

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL EM
LEUCEMIAS AGUDAS PEDIÁTRICAS**

REBECA FERREIRA MARQUES

Porto Alegre 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL EM
LEUCEMIAS AGUDAS PEDIÁTRICAS**

REBECA FERREIRA MARQUES

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção de Mestre em Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas.

Porto Alegre 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Marques, Rebeca Ferreira

Avaliação dos níveis de fator de crescimento neural
em leucemias agudas pediátricas / Rebeca Ferreira
Marques. -- 2017.

62 f.

Orientador: Rafael Roesler.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Fator de crescimento neural. 2. Leucemias
agudas pediátricas. 3. Neurotrofinas. I. Roesler,
Rafael, orient. II. Título.

*“ Não somos o que sabemos, somos o que estamos
dispostos a aprender. ”
(Autor desconhecido.)*

Agradecimentos

Meus Pais, Débora e José Manuel, ensinaram-me desde cedo sobre o valor do estudo. Se algo não desse certo, não seria por falta de dedicação e esforço. Esse mesmo esforço que eles fizeram para que a educação das filhas fosse a mais completa possível, dentro e fora de casa. A busca por querer mais, aprender continuamente e estar disposta a encarar novos desafios vem da certeza de tê-los como exemplos, apoio e incentivadores incondicionais. A eles, o amor e agradecimento maior do mundo.

Minha irmã Leandra, naturalmente meu exemplo (e que bom exemplo!). Dela herdei as roupas, os livros, os cadernos, as anotações e os desenhos esquemáticos de anatomia e bioquímica. Compartilhamos o quarto, a escolha profissional, as angústias e todas as vitórias. Se não fosse pelo exemplo dela, talvez não me tornasse médica, nem mestranda. Obrigada Mana, por ser minha inspiração.

Ao meu noivo Rafael, colega de profissão e de mestrado, agradeço pelo nosso feliz encontro. Obrigada pelo incentivo para embarcar neste projeto, por me fazer diariamente crescer, pela companhia no estudo, por explicar estatística, pela compreensão nos momentos de *stress*, pela inteligência encantadora. Tenho a sorte de ter a melhor dupla ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Rafael, agradeço pela oportunidade e honra de ser sua mestranda. Mesmo sabendo que minha dedicação ao mestrado seria repartida com outros 3 empregos, aceitou meu pedido. Obrigada por ser um grande exemplo de Professor e Pesquisador. Que nossa parceria continue por muito tempo.

Àquela que, mesmo não oficialmente, exerceu o papel de minha co-orientadora, Caroline, agradeço por ter desempenhado papel fundamental nesta jornada. Foi quem me deu o empurrão inicial apresentando o laboratório e dizendo “tu consegues”. Foi quem me explicou, pacientemente, cada etapa prática e teórica destes dois anos de mestrado.

Não menos importante, agradeço aos meus pacientes. São eles que merecem uma medicina cada vez mais avançada e profissionais mais capacitados. Se for possível melhor cuidá-los, meu esforço e dedicação valeu a pena.

RESUMO

Base teórica: Fator de crescimento neural (NGF) foi primeiramente descrito nos anos 50 e, até hoje, sua função e mecanismos estão sendo descobertos e compreendidos. Combinados com seus receptores, receptores de tirosina quinase A (TrkA) e o pan receptor p75^{NTR}, está envolvido na proliferação e sobrevivência de células B, também em respostas imunes. Entretanto, o papel do NGF em leucemias agudas (LA) pediátricas permanece pouco conhecido.

Objetivo: Desenvolvemos um estudo de coorte observacional para avaliar os níveis de NGF na medula óssea (MO) ou no sangue periférico (SP) de crianças com leucemia aguda.

Métodos: 40 amostras de MO ou SP foram coletadas de 17 crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda e de 2 com leucemia mieloide aguda em diferentes momentos do tratamento.

Resultados: Os níveis de NGF ao final da fase de indução dos pacientes com LA foi significativamente menor naqueles que evoluíram a óbito.

Conclusão: Estes achados fornecem a primeira evidência de um possível papel do NGF como um marcador de pior prognóstico em pacientes com LA.

Palavras chave: fator de crescimento neural, neurotrofinas, leucemia aguda pediátrica, leucemia linfóide aguda e leucemia mieloide aguda

ABSTRACT

BACKGROUND: Neural growth factor (NGF) was first described in the 50ths and, until now, it's function and mechanisms are being discovered and understood. Combined to the receptors, tropomyosin-related receptor kinase A (TrkA) and pan receptor p75^{NTR}, they are involved in proliferation and survival of B-cells, also in immune responses. However, the role of NGF in pediatric acute leukemia remains poorly understood.

OBJECTIVE: We carried out a cohort observational study to evaluate NGF levels in bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) samples from children with AL.

METHODS: 40 BM or PB samples were collected from 17 children and adolescents with acute lymphoid leukemia (ALL) and 2 with acute myeloid leukemia (AML) in different moments of treatment.

RESULTS: NGF levels at the end of induction phase in AL patients were significantly lower in those that evolved to death.

CONCLUSIONS: These findings provide the first evidence for a possible role of NGF as a marker of poor prognosis in pediatric AL.

Keywords: Neural growth factor, neurotrophin, acute childhood leukemia, acute lymphoid leukemia, acute myeloid leukemia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estratégias para localizar e selecionar as informações

Figura 2 – Desenho esquemático da origem e desenvolvimento celular sanguíneo normal

Figura 3 – Neurotrofinas e seus respectivos receptores de tirosina quinase

Figura 4 – Estrutura do NGF

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das leucemias linfoides agudas

Tabela 2 - Classificação morfológica das leucemias mieloides agudas

Tabela 3 - Classificação citogenética de leucemias mieloides agudas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LAP: leucemia aguda pediátrica

LLA: leucemia linfóide aguda

LMA: leucemia mieloide aguda

DRM: doença residual mínima

FAB: French-American-British

WHO: *World Health Organization*

SNC: sistema nervoso central

NCI: *National Cancer Institute*

BDNF: *brain derived neurotrophic factor*; fator neurotrófico derivado do cérebro

NGF: *neural growth factor*; fator de crescimento neural

NT-3: *neurotrophin-3*; neurotrofina 3

NT-4/5: *neurotrophin-4/5*; neurotrofina 4/5

TrK: *tropomyosin receptor kinase*; receptores de tirosina quinase

TrKA: *tropomyosin receptor kinase A*; receptores de tirosina quinase A

TrKB: *tropomyosin receptor kinase B*; receptores de tirosina quinase B

TrKC: *tropomyosin receptor kinase C*; receptores de tirosina quinase C

p75^{NTR}: panreceptor de neurotrofinas

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	Estratégias para localizar e selecionar as informações	11
2.2	Leucemias Agudas Pediátricas	12
2.2.a	Incidência	12
2.2.b	Fatores de risco	12
2.2.c	Fisiopatologia	13
2.2.d	Classificação	14
2.2.e	Diagnóstico	17
2.2.f	Fatores prognósticos	18
2.2.g	Tratamento	20
2.2.h	Sobrevida	22
2.3.	Neurotrofinas	22
2.3.a	Neurotrofinas e câncer	24
2.3.b	Fator de crescimento neural (NGF)	25
3.	MARCO CONCEITUAL	27
4.	JUSTIFICATIVA	28
5.	OBJETIVOS	29
5.1	Objetivo primário	29
5.2	Objetivos secundários	29
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
7.	ARTIGO	34
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
9.	PERSPECTIVAS FUTURAS	50
10.	ANEXOS E/OU APÊNDICES	51

1 INTRODUÇÃO

Câncer em pediatria é uma doença rara. A leucemia aguda pediátrica (LAP) ocupa um papel importante no cenário da oncologia pediátrica, constitui o tipo de maior incidência mundialmente. (1)

Apesar de rara, são milhares de crianças que recebem esse diagnóstico anualmente. Nos últimos 50 anos o melhor entendimento fisiopatológico e os novos protocolos de tratamento permitiram um avanço significativo e uma sobrevida exponencialmente melhor. Antes de 1950 (quando principiou a quimioterapia moderna) todas as crianças acometidas de leucemia morriam, com sobrevida máxima de 2 anos. Hoje, utilizando protocolos consolidados de tratamento, é possível obter sobrevida acima de 90% em muitos casos. (2)

Apesar desta grande evolução, ainda é preciso melhorar alguns subgrupos de pacientes, os de alto risco, que não atingem remissão completa, que são refratários ao tratamento convencional e/ou aqueles que recaem, tanto precoce como tardiamente. Além disso, busca-se reduzir as toxicidades do tratamento, pois apesar de termos um grande número de sobreviventes, muitos deles ficam com sequelas permanentes após o tratamento. (3, 4)

Com o objetivo e desejo final de que todas as crianças com leucemia tenham a melhor chance de cura, livres de sequelas, precisamos buscar um melhor entendimento fisiopatológico, dos fatores de risco e prognóstico, além de novas terapias.

Antes associadas majoritariamente a patologias cerebrais, as neurofinas vêm sendo apontadas em diversos estudos como importantes marcadores biológicos envolvidos no processo neoplásico. Em pacientes adultos já existem muitos estudos comprovando esta relação, na área pediátrica ainda são poucos os relatos. (5, 6)

Sabe-se que, por exemplo, níveis baixos de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) estão associados a LAP de pior prognóstico. (7) Foi com o intuito de melhor entender a relação entre as neurotrofinas e esta doença, bem como expandir o conhecimento nesta área, em busca de novos marcadores de risco, prognósticos e, quem sabe, novos alvos terapêuticos, que surgiu a necessidade deste estudo, onde buscamos entender a relação de uma neurotrofina específica – o fator de crescimento neural (NGF) – nas LAPs.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada na relação das neurotrofinas com doenças oncológicas, especialmente leucemias. A neurotrofina específica de maior interesse neste estudo é o NGF.

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed e Scielo, no período de 2002 a 2017, sendo apenas um artigo mais antigo de 1996 pois trata-se de um artigo referência para o assunto abordado. Foram realizadas as principais buscas através dos termos “neurotrophins and malignancies” e “acute childhood leukemia”. Também foram considerados os termos “acute leukemia” “nerve growth factor” “NGF” e suas combinações.

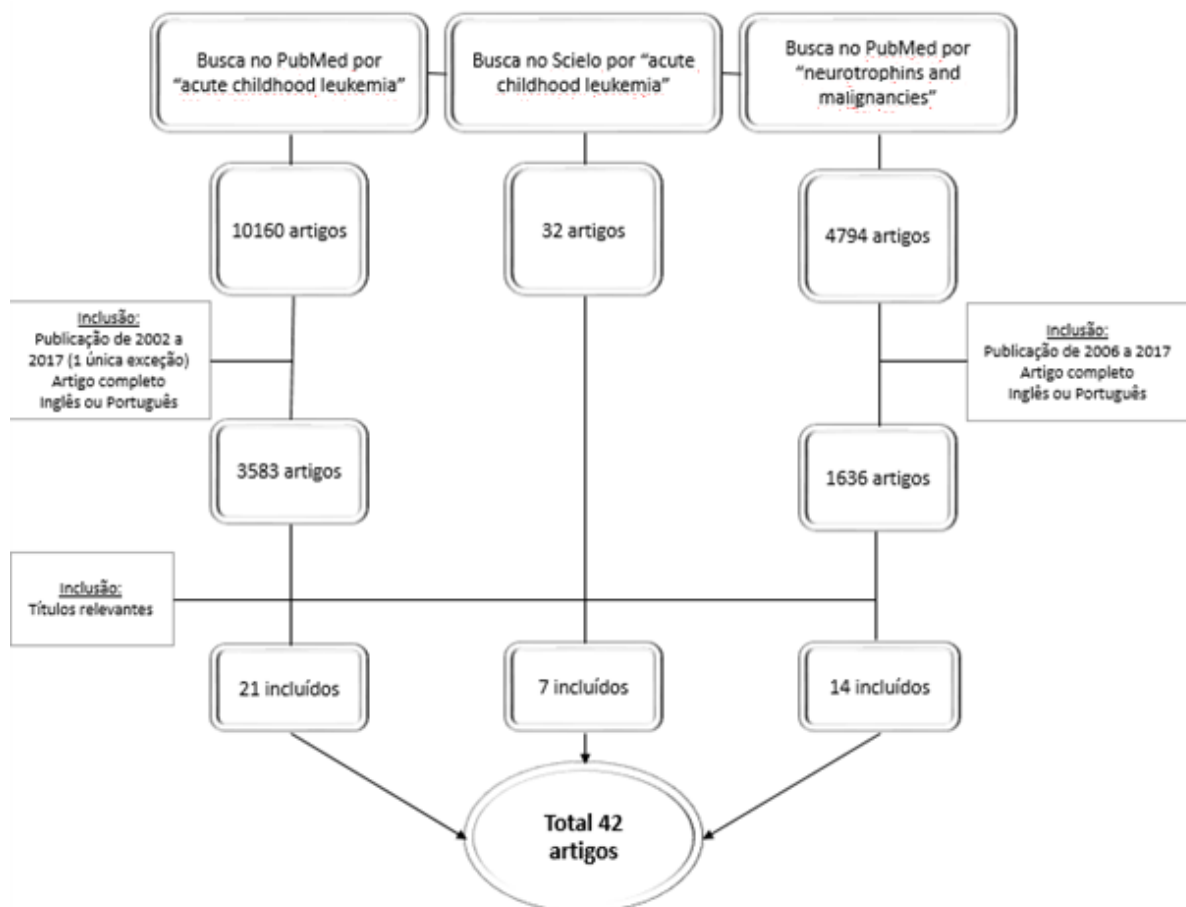


Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave. Fonte: Elaborado pela Autora (2017).

2.2 LEUCEMIAS AGUDAS PEDIÁTRICAS

2.2.a Incidência

O câncer pediátrico é raro quando comparado ao câncer em adultos, correspondendo a aproximadamente 0,5 a 3% dos casos. As leucemias agudas correspondem ao tipo de câncer mais prevalente nas crianças, (1, 8, 9) tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Representa aproximadamente um terço de todos os cânceres em menores de 15 anos.

A leucemia linfóide aguda (LLA) é marcadamente mais prevalente, corresponde a 80% dos casos, com pico de incidência entre 2-3 anos. Já a leucemia mieloide aguda (LMA) representa em torno de 20%. (3)

Estatísticas americanas mostram mais de 3 mil casos novos por ano de LLA em pacientes até 20 anos. (3) (10)

2.2.b Fatores de Risco

Diferente das patologias em adultos, quando se trata de fatores de risco para patologias pediátricas encontramos uma opção bem mais restrita de possíveis causas. Isso acontece porque crianças tem pouco tempo de vida e de exposição à algum fator quando desenvolvem a doença. Em alguns pacientes que são diagnosticados no primeiro ano de vida, o tempo de possível exposição é apenas o período intraútero.

Existe uma susceptibilidade genética, algumas doenças têm risco mais elevado de desenvolver leucemia aguda, como: síndrome de Bloom, neurofibromatose, anemia de Fanconi, ataxia telangiectasia, Li-Fraumeni e trissomia do 21. (3, 10)

Fatores perinatais como obesidade ao nascimento, uso de pesticidas, pais tabagistas ou exposição ocupacional dos pais ou da criança a solventes e benzeno. (3, 10)

Agentes infecciosos podem contribuir com a patogênese da leucemia, entretanto, o contato com esses agentes também pode beneficiar a estimulação da imunidade e ser um fator de proteção. Um vírus comumente descrito como possível gatilho para o desenvolvimento da leucemia e também de linfomas é o Epstein Barr, este vírus apresenta tropismo por linfócitos B (10, 11). Todavia, uma revisão sistemática e metanálise revisou a associação de infecção com LLA e não conseguiu comprovar relação de causa-consequência. (12)

Outros fatores de risco descritos incluem: irradiação terapêutica ou acidental, quimioterapia prévia, exposição pré-natal a raio-x e síndrome mielodisplásica prévia. (3)

2.2.c Fisiopatologia

As células progenitoras hematopoiéticas presentes na medula óssea darão origem a todas as células maduras normais. Primeiro ocorre a divisão em células progenitoras linfóides ou mielóides. (3) As células progenitoras mielóides irão dar origem às plaquetas, células vermelhas e ao mieloblasto, este por sua vez dará origem aos granulócitos. Já a célula progenitora linfóide originará o linfoblasto, que se dividirá em linfócitos B, T e *natural killer*. Esta origem celular está representada na Figura 1.

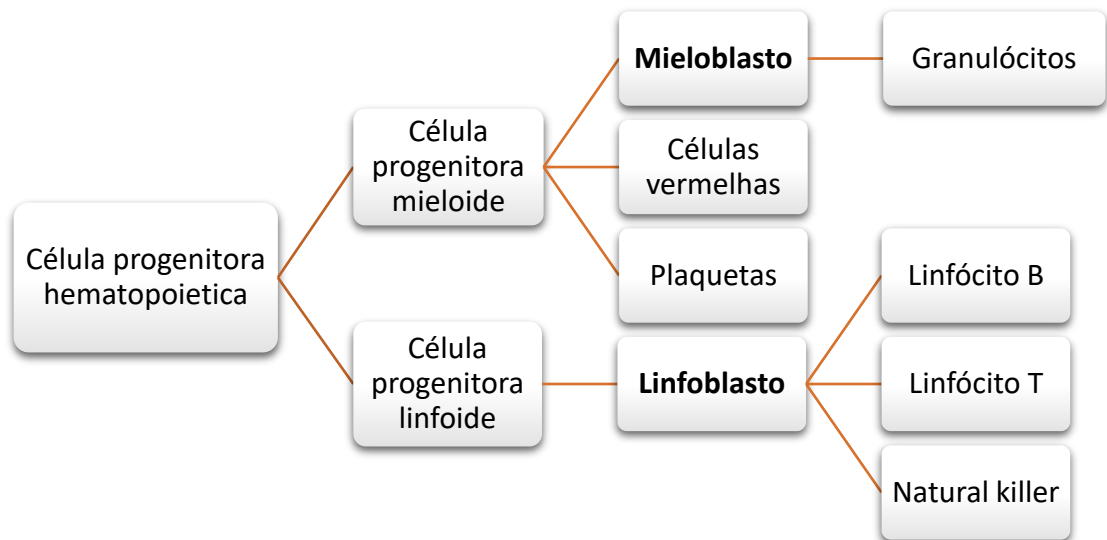


Figura 2. Desenho esquemático da origem e desenvolvimento celular sanguíneo normal. Fonte: Adaptado de *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment*.

A fisiopatologia exata e completa das leucemias agudas ainda não foi elucidada. Por existirem diferentes tipos de leucemia, com manifestação clínica, resposta ao tratamento e prognóstico variáveis, entende-se que podem haver diferentes etiologias. (10)

Sabemos que ocorre um ou mais eventos malignos sobre as células precursoras hematopoiéticas, resultando em um acúmulo de progenitores ou precursores da linhagem linfóide ou mielóide clonais denominados “blastos”.

Na maioria dos casos o desenvolvimento da LLA é um processo que envolve mais de uma etapa e mais de uma alteração genômica é necessária. Em alguns casos, existe evidência

de que estes processos começam ainda no útero materno. Estudos genômicos em gêmeos univitelinos sugerem a origem pré-natal de alguns tipos de leucemia. (3)

A LMA é, também, uma desordem clonal de células progenitoras da medula óssea que leva ao acúmulo de células mieloides imaturas e sem função fisiológica. (4)

A partir do momento em que os blastos clonais se formam, começam a aumentar seu número na medula óssea e conseqüentemente são liberados para a corrente sanguínea. O desenvolvimento normal das outras linhagens celulares como hemoglobina e plaquetas fica prejudicada e reduzida. Bem como outros tipos de leucócitos, como por exemplo os neutrófilos.

2.2.d Classificação

Classificamos primeiramente as leucemias agudas pediátricas em dois grandes grupos: LLA e LMA. Conforme a própria nomenclatura sugere, a diferença entre esses grupos é a origem celular onde a alteração clonal ocorreu, se foi na linhagem linfóide ou mieloide.

A LLA ainda se classifica em linhagem B ou T (tabela 1). O subtipo B é o mais frequente, enquanto o subtipo T normalmente ocorre no sexo masculino, em crianças maiores e adolescentes, costuma cursar com leucocitose e massa mediastinal ao diagnóstico. (3)

A LMA é classificada de acordo com a morfologia dos blastos e reações enzimático-citoquímicas amplamente utilizada (tabela 2), entretanto, a recomendação atual é a classificação com base nas alterações citogenéticas encontradas (tabela 3). (4)

As classificações reconhecidas e utilizadas mundialmente são as descritas nas tabelas a seguir: (3, 4)

LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA – WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) 2006	
Leucemia linfóide aguda de células B	Leucemia linfóide aguda de células T

Tabela 2. Classificação morfológica das leucemias mielóides agudas.

LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA – FAB (FRENCH-AMERICAN-BRITISH)	
M0	Indiferenciada
M1	Minimamente diferenciada
M2	Diferenciada
M3	Promielocítica
M4	Mielomonocítica
M5	Monocítica
M6	Eritróide
M7	Megacariocítica

Tabela 3. Classificação citogenética de leucemias mielóides agudas.

CLASSIFICAÇÃO WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) 2006	
LMA com anormalidades genéticas recorrentes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ t(8;21)(q22;q22), <i>RUNX1-RUNX1T1</i> ▪ inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22), <i>CBFB-MYH11</i> ▪ <i>PML-RARA</i> ▪ t(9;11)(p21.3;q23.3), <i>MLLT3-KMT2A</i> ▪ t(6;9)(p23;q34.1), <i>DEK-NUP214</i> ▪ inv(3)(q21.3;q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2), <i>GATA2, MECOM</i> ▪ megacarioblástica com t(1;22)(p13.3;q13.3), <i>RBM15-MKLI</i> ▪ <i>BCR-ABL1</i> (entidade provisória) ▪ <i>NPM1</i> mutado ▪ mutações bialélicas do <i>CEBPA</i> ▪ <i>RUNX1</i> mutado (entidade provisória)
LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia	
LMA relacionada a terapia prévia	
LMA não especificada	<ul style="list-style-type: none"> ▪ com diferenciação mínima ▪ sem maturação ▪ com maturação ▪ leucemia mielomonocítica aguda ▪ leucemia monoblástica/monocítica aguda ▪ leucemia eritroide pura ▪ leucemia megacarioblástica aguda ▪ leucemia basofílica aguda ▪ leucemia mieloide aguda com fibrose
Sarcoma mieloide	
Proliferações mieloides relacionadas a síndrome de Down	<ul style="list-style-type: none"> ▪ mielopoiese anormal transitória ▪ leucemia mieloide associada a síndrome de Down

2.2.e Diagnóstico

Na suspeita de leucemia aguda, na maioria dos casos, uma coleta simples de sangue periférico para realização do hemograma já pode ser suficiente para fornecer o diagnóstico. Entretanto, para saber que tipo de leucemia o paciente apresenta, deverão ser realizados os exames específicos para este diagnóstico - o medulograma e a imunofenotipagem – ambos realizados através do aspirado de medula óssea, sendo que o segundo poderá ser feito também em sangue periférico.

Com esta avaliação será possível então obter o diagnóstico e além disso classificar o tipo e subtipo de leucemia, por exemplo: leucemia linfóide aguda de células B. Outros exames também importantes para a classificação de risco do paciente serão realizados neste momento, o cariótipo e a pesquisa específica de alterações genéticas, como por exemplo, a identificação ou não da translocação 9;22.

Por definição, para diagnóstico, devemos encontrar >20% de blastos na medula óssea pelo exame morfológico. (4) Atualmente, para classificação de leucemias linfóides é essencial o exame de imunofenotipagem, já para as leucemias mielóides esse exame é auxiliar, sendo essencial apenas para os subtipos M0 e M7.

Outros dois sítios importantes devem ser investigados no momento do diagnóstico quanto a presença de envolvimento leucêmico: o sistema nervoso central e, em meninos, os testículos.

O envolvimento testicular ao diagnóstico, percebido normalmente por alteração ao exame físico simples (aumento testicular), ocorre em aproximadamente 2% dos meninos com LLA, sendo mais comum na LLA de células T. (3) Já na LMA este envolvimento é ainda menos frequente.

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) ao diagnóstico está associado a um impacto prognóstico desfavorável importante. A classificação do líquido cefalorraquidiano sem acidente de punção é dada por: SNC 1, SNC2 e SNC3. O primeiro não apresenta blastos, o segundo é positivo para blastos mas tem menos de 5 leucócitos totais, já o terceiro tem presença de blastos em mais de 5 leucócitos totais. Sabidamente, aqueles com SNC3 apresentam pior prognóstico. (3) Pacientes com contagem superior a 50.000 leucócitos no hemograma ao diagnóstico, parecem ter maior probabilidade de envolvimento do SNC. (13)

2.2.f Classificação de Risco e Fatores Prognósticos

Alguns fatores prognósticos e de classificação de risco para recaída podem ter pequenas variações dependendo do protocolo escolhido. Para LLA, uma das classificações mais consolidadas é segundo o *National Cancer Institute* (NCI), (2, 3, 14) onde:

- Risco *standard*: menos de 50.000 leucócitos e idade entre 1 e 10 anos
- Alto risco: igual ou mais de 50.000 leucócitos e idade menor de 1 ou maior de 10 anos

Além da contagem leucocitária e da idade, outras características do paciente, ao diagnóstico, são relevantes: o envolvimento do SNC, envolvimento testicular, síndrome de Down, sexo, raça, etnia e peso. (4, 9, 15)

As crianças/adolescentes portadores de síndrome de Down têm um risco aumentado de desenvolver LLA e possuem na maioria dos estudos, piores resultados na resposta ao tratamento bem como maior mortalidade relacionada a terapêutica. Este pior prognóstico pode estar relacionado ao maior número de alterações genéticas associadas. (4, 16, 17)

Os meninos costumam ter desfechos menos favoráveis em relação às meninas na maioria dos estudos, o que pode ser decorrente, em parte, pelo acometimento testicular. (1, 4)

Estudos americanos demonstram que o tratamento em negros e pacientes de origem asiática, africana ou hispânicos tem piores resultados. Isto pode se dever, em parte, por uma menor aderência ao tratamento, podendo ter relação com questões sociais desfavoráveis (escolaridade dos pais, por exemplo). (3, 4, 18)

Tanto pacientes obesos quanto desnutridos apresentam maiores risco de recaída e falha ao tratamento. (4, 19, 20)

Em relação às características da própria leucemia linfóide que influenciam na classificação de risco e no prognóstico do paciente, podemos citar:

- Imunofenotipagem: este exame permitirá subdividir a LLA de linhagem B, T e com marcadores mielóide. Além disso, poderemos ainda analisar o subgrupo dentro destas 3 classificações. (21)

De acordo com o estágio onde ocorreu a parada de maturação, a LLA de linhagem B será subdividida em B comum, pró-B e pré-B. As leucemias linfóides agudas de linhagem T recentemente ganharam um subgrupo denominado *Early T-cell*. As leucemias com marcadores mielóides, menos de 5% dos casos, expressam tanto marcadores linfóides como mielóides. Quando existem duas populações distintas, denomina-se leucemia bilinhagem. Quando a

mesma célula blástica apresenta características linfóides e mielóides, denomina-se bifenotípica. (3)

A imunofenotipagem para pesquisa de doença residual mínima (DRM) é uma técnica que possibilita detectar presença de blastos quando a morfologia não consegue, aumentando a sensibilidade. Existe forte associação entre a DRM positiva e desfecho no tratamento dos pacientes. A aferição na fase inicial como, por exemplo, ao final da indução, fornece uma medida confiável da resposta a quimioterapia e do risco de recaída do paciente. A avaliação da DRM é o marcador prognóstico mais potente atualmente. (22, 23)

- Alterações citogenéticas: algumas alterações cromossômicas estão associadas com desfechos mais favoráveis como elevada hiperdiploidia (51–65 cromossomos) e fusão *ETV6-RUNX1*. Outras conferem pior prognóstico, como cromossomo *Philadelphia* (t(9;22)(q34;q11.2)), rearranjos do gene *MLL (KMT2A)*, hipodiploidia e amplificação intracromossômica do gene *AML1 (iAMP21)*. (3, 24)

Para LMA, atualmente o fator mais importante para definição de prognóstico são as alterações genéticas. Indicadores de bom prognóstico: LMA com t(8;21)(q22;q22.1), *RUNX1-RUNX1T1*, inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*, leucemia aguda promielocítica com *PML-RARA*, LMA com mutação *NPM1*, LMA com mutações bialélicas de *CEBPA* e leucemia mieloide associada com síndrome de Down (mutação do *GATA1*). Indicadores de pior prognóstico: monossomia do cromossomos 5 e 7, LMA com inv(3)(q21.3;q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2*, *MECOM*, mutação do *FLT3*. (4)

Outro essencial fator prognóstico será avaliado no decorrer do tratamento, ao identificar a resposta morfológica e/ou molecular dos pacientes. A depender do protocolo escolhido é que serão determinados os momentos de avaliação.

Existe também uma estratificação de grupo de risco que é necessária ser feita em casos de recaída de LLA. Neste momento avalia-se: tempo decorrido entre o diagnóstico e a recaída (quanto mais precoce, pior prognóstico); sítio de recaída (recaída medular ou combinada tem pior desfecho do que recaída extramedular – SNC e/ou testículos); imunofenótipo T (pior prognóstico). (9)

2.2.g Tratamento

A partir de 1950, com o início da quimioterapia moderna, as crianças portadoras de leucemia começaram a ter melhores chances de tratamento adequado e, conseqüentemente, sobrevida duradoura. Desde então a melhoria nos métodos diagnósticos, de estratificação e tratamento vêm aumentando significativamente o sucesso no combate a esta doença.

Na última década foi observado um avanço nos métodos e conhecimentos científicos sobre genômica que impulsionaram um melhor entendimento das LAPs. A estratificação do tratamento conforme a avaliação de resposta precoce com a DRM é um dos exemplos de novas técnicas que permitem uma escolha de tratamento mais adequado para cada paciente, reduzindo dose de quimioterapia, e por conseguinte, toxicidade para os bons respondedores e intensificando para aqueles com resposta pobre, possibilitando a esses mais chance de sobrevida a despeito de maiores toxicidades. (8)

O tratamento de escolha inicial se dá com poliquimioterapia, sendo que os agentes utilizados são basicamente os mesmos entre os protocolos existentes, com pequenas variações de dose, combinação e dias de administração.

Para LLA a sequência usual costuma começar por uma fase de **indução**, após **consolidação**, **intensificação** e **manutenção**. (2, 3, 9) O tratamento completo tem uma duração média de 2 anos.

Pacientes com características específicas como, por exemplo, lactentes (menores de 1 ano), presença de t(9;22) e pacientes com síndrome de Down têm protocolos específicos e diferenciados de tratamento. (2)

Para LMA os protocolos de tratamento costumam ser de curta duração, entretanto, de maior intensidade. O esquema quimioterápico de indução não se modifica muito desde 1973, as duas drogas essenciais e mais efetivas permanecem a citarabina e os antracíclicos, normalmente usados em combinação com outros agentes como etoposide e tioguanina. Os pacientes submetidos a estes protocolos de tratamento precisam contar com uma estrutura de suporte adequado, como profilaxia antimicrobiana e antifúngica, disponibilidade de uma unidade de terapia intensiva se necessário e uma equipe com *expertise* no assunto, pois esse tratamento apresenta grandes riscos de complicações. (4, 25)

Com a melhora dos resultados dos protocolos de primeira linha e novas terapias alvos, a indicação de transplante de medula óssea, principalmente para LLAs, passa a ser bem mais restrita. São poucos os pacientes que recebem esta indicação em primeira linha, sendo a maioria

indicado apenas em casos de recaída ou doença com resposta inadequada. O transplante ainda é uma opção terapêutica de alto risco e significativa mortalidade, entretanto, a experiência obtida com o aumento do número de transplantes de medula óssea realizados, com a melhor escolha de doadores, a possibilidade de novas técnicas como haploidêmico em casos selecionados, vem melhorando a sobrevida dos pacientes. (8, 26)

O envolvimento testicular em LLAs é atualmente controverso, pois alguns protocolos ainda classificam estes pacientes como alto risco e outros não mais. (3) O dano após o tratamento permanece alto, sendo que muitos sobreviventes ficam estéreis. (27)

A leucemia no SNC costuma ser suficientemente prevenida ou tratada com a associação de quimioterapia endovenosa e intratecal. Nos casos de LLA, a terapia escolhida pode ser a associação de 3 drogas – metotrexato, citarabina e corticóide – ou metotrexato isolado. Esta modalidade de tratamento reduziu significativamente a indicação de radioterapia em crânio e neuroeixo, (3) o que por sua vez reduz as sequelas desta modalidade de tratamento. A radioterapia continua sendo indicada profilaticamente ou terapêuticamente em alguns grupos de alto risco e em algumas recidivas.

O grande objetivo atual é poder utilizar drogas alvo, mais efetivas e com menos efeitos indesejáveis. Uma classe de medicação já amplamente utilizada e que impulsionou significativamente a sobrevida dos pacientes são os inibidores de tirosina-quinase (exemplos: imatinibe, dasatinib). O uso desta medicação nas LLAs com t(9;22), chamadas Philadelphia positivas, marca uma nova era na medicina, mudando drasticamente o prognóstico desta doença, inclusive desfazendo a necessidade de transplante alogênico de medula óssea em primeira linha. (9, 28)

Novos agentes quimioterápicos em estudo e que vem demonstrando bons resultados em leucemias refratárias e/ou recaídas incluem: clofarabina, nelarabina e bortezomibe. (9)

Mais recentemente, a imunoterapia vem ocupando um importante espaço na terapia das LLAs. (8) Na pediatria e no Brasil o uso destas drogas ainda é restrito pelo alto custo e mais utilizado nos casos de recaída, o uso em primeira linha vem sendo avaliado em novos estudos clínicos. Exemplos: blinatumomabe, rituximabe. (9)

Como terapia mais moderna e promissora temos as *CAR-T cells*, células T com receptores quiméricos de antígenos, que já demonstrou eficácia em LLAs refratárias. (9, 29)

2.2.h Sobrevida

Para LLA a recaída é o principal motivo de falha ao tratamento. (30) A sobrevida dos pacientes pediátricos é considerada muito boa. Noventa e oito por cento atinge remissão, mais de 90% atinge sobrevida em 5 anos e aproximadamente 85% dos pacientes entre 1 e 18 anos serão sobreviventes a longo prazo. (1, 3, 9, 27)

Entretanto, na LMA a sobrevida é menos satisfatória, em 5 anos é de 68% até 15 anos e de 57% entre 15 a 19 anos. (4)

A leucemia antes intratável, teve um avanço expressivo e exponencial nos últimos anos. Entre 1975 e 2010 houve uma queda na mortalidade de mais de 50%. (4)

A quimioterapia convencional, associada aos tratamentos atuais, não são suficientes para uma parcela de pacientes de alto risco, refratários ou que recaem após o tratamento. (8, 31) Permanecem questões biológicas e terapêuticas a serem entendidas até que possamos curar e reduzir a toxicidade do tratamento de todos as crianças com leucemias agudas, assegurando sua qualidade de vida. A possibilidade de aprimoramento destas questões serão atingidas com a continuação e ampliação de grupos cooperativos e novos estudos clínicos randomizados, controlados e, preferencialmente, multi-institucionais. (3, 8)

2.3 NEUROTROFINAS

Entre 1951 e 1960, três autores, sendo a principal pesquisadora Rita Levi-Montalcini, descreveram uma proteína (hoje denominada neurotrofina) que influenciava na diferenciação e sobrevivência dos neurônios simpáticos, esta proteína era o fator de crescimento neural (NGF). Esta descoberta foi digna de Prêmio Nobel em 1986. (32-35)

As neurotrofinas são fatores importantes de proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular. Estão envolvidas em processos fisiológicos e, também, patológicos de populações neuronais no sistema nervoso, regulando e modificando transdução de sinal. São capazes de iniciar vias de apoptose durante e após uma injúria. (5, 6, 33, 36)

Os 4 membros da família de neurotrofinas dos mamíferos são: NGF – *neural growth factor* / fator de crescimento neural, BDNF – *brain-derived neurotrophic factor* / fator neurotrófico derivado do cérebro, NT3 – *neurotrophin 3* / neurotrofina 3 e NT4 – *neurotrophin 4* / neurotrofina 4. A primeira a ser descrita foi NGF, após BDNF e finalmente NT3 e NT4. (35) Todas elas são sintetizadas inicialmente como pró-neurotrofinas, denominadas pró-NGF, pró-

BDNF, pró-NT3 e pró-NT4, para então se transformarem nas formas maduras (mNGF e mBDNF). (32)

Cada uma das neurotrofinas tem maior afinidade por um determinado receptor de tirosina quinase, são eles: TrkA, TrkB, TrkC ou $p75^{\text{NTR}}$. O $p75^{\text{NTR}}$ é um pan-receptor, que se liga a todas as neurotrofinas. As respectivas combinações entre neurotrofinas e receptores estão demonstradas na figura abaixo: (32, 35)

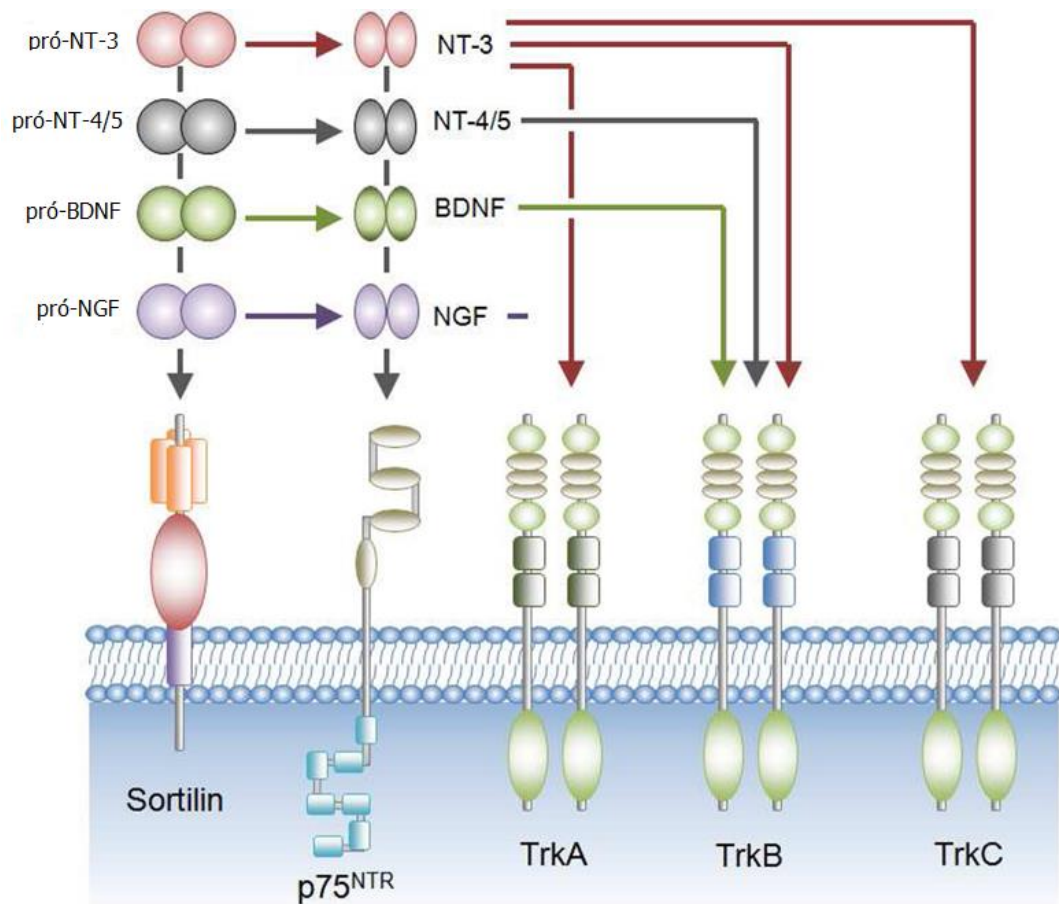


Figura 3: Neurotrofinas e seus respectivos receptores de tirosina quinase. Adaptado de *NGF and ProNGF: regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling*.

De forma geral, as neurotrofinas estão relacionadas com processos neurológicos, muito associadas ao aprendizado e memória. Elas regulam atividade sináptica e plasticidade cerebral, além de moldar a rede neuronal.(32) Já foi amplamente descrito seu envolvimento com doenças como: desordens dos espectro autista, obesidade, transtorno obsessivo-compulsivo, adição e doenças neurodegenerativas. (37)

As neurotrofinas, adicionalmente, são fatores de crescimento multifuncionais e exercem muitos efeitos em células não neuronais, incluindo linfócitos B, mastócitos, músculos e folículos ovarianos. (5)

2.3.a Neurotrofinas e câncer

Diversos estudos vêm demonstrando a relação das neurotrofinas e seus receptores com o câncer, incluindo evidências de um importante papel na biologia celular tumoral. A sinalização de neurotrofinas e ativação do receptor TRK podem, por exemplo, aumentar ou suprimir o crescimento tumoral. (5, 36)

Em diferentes contextos, a superexpressão de BDNF/TrkB confere um fenótipo às células tumorais capaz de resistir a agressores como quimioterápicos, de contribuir com oncogênese de neuroblastoma e de recaída de câncer de mama. (38)

Outros estudos também vem demonstrando que o BDNF pode ter papel oncogênico, já bastante descrito, ou, surpreendentemente, de resposta imune anti-tumoral. (38)

Estudos trazem associação de neurotrofinas e seus receptores com tumores do sistema nervoso, como: neuroblastoma, meduloblastoma e glioma. Além disso, também tem relação com tumores de outros sítios, como: melanoma, câncer de mama, próstrata e linfócitos. (5)

Um dos tumores mais agressivos, o melanoma, tem sua sobrevivência celular sinalizada pelo NGF e receptor p75^{NTR}. (5)

Publicada em 1998 a primeira evidência de que NGF estava envolvido no câncer de mama, demonstrado pelo efeito estimulatório na proliferação de linhagens celulares. O eixo NGF/TrkA/p75^{NTR} estimula proliferação e sobrevivência celular, outras neurotrofinas e seus receptores também tem papel na resistência tumoral à apoptose e na estimulação de invasão e metástase. Estudos pré clínicos em modelos animais mostram que a inibição de NGF reduz o crescimento tumoral, este conhecimento vem sendo aprimorado e novos fármacos inibidores de receptores Trk já estão sendo produzidos e testados em humanos. A dor de origem neoplásica parece também ser reduzida com esta inibição. (35, 39)

A próstata normal é uma grande fonte de NGF, no câncer de próstata, a sinalização de neurotrofina via receptores está envolvida na homeostase das células progenitoras prostáticas humanas. Em células prostáticas epiteliais malignas ocorre perda da expressão de p75^{NTR}. (5, 40)

As neurotrofinas e seus receptores são expressos e desencadeiam também a sinalização dos linfócitos B. Todavia, podem contribuir com neoplasias destas mesmas células, como: LLA, linfoma difuso de grandes células B, linfoma de Burkitt e mieloma múltiplo. (6)

No linfoma difuso de grandes células B existe expressão de NGF, BDNF e receptores Trk e p75^{NTR}, sendo que nos fenótipos mais agressivos desta doença parece ter um papel pró-sobrevivência das neurotrofinas endógenas. Trabalhos relacionam que a ligação NGF/TrkA pode contribuir para a sobrevivência das células malignas, bem como para a resistência a uma importante droga utilizada no tratamento desta doença, o rituximabe. (41, 42)

Em relação às leucemias, poucos estudos foram até então publicados. Mas uma importante descoberta já foi descrita: em leucemias agudas pediátricas baixos níveis de BDNF têm associação com doença ativa e pior prognóstico. (7)

2.3.b Fator de crescimento neural (NGF)

Em 1991 foi apresentada a estrutura do NGF na 2^o conferência do NGF, demonstrada na figura a seguir: (34)



Figura 4: Estrutura do NGF. Fonte: *Nerve Growth Factor and Related Substances: a brief history and an introduction to the international NGF meeting series.*

Além do que já foi citado anteriormente, o NGF pode ser expresso na pele, principal alvo de neurônios sensoriais da dor; (33) estimula a proliferação de células B, sobrevivência de células B de memória e produção de anticorpos. (6) Junto com seu precursor pró-NGF

desempenha muitos papéis em alvos neuronais e não neuronais. Lembrando que podem afetar diretamente as células tumorais ou processos como angiogênese, resposta imune e dor. (35)

3 MARCO CONCEITUAL

Muito tem sido descrito sobre a relação entre as neurotrofinas e seus receptores com a fisiopatologia tumoral. Em alguns tipos é encontrado um papel de estímulo ao crescimento neoplásico (melanoma e câncer de mama), contraditoriamente, em outros, se verifica uma atividade de supressão tumoral (câncer de próstata e meduloblastoma). Nas leucemias agudas pediátricas pouco se sabe sobre esta relação.

Esta dissertação versa sobre a detecção dos níveis da neurotrofina NGF encontrados ao diagnóstico e durante o tratamento de crianças e adolescentes com leucemias agudas pediátricas.

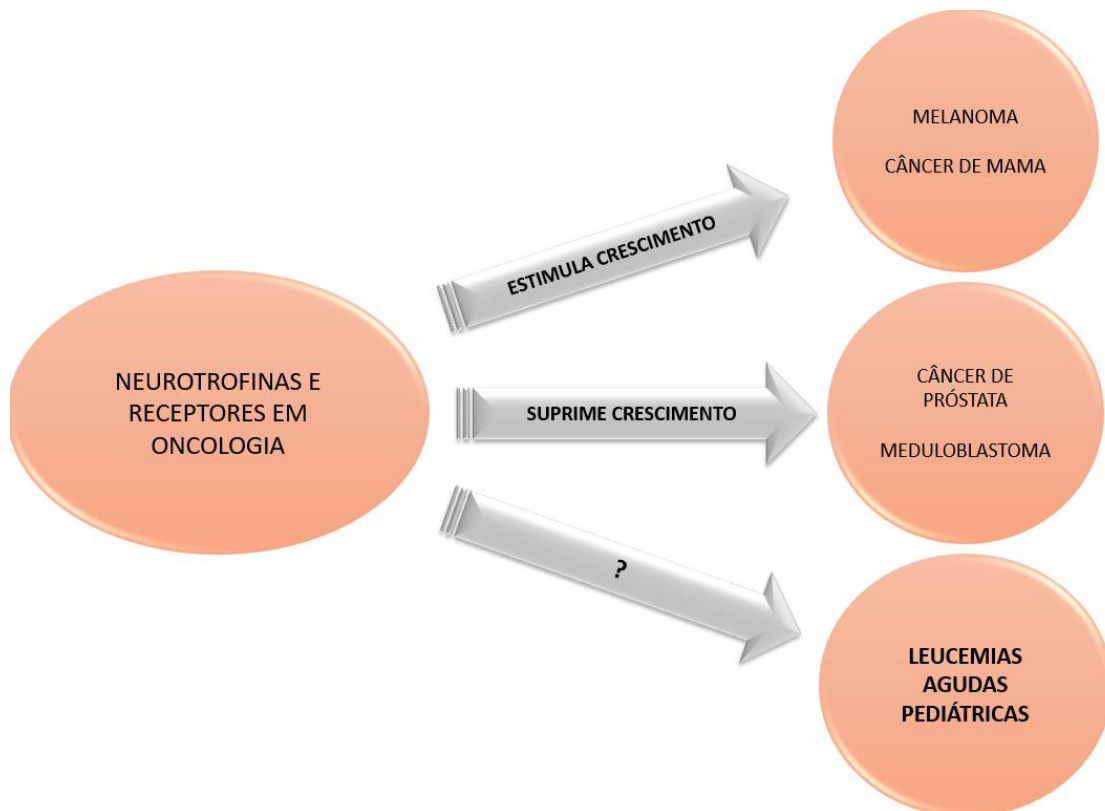


Figura 5. Marco conceitual da busca pelo entendimento da relação entre neurotrofinas e seus receptores com leucemias agudas pediátricas.

4 JUSTIFICATIVA

O conhecimento científico e o entendimento das doenças que afetam o corpo humano vem aumentando exponencialmente nas últimas décadas, doenças antes intratáveis hoje passam a ter, em sua maioria, cura. Entretanto, a despeito de todos os avanços, permanece a necessidade de entender melhor a fisiopatologia de algumas doenças e buscar melhores alvos terapêuticos, mais eficazes e menos tóxicos.

No cenário das leucemias agudas pediátricas podemos oferecer taxas de cura de até 90% nos casos de menor gravidade, por outro lado, alguns tipos mais agressivos encontram apenas 50% de chance de cura. Faz-se necessário caracterizar, classificar e tratar de maneira mais adequada estas doenças.

Os grandes grupos internacionais colaborativos em leucemias agudas pediátricas buscam novos marcadores prognósticos ao diagnóstico e no decorrer do tratamento para que a terapêutica seja melhor guiada e direcionada ao risco do paciente, reduzindo assim a resistência à quimioterapia, os efeitos colaterais agudos e tardios do tratamento oncológico.

As neurotrofinas e seus receptores têm envolvimento na proliferação, viabilidade e sobrevivência celular. Estudos já demonstraram papel relevante das neurotrofinas em diversos tipos de tumores pediátricos e também em leucemias agudas de adultos. Falta, portanto, entender e demonstrar sua expressão em leucemias agudas pediátricas e, uma vez isto feito, poderemos encontrar novos marcadores diagnósticos, prognósticos e estratégias antitumorais.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

- Avaliação dos níveis de NGF em leucemias agudas pediátricas.

5.2 Objetivos secundários

- Associar os níveis de NGF aos dados clínicos dos pacientes, entendendo sua relação com características como idade, sexo, tipo de leucemia, estadiamento ao diagnóstico, resposta ao tratamento e desfechos (remissão, recaída e/ou óbito).

- Avaliar NGF como potencial novo marcador diagnóstico, prognóstico ou, até mesmo, novo alvo terapêutico.

* Detalhamento dos objetivos:

- Verificar os níveis de NGF em amostras de sangue periférico ou medula óssea de pacientes pediátricos com leucemias agudas.

- Para pacientes com LLA avaliaremos no momento do diagnóstico, ao final da indução, na manutenção e após o término do tratamento.

- Para os pacientes com LMA avaliaremos no momento do diagnóstico e após o término do tratamento.

- Para os pacientes com recaída da doença avaliaremos no momento do diagnóstico de recaída e após o término do tratamento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(14):1663-9.
2. Lee JW, Cho B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Korean journal of pediatrics*. 2017;60(5):129-37.
3. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD)2002.
4. Childhood Acute Myeloid Leukemia/Other Myeloid Malignancies Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD)2002.
5. Kruttgen A, Schneider I, Weis J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain pathology*. 2006;16(4):304-10.
6. Hillis J, O'Dwyer M, Gorman AM. Neurotrophins and B-cell malignancies. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(1):41-56.
7. Portich JP, Gil MS, Dos Santos RP, Goulart BK, Ferreira MB, Loss JF, et al. Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in childhood acute leukemia. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2016;17(3):347-52.
8. Stary J, Hrusak O. Recent advances in the management of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *F1000Research*. 2016;5:2635.
9. Santiago R, Vairy S, Sinnott D, Krajcinovic M, Bittencourt H. Novel therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2017;18(11):1081-99.
10. Arellano-Galindo J, Barrera AP, Jimenez-Hernandez E, Zavala-Vega S, Campos-Valdez G, Xicohtencatl-Cortes J, et al. Infectious Agents in Childhood Leukemia. *Archives of medical research*. 2017;48(4):305-13.
11. Maia RdRP, Wünsch Filho V. Infection and childhood leukemia: review of evidence. *Rev Saúde Pública*. 2013;47(6):1172-85.
12. Hwee J, Tait C, Sung L, Kwong JC, Sutradhar R, Pole JD. A systematic review and meta-analysis of the association between childhood infections and the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of cancer*. 2017.

13. Cancela CSP, Murao M, Viana MB, Oliveira BMd. Incidence and risk factors for central nervous system relapse in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(6):436-41.
14. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 1996;14(1):18-24.
15. Leite EP, Muniz MTC, Azevedo AdCACd, Souto FR, Maia ÂCL, Gondim CMdF, et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil.* 2007;7(4):413-21.
16. Buitenkamp TD, Izraeli S, Zimmermann M, Forestier E, Heerema NA, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood.* 2014;123(1):70-7.
17. Lundin C, Forestier E, Klarskov Andersen M, Autio K, Barbany G, Cavelier L, et al. Clinical and genetic features of pediatric acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome in the Nordic countries. *Journal of hematology & oncology.* 2014;7:32.
18. Bhatia S, Landier W, Hageman L, Kim H, Chen Y, Crews KR, et al. 6MP adherence in a multiracial cohort of children with acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood.* 2014;124(15):2345-53.
19. den Hoed MA, Pluijm SM, de Groot-Kruseman HA, te Winkel ML, Fiocco M, van den Akker EL, et al. The negative impact of being underweight and weight loss on survival of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2015;100(1):62-9.
20. Aldhafiri FK, McColl JH, Reilly JJ. Prognostic significance of being overweight and obese at diagnosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology.* 2014;36(3):234-6.
21. Wohlfahrt AB, Hannel L, Oliveira LZ, Soares PB, Silva JEP. The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2015;51(1):7-12.
22. Baraka A, Sherief LM, Kamal NM, Shorbagy SE. Detection of minimal residual disease in childhood B-acute lymphoblastic leukemia by 4-color flowcytometry. *International journal of hematology.* 2017;105(6):784-91.
23. Delbuono E, Maekawa YH, Latorre MdrDO, Seber A, Petrilli AS, Braga JAP, et al. Simplified flow cytometric assay to detect minimal residual disease in childhood with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(4):281-6.

24. Hamerschlak N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. *Jornal de Pediatria*. 2008;84(4):S52-S7.
25. Luger SM. How can one optimize induction therapy in AML? *Best practice & research Clinical haematology*. 2017;30(4):301-5.
26. Morando J, Mauad MA, Fortier SC, Piazero FZ, Souza MPd, Oliveira C, et al. Transplante de células-tronco hematopoéticas em crianças e adolescentes com leucemia aguda: experiência de duas instituições Brasileiras. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(5):350-7.
27. Sadri-Ardekani H, Homburg CH, van Capel TM, van den Berg H, van der Veen F, van der Schoot CE, et al. Eliminating acute lymphoblastic leukemia cells from human testicular cell cultures: a pilot study. *Fertility and sterility*. 2014;101(4):1072-8 e1.
28. Bleckmann K, Schrappe M. Advances in therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood and adolescence. *British journal of haematology*. 2016;172(6):855-69.
29. Biondi A, Magnani CF, Tettamanti S, Gaipa G, Biagi E. Redirecting T cells with Chimeric Antigen Receptor (CAR) for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of autoimmunity*. 2017.
30. Jaime-Perez JC, Pinzon-Uresti MA, Jimenez-Castillo RA, Colunga-Pedraza JE, Gonzalez-Llano O, Gomez-Almaguer D. Relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia and outcomes at a reference center in Latin America: organomegaly at diagnosis is a significant clinical predictor. *Hematology*. 2017:1-9.
31. Maloney KW, Gore L. Agents in Development for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Paediatric drugs*. 2017.
32. Gibon J, Barker PA. Neurotrophins and Proneurotrophins. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2017:1073858417697037.
33. Ceni C, Unsain N, Zeinieh MP, Barker PA. Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;220:193-221.
34. Bradshaw RA, Mobley W, Rush RA. Nerve Growth Factor and Related Substances: A Brief History and an Introduction to the International NGF Meeting Series. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(6).
35. Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, Chalkley RJ, Burlingame AL, Hondermarck H. NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. *Advances in biological regulation*. 2015;58:16-27.
36. Shi J. Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers. *Acta pharmacologica Sinica*. 2015;36(2):149-57.

37. Plotkin JL, Wu C. Neurotrophin biology at NGF 2016: From fundamental science to clinical applications. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2017;56:27-34.
38. Radin DP, Patel P. BDNF: An Oncogene or Tumor Suppressor? *Anticancer research*. 2017;37(8):3983-90.
39. Hondermarck H. Neurotrophins and their receptors in breast cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 2012;23(6):357-65.
40. Hofner T, Klein C, Eisen C, Rigo-Watermeier T, Haferkamp A, Trumpp A, et al. The influence of prostatic anatomy and neurotrophins on basal prostate epithelial progenitor cells. *The Prostate*. 2016;76(1):114-21.
41. Dubanet L, Bentayeb H, Petit B, Olivrie A, Saada S, de la Cruz-Morcillo MA, et al. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *British journal of cancer*. 2015;113(6):934-44.
42. Bellanger C, Dubanet L, Lise MC, Fauchais AL, Bordessoule D, Jauberteau MO, et al. Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS one*. 2011;6(11):e27213.
1. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(14):1663-9.
2. Lee JW, Cho B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Korean journal of pediatrics*. 2017;60(5):129-37.
3. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. *PDQ Cancer Information Summaries*. Bethesda (MD)2002.
4. Childhood Acute Myeloid Leukemia/Other Myeloid Malignancies Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. *PDQ Cancer Information Summaries*. Bethesda (MD)2002.
5. Kruttgen A, Schneider I, Weis J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain pathology*. 2006;16(4):304-10.
6. Hillis J, O'Dwyer M, Gorman AM. Neurotrophins and B-cell malignancies. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(1):41-56.
7. Portich JP, Gil MS, Dos Santos RP, Goulart BK, Ferreira MB, Loss JF, et al. Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in

- childhood acute leukemia. *Cancer biomarkers: section A of Disease markers*. 2016;17(3):347-52.
8. Stary J, Hrusak O. Recent advances in the management of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *F1000Research*. 2016;5:2635.
 9. Santiago R, Vairy S, Sinnett D, Krajinovic M, Bittencourt H. Novel therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2017;18(11):1081-99.
 10. Arellano-Galindo J, Barrera AP, Jimenez-Hernandez E, Zavala-Vega S, Campos-Valdez G, Xicohtencatl-Cortes J, et al. Infectious Agents in Childhood Leukemia. *Archives of medical research*. 2017;48(4):305-13.
 11. Maia RdRP, Wünsch Filho V. Infection and childhood leukemia: review of evidence. *Rev Saúde Pública*. 2013;47(6):1172-85.
 12. Hwee J, Tait C, Sung L, Kwong JC, Sutradhar R, Pole JD. A systematic review and meta-analysis of the association between childhood infections and the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of cancer*. 2017.
 13. Cancela CSP, Murao M, Viana MB, Oliveira BMd. Incidence and risk factors for central nervous system relapse in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(6):436-41.
 14. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1996;14(1):18-24.
 15. Leite EP, Muniz MTC, Azevedo AdCACd, Souto FR, Maia ÂCL, Gondim CMdF, et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. 2007;7(4):413-21.
 16. Buitenkamp TD, Izraeli S, Zimmermann M, Forestier E, Heerema NA, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood*. 2014;123(1):70-7.
 17. Lundin C, Forestier E, Klarskov Andersen M, Autio K, Barbany G, Cavelier L, et al. Clinical and genetic features of pediatric acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome in the Nordic countries. *Journal of hematology & oncology*. 2014;7:32.
 18. Bhatia S, Landier W, Hageman L, Kim H, Chen Y, Crews KR, et al. 6MP adherence in a multiracial cohort of children with acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2014;124(15):2345-53.

19. den Hoed MA, Pluijm SM, de Groot-Kruseman HA, te Winkel ML, Fiocco M, van den Akker EL, et al. The negative impact of being underweight and weight loss on survival of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(1):62-9.
20. Aldhafiri FK, McColl JH, Reilly JJ. Prognostic significance of being overweight and obese at diagnosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2014;36(3):234-6.
21. Wohlfahrt AB, Hannel L, Oliveira LZ, Soares PB, Silva JEP. The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2015;51(1):7-12.
22. Baraka A, Sherief LM, Kamal NM, Shorbagy SE. Detection of minimal residual disease in childhood B-acute lymphoblastic leukemia by 4-color flowcytometry. *International journal of hematology*. 2017;105(6):784-91.
23. Delbuono E, Maekawa YH, Latorre MdRDO, Seber A, Petrilli AS, Braga JAP, et al. Simplified flow cytometric assay to detect minimal residual disease in childhood with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(4):281-6.
24. Hamerschlak N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. *Jornal de Pediatria*. 2008;84(4):S52-S7.
25. Luger SM. How can one optimize induction therapy in AML? Best practice & research *Clinical haematology*. 2017;30(4):301-5.
26. Morando J, Mauad MA, Fortier SC, Piazeria FZ, Souza MPd, Oliveira C, et al. Transplante de células-tronco hematopoéticas em crianças e adolescentes com leucemia aguda: experiência de duas instituições Brasileiras. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(5):350-7.
27. Sadri-Ardekani H, Homburg CH, van Capel TM, van den Berg H, van der Veen F, van der Schoot CE, et al. Eliminating acute lymphoblastic leukemia cells from human testicular cell cultures: a pilot study. *Fertility and sterility*. 2014;101(4):1072-8 e1.
28. Bleckmann K, Schrappe M. Advances in therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood and adolescence. *British journal of haematology*. 2016;172(6):855-69.
29. Biondi A, Magnani CF, Tettamanti S, Gaipa G, Biagi E. Redirecting T cells with Chimeric Antigen Receptor (CAR) for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of autoimmunity*. 2017.
30. Jaime-Perez JC, Pinzon-Uresti MA, Jimenez-Castillo RA, Colunga-Pedraza JE, Gonzalez-Llano O, Gomez-Almaguer D. Relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia

and outcomes at a reference center in Latin America: organomegaly at diagnosis is a significant clinical predictor. *Hematology*. 2017;1-9.

31. Maloney KW, Gore L. Agents in Development for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Paediatric drugs*. 2017.
32. Gibon J, Barker PA. Neurotrophins and Proneurotrophins. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2017;1073858417697037.
33. Ceni C, Unsain N, Zeinieh MP, Barker PA. Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;220:193-221.
34. Bradshaw RA, Mobley W, Rush RA. Nerve Growth Factor and Related Substances: A Brief History and an Introduction to the International NGF Meeting Series. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(6).
35. Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, Chalkley RJ, Burlingame AL, Hondermarck H. NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. *Advances in biological regulation*. 2015;58:16-27.
36. Shi J. Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers. *Acta pharmacologica Sinica*. 2015;36(2):149-57.
37. Plotkin JL, Wu C. Neurotrophin biology at NGF 2016: From fundamental science to clinical applications. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2017;56:27-34.
38. Radin DP, Patel P. BDNF: An Oncogene or Tumor Suppressor? *Anticancer research*. 2017;37(8):3983-90.
39. Hondermarck H. Neurotrophins and their receptors in breast cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 2012;23(6):357-65.
40. Hofner T, Klein C, Eisen C, Rigo-Watermeier T, Haferkamp A, Trumpp A, et al. The influence of prostatic anatomy and neurotrophins on basal prostate epithelial progenitor cells. *The Prostate*. 2016;76(1):114-21.
41. Dubanet L, Bentayeb H, Petit B, Olivrie A, Saada S, de la Cruz-Morcillo MA, et al. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *British journal of cancer*. 2015;113(6):934-44.
42. Bellanger C, Dubanet L, Lise MC, Fauchais AL, Bordessoule D, Jauberteau MO, et al. Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS one*. 2011;6(11):e27213.

1. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(14):1663-9.
2. Lee JW, Cho B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Korean journal of pediatrics*. 2017;60(5):129-37.
3. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD)2002.
4. Childhood Acute Myeloid Leukemia/Other Myeloid Malignancies Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD)2002.
5. Kruttgen A, Schneider I, Weis J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain pathology*. 2006;16(4):304-10.
6. Hillis J, O'Dwyer M, Gorman AM. Neurotrophins and B-cell malignancies. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(1):41-56.
7. Portich JP, Gil MS, Dos Santos RP, Goulart BK, Ferreira MB, Loss JF, et al. Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in childhood acute leukemia. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2016;17(3):347-52.
8. Stary J, Hrusak O. Recent advances in the management of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *F1000Research*. 2016;5:2635.
9. Santiago R, Vairy S, Sinnott D, Krajcinovic M, Bittencourt H. Novel therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2017;18(11):1081-99.
10. Arellano-Galindo J, Barrera AP, Jimenez-Hernandez E, Zavala-Vega S, Campos-Valdez G, Xicohtencatl-Cortes J, et al. Infectious Agents in Childhood Leukemia. *Archives of medical research*. 2017;48(4):305-13.
11. Maia RdRP, Wünsch Filho V. Infection and childhood leukemia: review of evidence. *Rev Saúde Pública*. 2013;47(6):1172-85.
12. Hwee J, Tait C, Sung L, Kwong JC, Sutradhar R, Pole JD. A systematic review and meta-analysis of the association between childhood infections and the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of cancer*. 2017.

13. Cancela CSP, Murao M, Viana MB, Oliveira BMd. Incidence and risk factors for central nervous system relapse in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(6):436-41.
14. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 1996;14(1):18-24.
15. Leite EP, Muniz MTC, Azevedo AdCACd, Souto FR, Maia ÂCL, Gondim CMdF, et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil.* 2007;7(4):413-21.
16. Buitenkamp TD, Izraeli S, Zimmermann M, Forestier E, Heerema NA, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood.* 2014;123(1):70-7.
17. Lundin C, Forestier E, Klarskov Andersen M, Autio K, Barbany G, Cavelier L, et al. Clinical and genetic features of pediatric acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome in the Nordic countries. *Journal of hematology & oncology.* 2014;7:32.
18. Bhatia S, Landier W, Hageman L, Kim H, Chen Y, Crews KR, et al. 6MP adherence in a multiracial cohort of children with acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood.* 2014;124(15):2345-53.
19. den Hoed MA, Pluijm SM, de Groot-Kruseman HA, te Winkel ML, Fiocco M, van den Akker EL, et al. The negative impact of being underweight and weight loss on survival of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2015;100(1):62-9.
20. Aldhafiri FK, McColl JH, Reilly JJ. Prognostic significance of being overweight and obese at diagnosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology.* 2014;36(3):234-6.
21. Wohlfahrt AB, Hannel L, Oliveira LZ, Soares PB, Silva JEP. The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2015;51(1):7-12.
22. Baraka A, Sherief LM, Kamal NM, Shorbagy SE. Detection of minimal residual disease in childhood B-acute lymphoblastic leukemia by 4-color flowcytometry. *International journal of hematology.* 2017;105(6):784-91.
23. Delbuono E, Maekawa YH, Latorre MdrDO, Seber A, Petrilli AS, Braga JAP, et al. Simplified flow cytometric assay to detect minimal residual disease in childhood with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(4):281-6.

24. Hamerschlak N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. *Jornal de Pediatria*. 2008;84(4):S52-S7.
25. Luger SM. How can one optimize induction therapy in AML? *Best practice & research Clinical haematology*. 2017;30(4):301-5.
26. Morando J, Mauad MA, Fortier SC, Piazero FZ, Souza MPd, Oliveira C, et al. Transplante de células-tronco hematopoéticas em crianças e adolescentes com leucemia aguda: experiência de duas instituições Brasileiras. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(5):350-7.
27. Sadri-Ardekani H, Homburg CH, van Capel TM, van den Berg H, van der Veen F, van der Schoot CE, et al. Eliminating acute lymphoblastic leukemia cells from human testicular cell cultures: a pilot study. *Fertility and sterility*. 2014;101(4):1072-8 e1.
28. Bleckmann K, Schrappe M. Advances in therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood and adolescence. *British journal of haematology*. 2016;172(6):855-69.
29. Biondi A, Magnani CF, Tettamanti S, Gaipa G, Biagi E. Redirecting T cells with Chimeric Antigen Receptor (CAR) for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of autoimmunity*. 2017.
30. Jaime-Perez JC, Pinzon-Uresti MA, Jimenez-Castillo RA, Colunga-Pedraza JE, Gonzalez-Llano O, Gomez-Almaguer D. Relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia and outcomes at a reference center in Latin America: organomegaly at diagnosis is a significant clinical predictor. *Hematology*. 2017:1-9.
31. Maloney KW, Gore L. Agents in Development for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Paediatric drugs*. 2017.
32. Gibon J, Barker PA. Neurotrophins and Proneurotrophins. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2017:1073858417697037.
33. Ceni C, Unsain N, Zeinieh MP, Barker PA. Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;220:193-221.
34. Bradshaw RA, Mobley W, Rush RA. Nerve Growth Factor and Related Substances: A Brief History and an Introduction to the International NGF Meeting Series. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(6).
35. Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, Chalkley RJ, Burlingame AL, Hondermarck H. NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. *Advances in biological regulation*. 2015;58:16-27.
36. Shi J. Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers. *Acta pharmacologica Sinica*. 2015;36(2):149-57.

37. Plotkin JL, Wu C. Neurotrophin biology at NGF 2016: From fundamental science to clinical applications. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2017;56:27-34.
38. Radin DP, Patel P. BDNF: An Oncogene or Tumor Suppressor? *Anticancer research*. 2017;37(8):3983-90.
39. Hondermarck H. Neurotrophins and their receptors in breast cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 2012;23(6):357-65.
40. Hofner T, Klein C, Eisen C, Rigo-Watermeier T, Haferkamp A, Trumpp A, et al. The influence of prostatic anatomy and neurotrophins on basal prostate epithelial progenitor cells. *The Prostate*. 2016;76(1):114-21.
41. Dubanet L, Bentayeb H, Petit B, Olivrie A, Saada S, de la Cruz-Morcillo MA, et al. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *British journal of cancer*. 2015;113(6):934-44.
42. Bellanger C, Dubanet L, Lise MC, Fauchais AL, Bordessoule D, Jauberteau MO, et al. Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PloS one*. 2011;6(11):e27213.

7 ARTIGO

Este artigo será submetido à revista *Cancer Biomarkers*.

Low neural growth factor levels are associated with poor prognosis in childhood acute leukemia

Rebeca Ferreira Marques^{a,b}, Rafael Pereira dos Santos^a, Camila Alves da Silva^a, Rafael Roesler^{a,c,d,e}, Caroline Brunetto de Farias^{a,d}

^a *Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

^d *Children's Cancer Institute, Porto Alegre, RS, Brazil*

^e *Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

Abstract

BACKGROUND: Neural growth factor (NGF) was first described in the 50ths and, until now, it's function and mechanisms are being discovered and understood. Combined to the receptors, tropomyosin-related receptor kinase A (TrkA) and pan receptor p75^{NTR}, they are involved in proliferation and survival of B-cells, also in immune responses. However, the role of NGF in pediatric acute leukemia remains poorly understood.

OBJECTIVE: We carried out a cohort observational study to evaluate NGF levels in bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) samples from children with AL.

METHODS: 40 BM or PB samples were collected from 17 children and adolescents with acute lymphoid leukemia (ALL) and 2 with acute myeloid leukemia (AML) in different moments of treatment.

RESULTS: NGF levels at the end of induction phase in ALL patients were significantly lower in those that evolved to death.

CONCLUSIONS: These findings provide the first evidence for a possible role of NGF as a marker of poor prognosis in pediatric AL.

Keywords: Neural growth factor, neurotrophin, acute childhood leukemia, acute lymphoid leukemia, acute myeloid leukemia

1 Background

Neural growth factor (NGF) was the first member of the neurotrophin (NT) family described, back in the 50ths. Since then, the role of these proteins molecules that acts by binding to the tropomyosin-related receptor kinase A (TrkA) and pan-NT p75 (p75^{NTR}) surface receptors are being more understood. (1, 2) The signaling mediated by NGF/TrkA/p75^{NTR} is involved in proliferation/survival of B-cells and in immune responses. It is already known the influence of this axis in breast cancer, prostate cancer, lymphomas and melanomas. NTs and their receptors can either support or suppress tumor growth. (3-6)

Acute leukemia (AL) is the most common type of childhood cancer in all countries. The cure rates are excellent, about 80-90% with the current international protocols of treatment. However, there is still a part of these patients that deals with severe treatment toxicities, cannot achieve remission, present early or late relapse and evolved to death. (7-9)

Recent efforts are being made, all over the world, in order to improve outcomes of these patients of high risk and bad prognosis. (9, 10) The better understanding of the role of NGF and their receptors in pediatric AL may be an important key to help these patients. Our aim in this study was to measure NGF levels in different moments of the treatment - since diagnosis until follow up - and correlate with patients and disease characteristics. Furthermore, we also correlated these levels with outcomes.

2 Methods

2.a Study design, Setting and Participants

We carried a cohort observational study. The study was placed in *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA), a tertiary referral hospital in south of Brazil, linked with the Federal University of *Rio Grande do Sul* (UFRGS). The convenience sample consisted of patients with ages ranging from 0 to 18 years, admitted to the Pediatric Oncology Service, with diagnosis of acute myeloid leukemia (AML) or acute lymphoid leukemia (ALL), regardless of treatment phase.

2.b Ethics

Informed consent was obtained for all individuals. The study was approved by the Research Ethics Committee (project #17-0614).

2.c. Variables

The variables evaluated were: age at diagnosis, gender, leukemia types, central nervous system (CNS) involvement, risk classification, remission at the end of induction, relapse, hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), death, cause of death and time of follow-up time (Table 1 and 2). Patients were first classified according to the type of leukemia, acute lymphoid leukemia (ALL) or acute myeloid leukemia (AML). Within each of these groups sub classification was performed in B or T lineage for ALL and FAB classification for AML. CNS involvement was defined as positive when CNS3, according to criteria of the National Cancer Institute. The definition of low or high risk was according to the protocol of treatment in which the patient was inserted. The remission evaluation at the end of the induction was applied in patients with ALL and considered present when the patient had <5% of blasts in the morphology and <0.01% of clonal cells in immunophenotyping. No distinction was made between early and late relapse. Follow-up time was 9 to 38 months.

2.d Data sources and samples

Demographic and clinical variables were collected from medical records (Table 1). Samples of bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) from patients with acute leukemia were obtained between March 2014 and January 2017. The samples were obtained at diagnosis and/or during different treatment stages and follow-up, depending on the availability.

2.e NGF measurement

To measure NGF levels, 2-4 ml of BM or PB were collected, and an enzyme immunoassay sandwich kit was used (Chemicon International, ChemiKine, USA, CYT304), following the manufacturer's instructions.

2.f Statistics

The quantitative variables were described by median and interquartile range, due to the asymmetry of the data, and compared by the Mann-Whitney test. Categorical variables were described by absolute and relative frequencies. To estimate global and relapse-free survival curves, the Kaplan-Meier method was applied. To assess the risk of NGF in relation to death, the Poisson Regression analysis was applied. The measure of effect calculated was the Relative Risk together with the 95% confidence interval. To compare the NGF levels over time, the gamma model of generalized estimation equations (GEE) with Bonferroni adjustment was applied. The significance level adopted was 5% ($p < 0.05$) and the analyzes were performed in the SPSS program version 21.0.

3 Results

A total of 40 samples were collected from 19 children. These data do not represent the totality of patients diagnosed with AL in the Service, but the ones we were able to get samples and analyze. Seventeen patients (89.5%) had ALL, being 4 (23.5%) from T-lineage and 13 (76.5%) from B-lineage. 2 patients (10.5%) had AML. Fifty-seven (57.9%) subjects were girls. The mean age at diagnosis was 7 years (25th, 3; 75th, 13). Regarding the risk classification, no patient had testicle involvement of leukemia and only two (10.5%) boys with ALL-T had CNS positive at diagnosis. Eleven patients (73,3%), of fifteen that we have data, were classified in the high risk group. Of the 13 patients that were evaluated at the final of induction phase, 69,2% were in remission. Relapse occurred in 5 (26.3%) patients and most common place was bone marrow

(60%). Four (21.1%) patients had to undergo HSCT. Mostly of the patients evolved to death (52.6%), being the first reason sepsis (50%), followed by disease progression (20%) and intravascular disseminated coagulation (10%). The mean time of follow-up was 27,9 months (25th, 9.6; 75th, 38,4).

Samples were preferentially from BM. We investigated if NGF levels had distinction in 4 different moments of the treatment (diagnosis, end of induction, maintenance and relapsed) (Table 3; Figure 1). Regarding the leukemia type, remission at the end of induction or relapse we found no difference. However, NGF levels were significantly lower, at the end of induction phase, in patients with ALL that evolved to death. (Figure 2) Through the Poisson Regression analysis, it was observed that with each increase of 0.01 NGF units, there was a mean reduction of 23% in the incidence of death (RR = 0.77, 95% CI: 0.60-0.99, p = 0.042).

Relapse and death probability were ascendant through time, reaching more than 60% and 56%, respectively, within 60 months of the diagnostic.

4 Discussion

The role of neurotrophins in pediatric acute leukemia is still a field to be explored. This was the first study to examine NGF levels in acute childhood leukemia. Our findings suggest that lower levels may be related to higher risk and poor prognostic patients. Induction phase is the most important phase of ALL treatment. The initial response, currently evaluated by immunophenotyping, is one of the criteria with the greatest impact in predicting risk of relapse and, consequently, worse prognosis for patients. Therefore, the finding of this work may suggest a new evaluation method in ALLs, increasing the sensitivity of identification of the high risk groups. Which, in turn, will allow a better choice of treatment.

Considering the already described role of neurotrophins and their receptors in other neoplasms, it is possible that low NGF levels contribute in keeping cells in an immature state that promotes disease progression. In summary, the present findings provide the first evidence for a role of NGF levels as a marker of poor prognosis in pediatric AL. These data raise the possibility, which should be investigated by further studies with larger patient

cohorts, that by measuring NGF at the end of induction phase we might obtain information about the risk of death, helping in guiding therapeutic decisions.

5 Acknowledgements

This research was supported by the Ministry of Health/CNPq/FAPERGS PPSUS grant number 1245- 2551/13-0023 to C.B.F., the Children's Cancer Institute (ICI) and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA).

6 Conflict of interest

The authors indicate no potential conflicts of interest.

References

1. Plotkin JL, Wu C. Neurotrophin biology at NGF 2016: From fundamental science to clinical applications. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2017;56:27-34.
2. Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, Chalkley RJ, Burlingame AL, Hondermarck H. NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. *Advances in biological regulation*. 2015;58:16-27.
3. Kruttgen A, Schneider I, Weis J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain pathology*. 2006;16(4):304-10.
4. Ceni C, Unsain N, Zeinieh MP, Barker PA. Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;220:193-221.
5. Dubanet L, Bentayeb H, Petit B, Olivrie A, Saada S, de la Cruz-Morcillo MA, et al. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *British journal of cancer*. 2015;113(6):934-44.
6. Shi J. Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers. *Acta pharmacologica Sinica*. 2015;36(2):149-57.
7. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD)2002.
8. Childhood Acute Myeloid Leukemia/Other Myeloid Malignancies Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD)2002.
9. Stary J, Hrusak O. Recent advances in the management of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *F1000Research*. 2016;5:2635.
10. Santiago R, Vairy S, Sinnett D, Krajcinovic M, Bittencourt H. Novel therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2017;18(11):1081-99.

Table 1 – Demographic characteristics

Variables	n= 19
Age at diagnostic – median (IQR)	7 (3 – 13)
Gender – n(%)	
Male	8 (42,1)
Female	11 (57,9)
Leukemia type – n(%)	
ALL	17 (89,5)
AML	2 (10,5)
ALL subtype – n(%)	
B	13 (76,5)
T	4 (23,5)
AML subtype – n(%)	
M4	1 (50,0)
M5	1 (50,0)
CNS – n(%)	
No	17 (89,5)
Yes	2 (10,5)

Abbreviations: IQR: interquartile range; ALL: acute lymphoid leukemia; AML: acute myeloid leukemia; CNS: central nervous system

Table 2 – Clinical characteristics

Variables	n= 19
High Risk* – n(%)	
No	4 (26,7)
Yes	11 (73,3)
Remission at the end of induction** – n(%)	
No	4 (30,8)
Yes	9 (69,2)
Relapse – n(%)	
No	14 (73,7)
Yes	5 (26,3)
Place of relapse – n(%)	
BM	3 (60,0)
BM + CNS	1 (20,0)
BM + Testicle	1 (20,0)
HSCT – n(%)	
No	15 (78,9)
Yes	4 (21,1)
Death – n(%)	
No	9 (47,4)
Yes	10 (52,6)
Cause of death – n(%)	
Leukemia related	9 (90,0)
Others	1 (10,0)
Time of follow-up (months) – median (IQR)	27,9 (9,6 – 38,4)

*n=15 (4 missing data); ** n=13 (6 missing data)

Abbreviations: BM: bone marrow; CNS: central nervous system; HSCT: hematopoietic stem cell transplant; IQR: interquartile range

Table 3 – Comparison of NGF levels during follow-up according to types of leukemia, relapse and death

Variables	Diagnosis	End of induction	Maintenance	Relapse
<i>Median (Range)</i>				
Type of leukemia				
ALL	0,10 (0,00-0,23)	-	-	-
AML	0,12 (0,00-0,24)	-	-	-
<i>p value</i>	0,933	-	-	-
Type of ALL				
B	0,09 (0,04-0,12)	0,09 (0,06-0,11)	0,06 (0,02-0,11)	0,03 (0,00-0,13)
T	0,04 (0,04-0,04)	0,18 (0,18-0,18)	0,09 (0,09-0,09)	0,06 (0,05-0,10)
<i>p value</i>	0,462	0,182	0,571	0,700
Remission at end of induction				
Yes	0,09 (0,04-0,12)	0,10 (0,07-0,13)	0,06 (0,02-0,09)	0,07 (0,03-0,10)
No	0,08 (0,01-0,12)	0,07 (0,03-0,11)	0,17 (0,17-0,17)	0,13 (0,13-0,13)
<i>p value</i>	0,808	0,376	0,286	0,667
Relapse				
Yes	0,12 (0,12-0,12)	0,00 (0,00-0,00)	-	0,05 (0,01-0,10)
No	0,06 (0,02-0,11)	0,10 (0,07-0,12)	-	0,10 (0,10-0,10)
<i>p value</i>	0,171	0,182	-	0,667
Death				
Yes	0,05 (0,00-0,15)	0,03 (0,00-0,07)	-	0,05 (0,00-0,10)
No	0,10 (0,04-0,12)	0,11 (0,07-0,18)	-	0,13 (0,13-0,13)
<i>p value</i>	0,689	0,024	-	0,333

Abbreviations: ALL: acute lymphoid leukemia; AML: acute myeloid leukemia

Figure 1. Neural growth factor (NGF) levels evaluation in different phases of treatment ($p=0,489$)

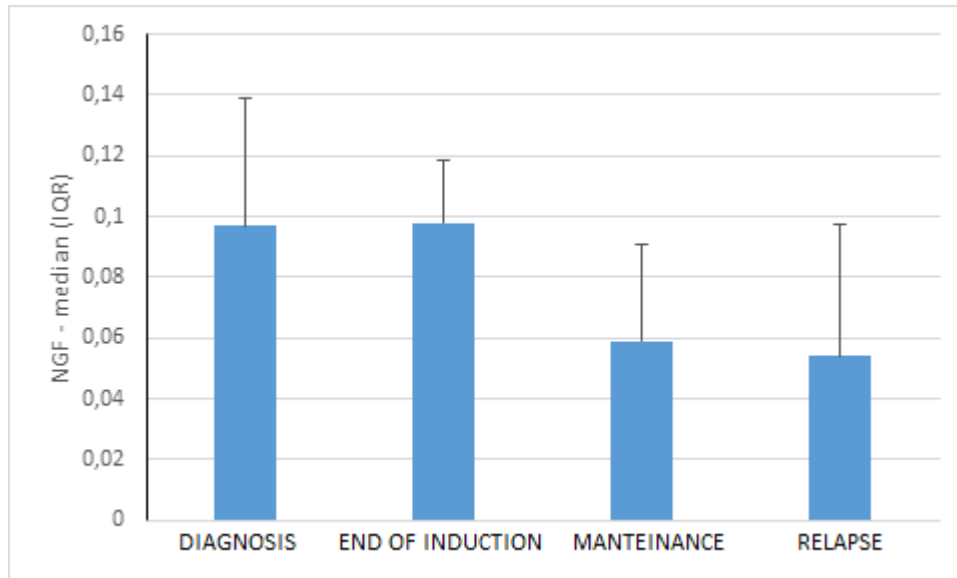
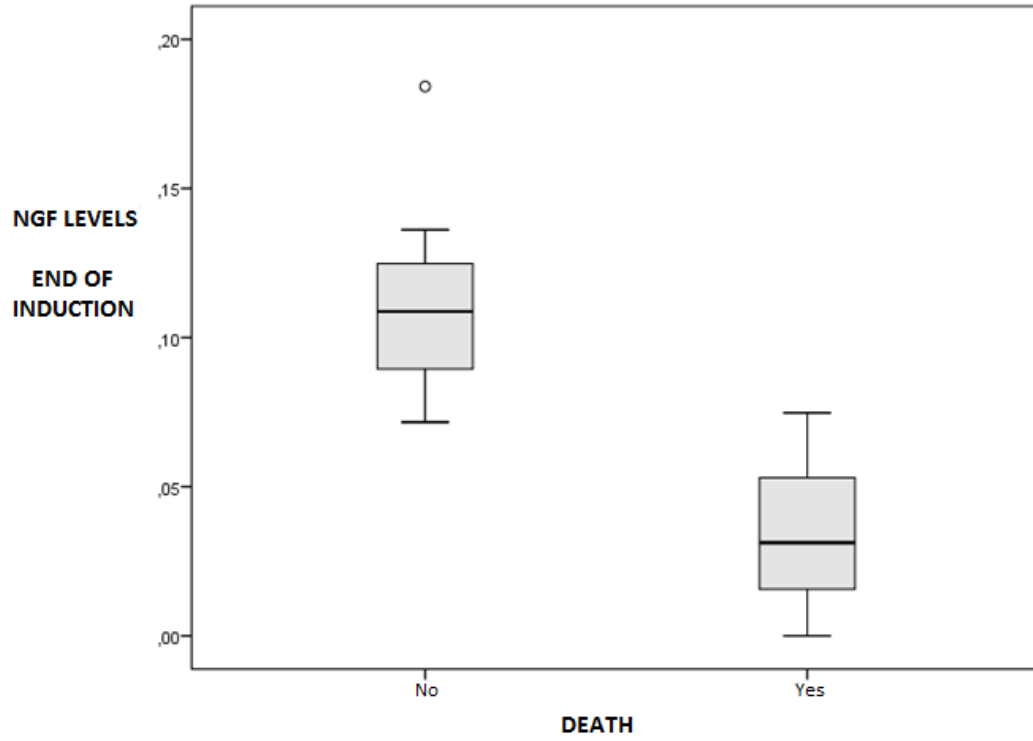
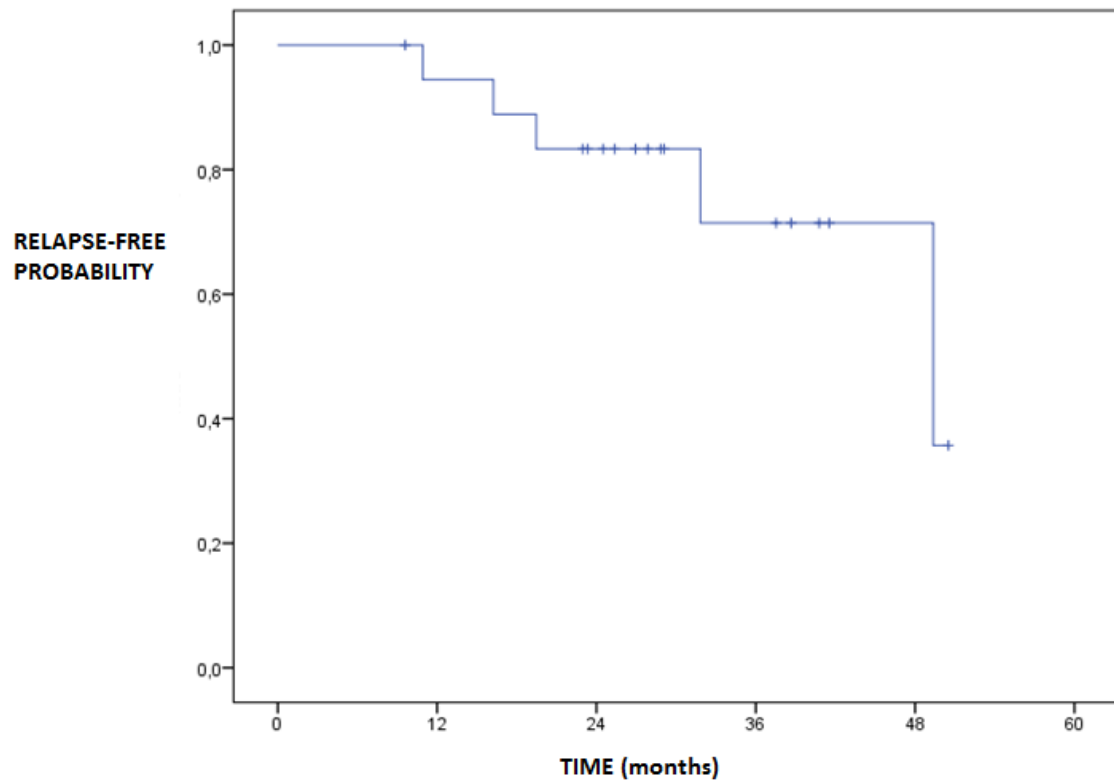


Figure 2 – Neural growth factor (NGF) levels at end of induction phase according to death



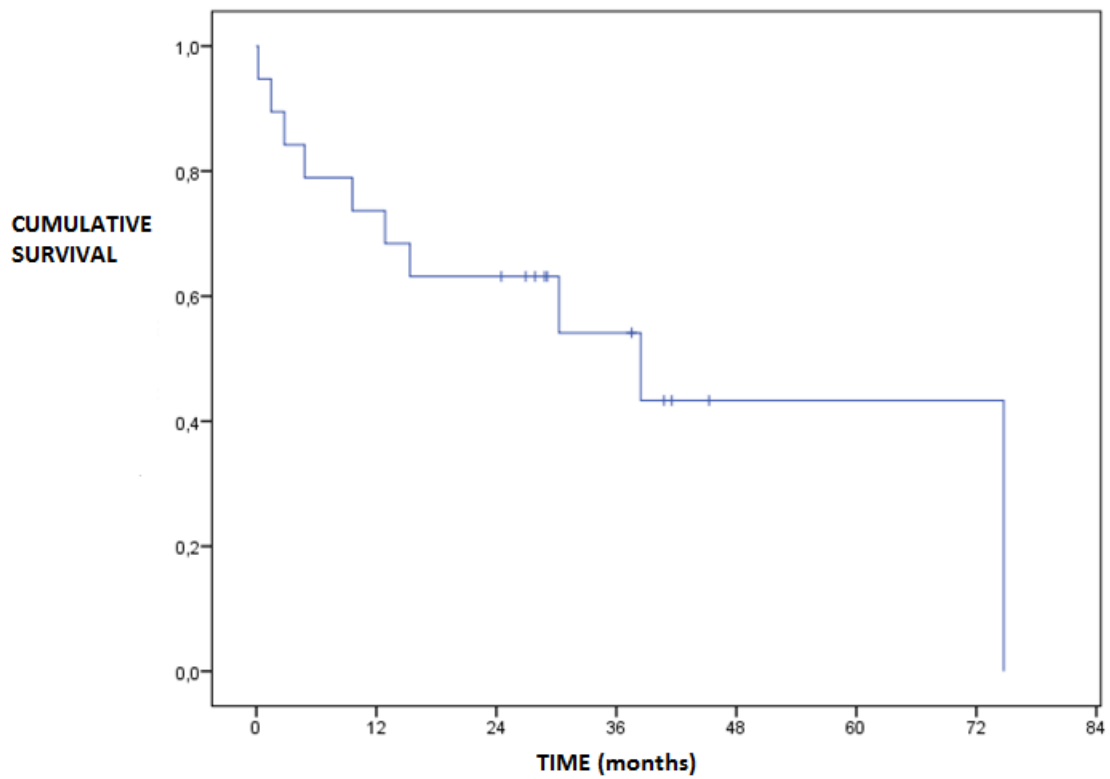
$p = 0,024$

Figure 3 – Relapse-free probability analysis through the Kaplan-Meier curve



Time (months)	Probability of relapse
12	5,6%
24	16,7%
36	28,6%
48	28,6%
60	64,3%

Figure 4 – Overall survival analysis through Kaplan-Meier curve



Time (months)	Death probability
12	26,3%
24	36,8%
36	45,9%
48	56,7%
60	56,7%

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A medicina moderna permite que a grande maioria das crianças e adolescentes diagnosticados com leucemia aguda tenham tratamento adequado e altas chances de cura. O papel da citogenética vem crescendo muito, permitindo detectar alterações antes desconhecidas e que, na grande maioria das vezes, são as responsáveis pelos desfechos desfavoráveis. Isso possibilita a busca e criação de novas drogas-alvo que já vem possibilitando um tratamento mais personalizado e eficaz.

Permanecem, contudo, pequenos grupos de pacientes que não entram em remissão com a terapêutica padrão, recaem precoce ou tardiamente e/ou que manifestam severas toxicidades, com eventuais sequelas do tratamento.

A busca pelo conhecimento completo da fisiopatologia das leucemias ainda não se esgotou e permanece em constante estudo. Todos os grandes grupos de pesquisa acreditam que precisamos buscar o aprimoramento de marcadores prognósticos, classificação de risco e novas opções terapêuticas para que, então, todas as crianças e adolescentes sejam passíveis de cura.

Este trabalho pioneiro foi desenvolvido a partir do desejo de entender o papel do NGF nas leucemias agudas pediátricas e contribuir com a busca de conhecimento citada anteriormente. Apesar do pequeno número de pacientes, já foi possível perceber que esta neurotrofina está presente na medula e no sangue periférico dos pacientes com leucemia, identificando-se variações de concentração entre os diferentes subgrupos e prognósticos.

É consenso nos protocolos atuais de tratamento que a avaliação da resposta após a primeira fase de quimioterapia tem valor prognóstico importante. Esta avaliação indica, quando positiva, maiores índices de recaída, refratariedade e mortalidade. Neste primeiro momento do nosso trabalho, pudemos observar que os pacientes que evoluíram a óbito apresentavam níveis significativamente mais baixos de NGF, ao final da primeira etapa de tratamento – indução - do que os que não tiveram este desfecho. Portanto, acreditamos que dosar o nível de NGF nesta fase possa vir a ser um novo e importante marcador prognóstico. Permitirá uma sensibilidade maior de detecção do subgrupo de pacientes de alto risco e, conseqüentemente, uma adequação de terapia e desfechos mais satisfatórios.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Nos próximos meses ampliaremos este trabalho com a análise de novas e mais amostras de pacientes com leucemia aguda pediátrica. Além disso, iremos comparar estes resultados com os níveis de NGF de um grupo controle de pacientes sem leucemia. Novas amostras já estão coletadas e armazenadas. Também mantemos uma rotina contínua de coleta de amostra dos pacientes do Serviço de Oncologia. Tão breve seja possível, procederemos novas análises para expandir as avaliações. Sabemos que é preciso aumentar o número de pacientes incluídos para confirmar os resultados encontrados e, possivelmente, conseguir estabelecer outras associações existentes entre os níveis de NGF e as leucemias agudas pediátricas.

Mesmo com todos os avanços obtidos nos últimos anos no tratamento das leucemias agudas, ainda persiste uma parcela significativa de pacientes que não atingem remissão, recaem ou, eventualmente, morrem. Acreditamos que medir os níveis de NGF nas diferentes etapas do tratamento, possa ser, no futuro, um marcador prognóstico importante. Isso permitirá ao oncologista mais um dado para classificar o risco do paciente e, conseqüentemente, direcionar a opção de tratamento mais adequada, reduzindo doses e toxicidade nos casos de baixo risco ou intensificando/modificando drogas em pacientes de alto risco.

Futuramente, pensamos ainda que interferir na via de sinalização NGF/TrkA e/ou NGF/p75^{NTR} possa ser uma nova modalidade terapêutica. Em outros tipos tumorais e em alguns testes em modelos animais, modificar a expressão de neurotrofinas já vem demonstrando bons resultados. Esperamos que nas leucemias agudas pediátricas isso também venha a ser possível e incorporado nos protocolos de tratamento, melhorando a sobrevida dos pacientes e reduzindo as toxicidades associadas ao tratamento.

10 ANEXOS E/OU APÊNDICES

A. Termo de consentimento livre e esclarecido

Nº CAAE 55527216.0.0000.5327

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE NGF EM LEUCEMIAS AGUDAS PEDIÁTRICAS

O (a) paciente pelo (a) qual você é responsável está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar os níveis de uma neurotrofina, chamada fator de crescimento neural (NGF), em leucemias agudas pediátricas. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Laboratório de Pesquisa em Câncer do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

As neurotrofinas são proteínas que estão envolvidas no desenvolvimento de alguns tumores de adultos e por isso estamos estudando se a neurotrofina NGF pode estar envolvida nas leucemias agudas pediátricas.

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes:

No momento em que for realizado exames de rotina, coleta de sangue periférico e/ou medula óssea, retiraremos uma pequena quantidade a mais do material biológico, equivalente a 1 colher de chá (2 - 4 mL), para utilização na pesquisa. Além disso, faremos consulta ao prontuário do participante para confirmar datas das coletas, características da doença e evolução do tratamento. Por isso, aproveitamos para solicitar a sua autorização para realizar este acesso ao prontuário. Lembramos que o tratamento clínico do participante será o mesmo independentemente de você aceitar ou não a participação na pesquisa.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconsentir com o uso do material.

() Aceito que as amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

() Não aceito que as amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

A coleta de sangue periférico e/ou medula óssea será realizada no mesmo momento da solicitação médica para avaliação do paciente. Desconfortos durante os procedimentos podem ocorrer, como mal-estar passageiro ou mancha roxa no local

da coleta. É importante você saber que a participação na pesquisa não agrega riscos a estes procedimentos que já são realizados na rotina assistencial e fazem parte do tratamento.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos ao participante. Contudo, a participação nesta pesquisa poderá nos ajudar a melhor entender as leucemias agudas pediátricas e, possivelmente, trazer avanços ao tratamento dos pacientes no futuro.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Rafael Roesler pelo telefone 3359-7616, com a pesquisadora Caroline de Farias pelo mesmo telefone ou com a pesquisadora Rebeca Marques pelo telefone 3359-8522. O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre também poderá ser contatado pelo telefone 3359-7640 ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura (*se aplicável*)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o termo

Assinatura

Local e Data: _____