adhesion molecules prognostic factors in patients with renal cell carcinoma? *Clin Cancer Res* 1997;3:2451–2458.
16. Demeter, J.; Porzsolt, F.; Ramisch, S. et al. Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1997;97:107–112.
17. IDSA Guideline 2010. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. Institute of Education on January 22, 2011.
18. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância-GBTLI-LLA-1999, 2000.
19. ALL IC-BFM 2002. A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. Final Version of Therapy Protocol from May 3, 2002.
20. Sambrook J; Russel D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab 2002;3:2344.
21. Cabrera, M.; Shaw, M.A.; Sharpies, C. et al. Polymorphism in Tumor Necrosis Factor Genes Associated with Mucocutaneous Leishmaniasis. *J Exp Med* 1995; 182:1259-1264.
22. Vanska, M.; Koivula, I.; Jantunen, E. et al. IL-10 combined with procalcitonin improves early prediction of complications of febrile neutropenia in hematological patients. *Cytokine* 2012;60:787-792.
23. Caver, T. E.; Slobod, K. S.; Flynn, P.M. et al. profound abnormality of the B/T lymphocyte ratio during chemotherapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998;12:619-622.

24. Lauten, M.; Matthias, T; Stanulla, M et al. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia* 2006; 16:8;1437–1442.
25. Benjamin, L.; Duell, C. K.; Tan, A.J.; Carey, F.W. et al. Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;64:295–313.
26. Marino, S.; Verzegnassi, F.; Tamaro, P. et al. Response to glucocorticoids and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: role of polymorphisms of genes involved in glucocorticoid response. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:984–991.
27. Deus, D.M.V.; Lugo, K.A.; Muniz, M.T.C. Influence of IL10(G1082A) and TNF α (G308A) Polymorphisms on the Survival of Pediatric Patients with ALL. *Leukemia Research and Treatment* 2012. ID 692348.
28. Stanulla, M.; Schrauder, A.; Welte, K.; Schrappe, M. Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genetic polymorphisms and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study of patients treated with BFM therapy. *BMC Blood Disorders* 2001;1:2; <http://www.biomedcentral.com/1471-2326/1/2>.

Table 1 – Association of polymorphisms -1082G/A, -819C/T, -592C/A of *IL-10* and -308G/A of *TNF α* genes with febrile neutropenia, number of infections, age e risk of relapse in pediatric patients with AL.

GENOTYPES	FEBRILE NEUTROPENIA n=225		<i>P</i> *	OR	95%CI	<i>P</i> **
	PRESENCE n=147 (%)	ABSENCE n=78 (%)				
<i>IL-10</i> (-1082)						
GG	11(06%)	08(10%)		1	REFERENCE	NA
GA	106(56%)	58(74%)	0,753	1,329	0,506-3,490	0,744
AA	30(16%)	12(15%)		1,818	0,587-5,630	0,454
GA/AA	136(%)	70(90%)		1,413	0,543-3,673	0,645
<i>IL-10</i> (-819/-592)						
CC	46(24%)	25(32%)		1	REFERENCE	NA
CT	81(43%)	33(42%)	0,132	1,334	0,708-2,513	0,465
TT	20(11%)	20(26%)		0,543	0,247-1,195	0,186
CT/TT	101(53%)	53(68%)		1,035	0,574-1,867	0,973
<i>TNF-α</i> (-308)						
	n=147 (%)	n=78 (%)				
GG	26(18%)	17(22%)		1	REFERENCE	NA
GA	53(36%)	28(36%)	0,879	1,237	0,576-2,656	0,725
AA	68(46%)	33(42%)		1,347	0,643-2,822	0,548
GA/AA	121(82%)	61(78%)		1,297	0,654-2,571	0,570
NUMBER OF INFECTIONS n=225						
GENOTYPES	< 2 n=95 (%)	\geq 2 n=130 (%)	<i>P</i> *	OR	95%CI	<i>P</i> **
<i>IL-10</i> (-1082)						
GG	11(12%)	08(06%)		1	REFERENCE	NA
GA	72(76%)	92(71%)	0,142	0,569	0,217-1,488	0,359
AA	12(13%)	30(23%)		0,309	0,139-0,901	0,067
GA/AA	84(88%)	122(94%)		0,501	0,193-1,297	0,229
<i>IL-10</i> (-819/-592)						
CC	30(32%)	41(32%)	0,723	1	REFERENCE	NA
CT	45(47%)	69(53%)		0,891	0,488-1,627	0,825

TT	20(21%)	20(15%)	1,367	0,627-2,976	0,556
CT/TT	65(68%)	89(68%)	0,998	0,567-1,763	0,889

GENOTYPES	NUMBER OF INFECTIONS n=225		<i>P</i> *	OR	95%CI	<i>P</i> **
	< 2 n=95 (%)	≥ 2 n=130 (%)				
<i>TNF-α</i> (-308)						
GG	22(23%)	21(16%)		1	REFERENCE	NA
GA	29(31%)	52(40%)	0,389	0,532	0,251-1,228	0,143
AA	44(46%)	57(44%)		0,737	0,360-1,507	0,512
GA/AA	73(77%)	109(84)		0,639	0,328-1,246	0,251

GENOTYPES	AGE n=225		<i>P</i> *	OR	95%CI	<i>P</i> **
	< 10 n=123(%)	≥ 10 n=102(%)				
<i>IL-10</i> (-1082)						
GG	12(10%)	07(07%)		1	REFERENCE	NA
GA	90(73%)	74(73%)	0,814	0,701	0,266-1,893	0,657
AA	21(17%)	21(21%)		0,583	0,192-1,772	0,498
GA/AA	111(90%)	95(93%)		0,681	0,258-1,800	0,592

<i>IL-10</i> (-819/-592)						
CC	40(33%)	31(30%)		1	REFERENCE	NA
CT	56(46%)	58(57%)	0,240	0,748	0,412-1,357	0,421
TT	27(22%)	13(13%)		1,609	0,715-3,622	0,341
CT/TT	83(67%)	71(70%)		0,906	0,514-1,596	0,843

<i>TNF-α</i> (-308)						
GG	22 (18%)	21(21%)		1	REFERENCE	NA
GA	45(37%)	36(35%)	0,962	1,193	0,568-2,504	0,781
AA	56(46%)	45(44%)		1,188	0,581-2,428	0,772
GA/AA	101(82%)	81(79%)		1,190	0,611-2,316	0,731

GENOTYPES	RISK OF RELAPSE n=225		<i>P</i> *	OR	95%CI	<i>P</i> **
	HIGH n=152(%)	LOW n=73(%)				
<i>IL-10</i> (-1082)						
GG	15(10%)	04(05%)	0,452	1	REFERENCE	NA

GA	106(70%)	58(79%)		0,487	0,154 – 1,537	0,321
AA	31(20%)	11(15%)		0,751	0,205-2,757	0,912
GA/AA	137(90%)	69(95%)		0,529	0,169-1,656	0,394
GENOTYPES	RISK OF RELAPSE n=225	<i>P</i> *		OR	95% CI	<i>P</i> **
	HIGH n=152(%)	LOW n=73(%)				
<i>IL-10</i> (-819/-592)						
CC	46(30%)	25(34%)		1	REFERENCE	NA
CT	81(53%)	33(45%)		0,705	1,334	0,708-2,513
TT	25(16%)	15(21%)		0,906	0,405-2,024	0,972
CT/TT	106(70%)	48(66%)		1,200	0,662-2,175	0,653
<i>TNF-α</i> (-308)						
GG	27(18%)	16(22%)		1	REFERENCE	NA
GA	61(40%)	20(27%)		0,310	1,807	0,813-4,016
AA	64(42%)	37(51%)		1,025	0,489-2,146	0,902
GA/AA	125(82%)	57(78%)		1,299	0,649-2,599	0,575


*P** = G de Williams; *P*** = Odds Ratio; NA = not analyzable.

6. CONCLUSÕES

- Não foi encontrada associação dos polimorfismos das regiões promotoras (-550H/L e -221X/Y) e estrutural (exon 1A/O) do gene *MBL2*, regiões promotoras dos genes *IL-10* (-1082G/A, -819C/T, -592C/A) e *TNF α* (-308G/A) com neutropenia febril, infecção e risco de recaída nos pacientes com LA durante a fase de indução.
- Foi observada associação do genótipo AO (favorece a presença de MBL com a baixa oligomerização) em crianças com LLA e LA, menores de 10 anos.

7. ANEXO

ANEXO 1- Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
COMPLEXO HOSPITALAR HUOC/PROCAPE

Reunião: 20/01/2011 **Protocolo CEP – HUOC/PROCAPE:nº 214/2010**
CAAE:0186.0.106.000-10

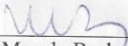
Projeto: Análise dos polimorfismos do gene MBL2 e IL- 10 em pacientes com leucemia aguda na infância.

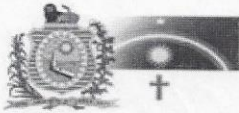
Pesquisador Principal: Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

Resultado:

- Projeto APROVADO de acordo com a resolução 196/96.

Recife: 02/02/2011


Magaly Bushatsky
Vice-coordenadora
CEP-HUOC/PROCAPE



Pavilhão Ovídio Montenegro – 1º andar
Rua Amóbio Marques, 310 –
Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE.
Fone: (81) 3184.1460 – Fone/Fax: (81) 3184.1271
E-mail: cep_huoc.procape@yahoo.com.br

8. APÊNDICE

APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido -TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PACIENTE PORTADOR DE LEUCEMIA AGUDA OU RESPONSÁVEL

ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA

Venho por meio desta, convidá-lo a participar do projeto de pesquisa “POLIMORFISMOS DOS GENES *MBL2*, *IL-10* E *TNF α* EM PACIENTES COM LEUCEMIA AGUDA NA INFÂNCIA”.

Este estudo tem como objetivo investigar a contribuição de genes *MBL2*, *IL-10* e *TNF α* com o risco às infecções e sobrevida global em crianças portadoras de leucemias agudas.

A assinatura deste termo de consentimento autoriza a participação do seu filho(a) nesta pesquisa, assim como a utilização de:

- 1) Os dados clínicos registrados no prontuário médico;
- 2) Amostra de sangue periférico colhidas durante procedimento rotineiro de diagnóstico.

Para que o Sr(a) possa autorizar a participação do seu filho(a) neste estudo, precisa conhecer seus riscos, benefícios.

Obtenção de amostras de sangue periférico:

O estudo será feito com o mesmo material (sangue periférico) obtido para o diagnóstico de rotina do paciente com leucemia aguda. Este procedimento não comprometerá o diagnóstico.

As amostras que sobraem dos testes ficarão estocadas nos Laboratórios de Biologia Molecular do CEONHPE-UPE, para testes futuros, caso seja necessário. Para tanto, um novo TCLE será solicitado.

Riscos:

Não há maior risco adicional envolvido para o paciente, pois não será realizado nenhum procedimento além daquele usado na rotina para o estabelecimento do diagnóstico. A obtenção da amostra é realizada como procedimento de rotina independente da realização do estudo.

Benefícios:

O benefício principal da sua participação é possibilitar que no futuro, com base nos resultados deste estudo, outras pessoas portadoras de leucemia aguda possam ser tratadas de forma mais particularizada e ter menor risco de infecção durante o tratamento.

Caráter confidencial dos registros:

Além da equipe de saúde que cuidará do seu filho, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Oswaldo Cruz - HUOC e a equipe de pesquisadores envolvidos. Sua identidade não será revelada ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação. Todas as informações desse estudo serão confidenciais e o Sr. (a) ou seu filho(a) não será identificado em nenhuma publicação. Este documento será assinado em duas vias, onde, uma ficará com o paciente e outro com o pesquisador.

Custos:

A participação no estudo é voluntária e não haverá nenhuma forma de pagamento, caso conceda sua autorização. O Sr. (a) ou seu filho(a) não sofrerá nenhuma penalidade caso não autorize a participação. Todos os cuidados assim como os tratamentos ministrados a seu filho(a) serão os mesmos, independente de sua decisão de autorizar ou não a participação no estudo. Não existirão custos para a realização da pesquisa.

Bases da participação:

É importante que o Sr.(a) saiba que a participação neste estudo é completamente voluntária e que pode recusar-se a participar ou interromper participação do seu filho(a) a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais ele(a) tem direito. Em caso de decidir interromper a participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

Garantia de esclarecimentos:

Qualquer dúvida poderá ser esclarecida com os responsáveis pelo estudo: Dra Maria do Socorro Cavalcanti (81-99756644), Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz (81-99056802) e MSc Lidiane Régia Pereira Braga (81-96314343) – Laboratório de Biologia Molecular/CEONHPE; Hospital Universitário Oswaldo Cruz (81-31841207). Se o Sr(a) tiver perguntas com relação aos direitos do seu filho(a) como participante desta pesquisa, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, Magaly Bushatsky, a vice-coordenadora do Comitê de Ética do Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE - (81-31841460).

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para a participação do meu filho(a) no projeto: "**POLIMORFISMOS DOS GENES *MBL2, IL-10, TNF α* EM PACIENTES COM LEUCEMIA AGUDA NA INFÂNCIA**".

Entendo que os dados clínicos e material biológico poderão ser utilizados para a realização do referido projeto, e que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

(Assinatura do Paciente)

____ / ____ / ____
dia mês ano

(Nome do Paciente – letra de forma)

(Assinatura do responsável pelo Paciente)

____ / ____ / ____
dia mês ano

(Nome do responsável pelo Paciente – letra de forma)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

