

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Matheus Loureiro da Silva Cruz

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *TOLL-LIKE RECEPTORS 2, 3 E 4* E DA
RESPOSTA FRENTE AOS SEUS AGONISTAS EM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA**

Porto Alegre

2018

Matheus Loureiro da Silva Cruz

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *TOLL-LIKE RECEPTORS 2, 3 E 4* E DA
RESPOSTA FRENTE AOS SEUS AGONISTAS EM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Caroline Brunetto de Farias

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

LOUREIRO DA SILVA CRUZ, MATHEUS
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TOLL-LIKE RECEPTORS 2,
3 E 4 E DA RESPOSTA FRENTE AOS SEUS AGONISTAS EM
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA / MATHEUS LOUREIRO DA SILVA
CRUZ. -- 2018.
77 f.
Orientador: CAROLINE BRUNETTO DE FARIAS.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre,
BR-RS, 2018.

1. RECEPTORES DO TIPO TOLL. 2. LEUCEMIAS AGUDAS.
3. LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA. 4. TUMORES PEDIÁTRICOS.
5. CÂNCER INFANTIL. I. BRUNETTO DE FARIAS, CAROLINE,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Matheus Loureiro da Silva Cruz

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *TOLL-LIKE RECEPTORS 2, 3 E 4* E DA
RESPOSTA FRENTE AOS SEUS AGONISTAS EM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

Aprovado em _____ de _____ de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Lúcia Abujamra
(PPGBiotec-Univates)

Dra. Elizandra Braganhol
(UFCSPA)

Dra. Nadja Schroder
(PPGFT UFRGS)

INSTITUIÇÕES E FONTE FINANCIADORA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Câncer e Neurobiologia no Centro de Pesquisas Experimentais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Instituto do Câncer Infantil (ICI) e do programa de fomento à pesquisa do Ministério da Saúde (MS)/CNPq/FAPERGS PPSUS Processo nº: 1245-2551/13-0.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não foi nada fácil, mas se chegamos aqui é porque contei com ajuda de inúmeras pessoas. Gostaria de agradecer primeiramente a minha orientadora Caroline Brunetto, que me deu uma grande oportunidade de trabalhar no laboratório, que apostou muito em mim, me apoiou, me incentivou e puxou a minha orelha quando necessário. Também agradeço ao professor Rafael Roesler, “co-orientador” do coração, pelos ensinamentos e pela oportunidade. Acima de tudo agradeço a vocês, Carol e Rafa, por não terem desistido de mim ao longo desses anos e pela capacidade extraordinária de liderar nosso grupo.

Obrigado aos colegas do laboratório Marco, Kelly, Perla, Amanda, Carol, Duda, Duda, Lívia, Nathi, Bruno, Sophia, Paula e Martina pelo apoio e pela convivência. Um agradecimento especial as pessoas que me ajudaram no desenvolvimento e na conclusão deste trabalho, Rafa Santos, Bárbara, Mariane, Camila. Cada um de vocês me ajudou ou nos experimentos, no artigo, na dissertação, nas conversas científicas. Muito obrigado!

Agradeço:

Aos meus amigos que participaram ativamente ou não da minha vida pós-acadêmica, que me apoiaram a cima de tudo, que me ajudaram a não perder o foco.

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

E por fim, agradeço a minha família: minha mãe, minha vó, meus tios e meus primos, que são a base de tudo na minha vida, que sempre me apoiaram em tantas situações e nunca deixaram faltar nada para eu concluir esta etapa da minha vida.

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

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS	08
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	09
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Câncer infantil	14
1.2 Leucemias agudas pediátricas	15
1.3 Leucemia Linfoide Aguda	17
1.3.1 Aspectos gerais, epidemiologia e etiologia	17
1.3.2 Aspectos clínicos.....	18
1.3.3 Diagnóstico	19
1.3.3.1 Diagnóstico morfológico e imunofenotípico	19
1.3.3.2 Diagnóstico citogenético	21
1.3.4 Classificação de risco e fatores prognósticos.....	24
1.3.5 Tratamento.....	26
1.3.6 Perspectivas de tratamentos.....	31
1.3.7 Doença residual mínima.....	32
1.4 Toll-Like Receptors	35
1.4.1 Toll-Like Receptor 2.....	38
1.4.2 Toll-Like Receptor 3.....	39
1.4.3 Toll-Like Receptor 4.....	40
1.4.4 TLRs e o câncer.....	41
2. Justificativa	45
3. OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
5. RESULTADOS	51
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	63

8. PERSPECTIVAS	64
9. REFERÊNCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenvolvimento de células sanguíneas a partir de uma célula-tronco.

Figura 2. Demonstração as vias de sinalização, juntamente com a cascata intracelular ativada pelo TLRs, com o recrutamento das moléculas adaptadoras e seus principais efeitos.

Figura 3. Sinalização do TLR3. A ligação do ligante de TLR3 (dsRNA) com o posterior recrutamento de moléculas adaptadoras que levam a ativação de fatores de transcrição que intensificam a codificação de citocinas pró-inflamatórias.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais achados clínicos ao diagnóstico de LLA.

Tabela 2. Padrão de expressão antigênica nas leucemias linfoides agudas.

Tabela 3. Subdivisões da LLA e suas alterações cromossômicas.

Tabela 4. Diferença clínicas.

Tabela 5. Quimioterápicos administrados no tratamento de Leucemia Linfóide Aguda.

Tabela 6. Combinações imunofenotípicas usadas no estudo de DRM na LLA.

Tabela 7. Toll-like receptors, principais ligantes, proteínas adaptadoras e resposta.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo: Anticorpos monoclonais específicos

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

D35: Corresponde ao momento final da terapia de indução

DAMPs: *Damage-associated molecular patterns*

DRM: Doença residual mínima

dsRNA: *Double-stranded RNA*

IFN: *Interferon*

IFN- γ : *Interferon gamma*

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

IKK ϵ : ou TBK1

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IRAK: *Interleukin-1 receptor-associated kinases*

IRF-3: *Interferon regulatory factor-3*

LLA: Leucemia linfóide aguda

LLC: Leucemia linfóide crônica

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crônica

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

LTA: Ácido lipoteicoico

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

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*

MM: Mieloma múltiplo

MYD88: *Myeloid differentiation factor 88*

NCI: *National Cancer Institute*

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

NF-κB: *Nuclear factor kappa B*

NK: *Células natural-killer*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns*

Ph: Cromossomo filadélfia t(9;22)

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

ssRNA: *Single stranded RNA*

TBK1: *TANK-binding kinase 1*

TCTH: Transplante de células tronco hematopoiéticas

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

TIR: *Toll/Interleukin-1 receptor*

TLR1: *Toll-like receptor 1*

TLR2: *Toll-like receptor 2*

TLR3: *Toll-like receptor 3*

TLR4: *Toll-like receptor 4*

TLR5: *Toll-like receptor 5*

TLR6: *Toll-like receptor 6*

TLR7: *Toll-like receptor 7*

TLR8: *Toll-like receptor 8*

TLR9: *Toll-like receptor 9*

TLRs: *Toll-like receptors*

TNF- α : *Fator de necrose tumoral alfa*

TRAF2: *TNF receptor-associated factor 2*

TRAF3: *TNF receptor-associated factor 3*

TRAF6: *Receptor-associated factor 6*

TRAM: *TRIF-related adaptor molecule*

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

RESUMO

O câncer infantil representa cerca de 1 a 4% das neoplasias da população em geral, com incidência maior no sexo masculino. Os tumores infantis crescem rapidamente e são mais invasivos do que as neoplasias adultas, entretanto, respondem melhor a tratamentos. A leucemia linfóide aguda (LLA) corresponde a 79% das leucemias pediátricas, que por sua vez é um terço das neoplasias infantis. Cerca de 30% das crianças não respondem ao tratamento e 50% destes vão a óbito, o que aponta a necessidade de tratamentos que elevem a taxa de cura e com menos efeitos colaterais. Os receptores do tipo Toll, do inglês, *Toll-Like Receptors* (TLRs), são componentes essenciais do sistema imune. Por meio do reconhecimento de estruturas moleculares conhecidas como PAMPs e DAMPs, são capazes de desencadear uma resposta dirigida a eliminar esses patógenos e desenvolver uma memória imunológica. Evidências sugerem que o funcionamento inadequado das sinalizações dos TLRs contribui significativamente para o desenvolvimento de câncer. Em leucemias, estudos vem demonstrando a relação da diferença de expressão gênica de TLRs entre pacientes e indivíduos saudáveis, com a evolução clínica e desfecho. Portanto, analisar a expressão e contribuição dos TLRs para o desenvolvimento das neoplasias hematológicas, bem como se as diferenças na sua expressão afetam o curso clínico da doença, pode revelar resultados importantes que poderão ser relacionados ao tratamento farmacológico ou até mesmo imunoterápico. O objetivo central deste trabalho foi avaliar o efeito de agonistas específicos de TLR2, TLR3 e TLR4 sobre a viabilidade e proliferação celular de linhagens celulares de LLA infantil Jurkat e Sup-B15 e avaliar a expressão de mRNA dos TLR2, TLR3 e TLR4 em células leucêmicas de pacientes pediátricos com LLA ao diagnóstico (D0) e no momento da indução (D35), correlacionando os resultados com os dados clínicos dos pacientes. Neste estudo, verificamos que o tratamento reduziu a viabilidade celular de Jurkat e Sup-B15 e alterou a distribuição do ciclo celular da linhagem Jurkat levando a uma redução de células poliploides, as quais são fortemente associadas a processos de malignidade tumoral e a um acúmulo na fase Sub-G1, o que pode ser um indicativo de morte celular por apoptose. Houve um aumento da expressão gênica destes receptores nas amostras dos pacientes entre os momentos D0 e D35. O aumento da expressão de TLR3 e TLR4 foi maior nos pacientes do grupo de alto risco e de TLR2 nos pacientes do grupo de baixo risco e intermediário. Pacientes com alta expressão de TLR2 e baixa expressão de TLR4 no momento D35 tiveram menor sobrevida global. É necessário compreender como os TLRs contribuem para o desenvolvimento das leucemias pediátricas, como sua expressão afeta o curso clínico da doença e aspectos relacionados ao tratamento farmacológico ou até mesmo imunoterápico.

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

ABSTRACT

Childhood cancer accounts for about 1 to 4% of neoplasms in general population, with a higher incidence in males. Infantile tumors grow rapidly and are more invasive than adult neoplasms, however, they respond better to treatments. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) accounts for 79% of pediatric leukemias, which in turn accounts for one-third of childhood malignancies. About 30% of children do not respond to treatment and 50% of them have death as outcome, which indicates the need for treatments that raise the cure rate and decrease side effects. Toll-Like Receptors (TLRs) are essential components of the immune system. Through the recognition of molecular structures present in pathogenic organisms, they are able to trigger a response aimed at eliminating these pathogens and developing an immunological memory. Evidence suggests that the inadequate functioning of TLR signaling contributes significantly to the development of cancer. In leukemias, studies have demonstrated the relationship of the difference in gene expression of TLRs between healthy patients and individuals, with clinical evolution and outcome. Therefore, analyzing the expression and contribution of TLRs to the development of hematological malignancies, as well as whether the differences in their expression affect the clinical course of the disease, may reveal important results that may be related to pharmacological or even immunotherapeutic treatment. The objective of this study was to evaluate the effect of specific TLR2, TLR3 and TLR4 agonists on the viability and cell proliferation of childhood ALL cell lines and to evaluate the mRNA expression of TLR2, TLR3 and TLR4 in leukemic cells of pediatric patients with ALL at the moment of diagnosis (D0) and of induction (D35) and correlating these results with the clinical data. Project approved in CEP-HCPA, CAAE n°: 46929015.7.0000.5327, GPPG-HCPA n° 15-0318. In this study, we verified that the treatment reduced the cell viability of Jurkat and Sup-B15 and altered cell cycle distribution in Jurkat cell line leading to a reduction of polyploid cells, associated to tumor malignancy processes and an accumulation in Sub- G1 phase, which might be an indicative of cell death by apoptosis. There was an increase in the gene expression of these receptors in the patient samples between moments D0 and D35. The increase in TLR3 and TLR4 expression was higher in patients in the high-risk and TLR2 groups in the low-risk and intermediate-group patients. Patients with high TLR2 expression and low TLR4 expression at the time D35 had lower overall survival. It is necessary to understand how TLRs contribute to the development of pediatric leukemias, how their expression affects the clinical course of the disease and aspects related to pharmacological or even immunotherapeutic treatment.

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

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer infantil

Atualmente, a ocorrência de câncer em crianças e em adolescentes é rara, cerca de 1 a 4% de todas neoplasias da população em geral (INCA,2018), embora a incidência geral em câncer infantil, incluindo LLA tem aumentado gradualmente desde 1975 (SMITH et al., 2014). Os tumores infantis crescem rapidamente e são mais invasivos, apresentando características histopatológicas e biológicas diferentes das neoplasias malignas que acometem adultos (DIXON et al., 2018). Por esse motivo, o câncer infanto-juvenil deve ser estudado e tratado separadamente daqueles que acometem os adultos, principalmente no que diz respeito ao comportamento clínico. Existe uma variação na proporção dos vários tipos de câncer infanto-juvenil nas populações.

Em alguns países em desenvolvimento, onde a população de crianças chega a 50%, a proporção do câncer infantil representa de 3% a 10% do total de neoplasias. Já nos países desenvolvidos, essa proporção diminui, chegando a cerca de 1% (MURPHY; XU; KOCHANNEK, 2013). A mortalidade também possui padrões diferentes, enquanto que nos países desenvolvidos o óbito por neoplasia é considerado a segunda causa de morte na infância, correspondendo a cerca de 4% a 5% (crianças de 1 a 14 anos), em países em desenvolvimento, essa proporção é menor, cerca de 1%, porque as mortes por doenças infecciosas são as principais causas de óbito (FACINA, 2014). Nos últimos 50 anos o melhor entendimento fisiopatológico e os novos protocolos de tratamento permitiram um avanço significativo no tratamento e conseqüente melhora da sobrevida.

Hoje, utilizando protocolos consolidados de tratamento, é possível obter sobrevida acima de 90% em muitos casos (LEE; CHO, 2017). Para isso, o tratamento dos pacientes infanto-juvenis deve ser realizado em centros médicos, os quais devem disponibilizar suporte material tecnológico e uma equipe multidisciplinar especializada no tratamento onco-pediátrico. Essa característica multidisciplinar é importante pela incorporação de abordagens específicas implementadas por cada profissional da área de saúde tais como médicos oncologistas pediátricos, fisioterapeutas, psicólogos,

enfermeiros, biomédicos, biólogos, farmacêuticos, entre outros profissionais que auxiliam não somente o paciente, como também sua família. Essa forma de acompanhamento assegura que o paciente receba o melhor tratamento disponível visando sua recuperação e melhora da qualidade de vida (CORRIGAN; FEIG; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2004; SMITH et al., 2014).

1.2 Leucemias agudas pediátricas

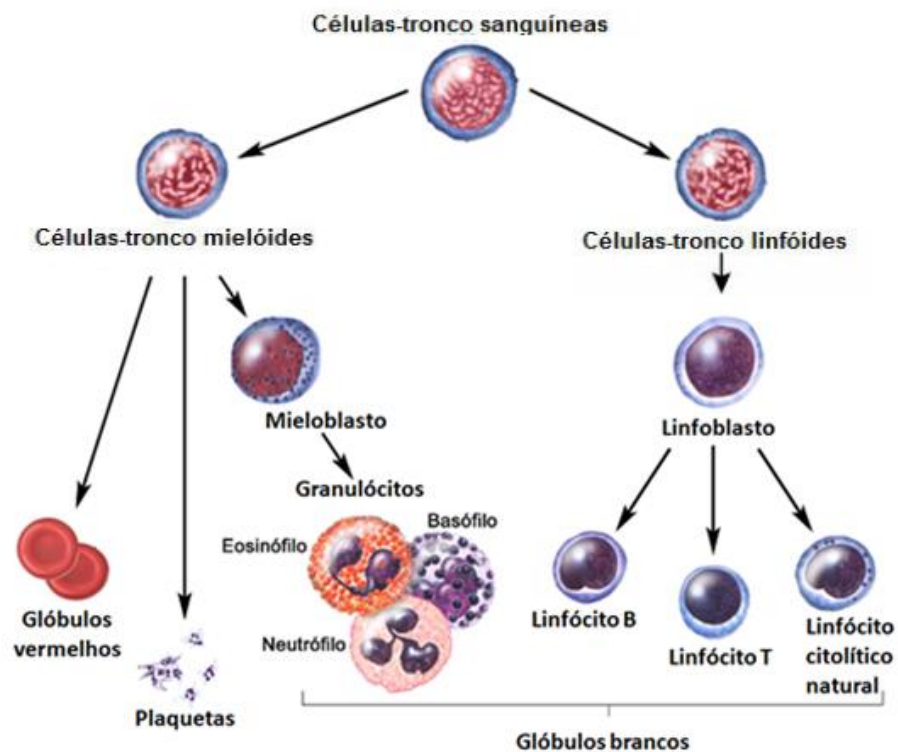
A leucemia aguda é a forma mais comum de câncer pediátrico, correspondendo aproximadamente a 30% dos casos em indivíduos menores de 15 anos (HUNGER et al., 2012). Seguida em ordem de frequência pelos tumores de sistema nervoso central (SNC) e linfomas. Das leucemias pediátricas, a leucemia linfóide aguda (LLA) corresponde a 80%, sendo quatro vezes mais comum do que a leucemia mieloide aguda (LMA) (GAYNON et al., 2010; PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002a; REDAELLI et al., 2005).

Leucemias agudas são neoplasias primárias de medula óssea caracterizada por formarem um grupo heterogêneo de doença na qual existe a substituição dos elementos medulares e sanguíneos normais por precursores celulares hematopoiéticos, de origem linfóide ou mieloide, bem como, acúmulo destas células em outros tecidos. Essa transformação pode surgir a partir de mutações genéticas espontâneas que levam a proliferação desregulada e expansão clonal da célula anormal resultante (MEYER et al., 2013).

Para o entendimento da origem desta neoplasia é necessário o conhecimento da formação normal do sangue. A medula óssea é um tecido esponjoso que preenche as cavidades ósseas e é o local onde são produzidas todas as células sanguíneas, em um processo conhecido como hematopoiese. As células-tronco hematopoiéticas encontradas na medula óssea são responsáveis pela diferenciação em glóbulos vermelhos, responsáveis pelo transporte de oxigênio pelo corpo, plaquetas, responsáveis pela formação de coágulos sanguíneos e glóbulos brancos, fortes atuantes no combate às infecções (NCI, 2018). A figura 1 mostra as duas vias de diferenciação das células tronco: a via mieloide e a via linfóide. A via mieloide dá origem a glóbulos vermelhos, plaquetas e granulócitos, enquanto a via linfóide da

origem aos diferentes tipos de glóbulos brancos do sangue, como linfócitos B, T e linfócitos *Natural Killer*, também conhecido como linfócito citolítico natural.

Figura 1: Desenvolvimento de células sanguíneas a partir de uma célula-tronco.



Fonte: Adaptado de NCI, 2018.

A classificação das leucemias agudas pediátricas é feita de acordo com os aspectos citomorfológico, citoquímico, imunofenotípico, citogenético e molecular, como detalhado pela classificação de neoplasias linfóides em 2008, pela organização mundial de saúde (OMS) (JAFÉ, 2009; VARDIMAN et al., 2009). A avaliação morfológica do aspirado de medula óssea ou biópsia, ainda hoje, representa o primeiro passo no diagnóstico, para primeiramente diferenciar a LLA da LMA (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002a, 2002b).

1.3 Leucemia Linfoide Aguda

1.3.1 Aspectos gerais, epidemiologia e etiologia

A leucemia linfoide aguda (LLA) é uma doença clonal do tecido hematopoiético caracterizada pela transformação maligna de células precursoras linfoides na medula óssea. Essa transformação pode surgir a partir de mutação genética espontânea que leva a proliferação desregulada e expansão clonal da célula anormal resultante (MEYER et al., 2013). Um pico agudo da incidência de LLA é observado em crianças de 2 a 3 anos de idade (maior do que 90 casos por milhão por ano), com taxas que reduzem para 30 casos por milhão em crianças com até 8 anos (WARD et al., 2014). A incidência de LLA em crianças de 2 a 3 anos é cerca de 4 vezes maior do que em recém-nascidos e é igualmente 4 vezes maior do que em crianças com 10 anos ou mais (NCI, 2018). Além disso, a incidência vem aumentando desde os anos de 1975 a 2010, respectivamente, de 25 casos por milhão a 34 casos por milhão, representando um aumento médio de 0,7% (WARD et al., 2014).

A etiologia da LLA pode estar associada a alguns fatores ambientais e genéticos. Existem evidências para alguns fatores de risco, como exposição à radiação ionizante, medicamentos utilizados em quimioterapia e exposição ocupacional ao benzeno, entre outros (INCA, 2015). Os primeiros indícios de que a exposição à radiação ionizante levava ao desenvolvimento de leucemia foram estudados após os bombardeios nucleares no Japão, durante a II Guerra Mundial, onde foi observado um excesso nas taxas de incidência para LLA, LMA e LMC (HSU et al., 2013; RON et al., 1994). Por outro lado, as doenças cromossômicas constitucionais, como síndrome de Bloom, neurofibromatose, anemia de Fanconi, ataxia telangectasia, Li-Fraumeni e trissomia do 21 (ARELLANO-GALINDO et al., 2017; PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002a) tem risco mais elevado de desenvolver leucemia aguda. As altas taxas de leucemia familiar, a alta incidência de leucemia em gêmeos idênticos e as alterações citogenéticas características em blastos leucêmicos; tudo isso sustenta a associação entre LLA e a genética (LI et al., 2014).

O desenvolvimento de LLA é um processo que ocorre na maioria das vezes em múltiplas etapas com mais de uma alteração genética necessária. Em pelo menos alguns casos de LLA infantil, a alteração genômica inicial parece ocorrer ainda no útero. Tais evidências vêm de observações de imunoglobulinas ou do rearranjo de antígenos de receptores de células T que são únicos em cada grupo de células leucêmicas do paciente podendo ser detectada em amostras obtidas no nascimento (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002a). Agentes infecciosos virais podem contribuir com a patogênese da leucemia, entretanto, o contato com esses agentes, também, pode ser um fator de proteção, por estimular a imunidade. Um vírus comumente descrito como possível agente indutor para o desenvolvimento da leucemia e de linfomas é o Epstein Barr, este vírus apresenta tropismo por linfócitos B (ARELLANO-GALINDO et al., 2017; MAIA; WUNSCH FILHO, 2013).

Entretanto, diferente das patologias em adultos, quando se trata de fatores de risco para patologias pediátricas encontramos opções 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.

1.3.2 Aspectos clínicos

O quadro clínico da LLA depende do grau de infiltração da medula óssea bem como da extensão da doença extramedular. Os sintomas mais comuns da LLA são inespecíficos e podem ser difíceis de distinguir de outras doenças autolimitadas consideradas comuns na infância, exigindo dessa forma um diagnóstico diferencial. Os principais achados clínicos ao diagnóstico da LLA são mostrados na tabela 1 a seguir. Dentro do quadro clínico encontramos palidez, fadiga, anorexia, artralgia e artrite. As alterações musculoesqueléticas são frequentes nas leucemias agudas da infância, tanto na linfoide quanto na mieloide (ROBAZZI et al., 2007). Outros achados clínicos que podem estar presentes são aumento testicular e presença de massa mediastinal.

Tabela 1. Principais achados clínicos ao diagnóstico de LLA.

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

Fonte: Adaptado de Manual de Oncologia, 3ª Edição, 2008.

1.3.3 Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico para LLA integra características morfológicas, citoquímicas, imunofenotípicas e citogenéticas para a classificação de neoplasias linfoides, estes parâmetros determinados desde 2008 pela organização mundial de saúde (OMS) do inglês, *World Health Organization* (WHO) (CAMPO et al., 2011; VARDIMAN et al., 2009).

1.3.3.1 Diagnóstico morfológico e imunofenotípico

O critério para diagnóstico de LLA é a presença de 20% de blastos na contagem diferencial das células nucleadas na medula óssea (JAFFE, 2009). Entretanto, essas avaliações são limitadas para o diagnóstico preciso do tipo de LLA, uma vez que a partir do ponto de vista morfológico não é possível distinguir entre linhagem B ou T. Com a aplicação da técnica de Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo (IMF) é possível contornar esse problema, uma vez que se possibilita identificar os antígenos de superfície, intracitoplasmáticos e nucleares pelo uso de anticorpos monoclonais (AcMo) específicos, além de caracterizar as células leucêmicas quanto a sua origem

e grau de diferenciação. Por essa razão a IMF é obrigatória para a definição da origem celular B ou T, como também os subtipos imunofenotípicos que são de relevância para prognóstico e tratamento dos pacientes (BÉNÉ et al., 2011).

A maioria das LLA é de linhagem B, cerca de 70 a 80% dos casos. A linhagem B é demonstrada principalmente pela expressão dos marcadores CD19, CD20, CD22, CD24, CD79a (MAINO et al., 2015). Dentre as leucemias derivadas de precursores B, admitem-se basicamente três estágios maturativos: pró-B, pré-B e B maduro, de acordo com a expressão de imunoglobulina citoplasmática e de superfície (tabela 2). De todos os marcadores de superfície utilizados para definição do subgrupo de LLA, o antígeno CD10 (CALLA: antígeno comum de LLA) está presente em 90% das leucemias pró-B e 95% das pré-B e sua presença indica um bom prognóstico. Por outro lado, a ausência de CALLA pode estar associada a fatores de mau prognóstico, tais como idade inferior a 12 meses, leucometria elevada, visceromegalia e infiltração do SNC (BJÖRKLUND et al., 2003; HOWARD et al., 2004).

Em leucemias derivadas de linhagem T, que compreendem de 15 a 17% dos casos de LLA, os marcadores linfoides associados a esta linhagem são: CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 e CD8; conforme observados na tabela 2 a seguir. Os marcadores CD2, CD5 e CD7 são comum a maioria das células T imaturas, mas nenhum deles é linhagem específica de modo que o diagnóstico necessita da presença do marcador CD3 (LIU et al., 2014).

Em LLA T, são reconhecidos três estágios de maturação, Timócito precoce, Timócito comum e Timócito tardio. São diferenciados pela presença de marcadores de maturação na superfície celular, mas principalmente pela diferença de intensidade de CD3 superficial (LIU et al., 2014).

Pode haver coexpressão de marcadores genéticos de células-tronco mieloides e de linhagens linfoides diferentes entre si como por exemplo LLA-T coexpressando CD19 ou CD79a, ou a expressão de marcadores mieloides CD13 e CD33 (SCHWICKERT et al., 2014). A expressão de marcadores de linhagens distintas deve ser avaliada no sentido de diferenciar a presença de um padrão de expressão antigênica aberrante de leucemia bifenotípica (LIU et al., 2014; SCHWICKERT et al., 2014). A tabela 2 abaixo mostra os três estágios de maturação para cada linhagem celular e seus antígenos principais.

Tabela 2. Padrão de expressão antigênica de leucemias linfoides agudas.

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

Fonte: Adaptado de Manual de Oncologia, 3ª edição, 2008.

1.3.3.2 Diagnóstico citogenético

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

A citogenética convencional baseia-se no estudo dos cromossomos em metáfase. O aspirado de medula óssea com no mínimo 20% de blastos deve ser submetido a cultura por 24 horas. O número requerido de células é pequeno (1×10^4 a

1 x10⁵ células lançadas na cultura já são suficientes). Após este tempo a cultura é interrompida com colchicina, hipotonizada com KCl e lavada com fixador de Carnoy. As células presentes na cultura são “pingadas” em lâmina e coradas por bandamento G. Vinte metáfases são analisadas, onde os cromossomos são pareados e comparados. A análise deve ser descrita de acordo com as normas do Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN-2005) (HEEREMA; CATALINA RAIMONDI, 2018). Entretanto a maior limitação dessa técnica é que em alguns casos as células leucêmicas falham ao entrar na metáfase, o que impossibilita o diagnóstico por essa técnica.

Por outro lado, a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) parece contornar esse problema, sendo possível detectar e visualizar de maneira direta anormalidades cromossômicas em LLA com até 99% de sensibilidade (MAZLOUMI et al., 2012). Outras técnicas de identificação genômica como microarranjo (array-CGH), arranjo de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) podem permitir a identificação de mudanças sub-microscópicas e ocultas no genoma (HEALY et al., 2007). As alterações cromossômicas que acometem cerca de 60 a 85% dos casos de LLA são numéricas e estruturais. Tais mudanças cariotípicas que possam ocorrer em LLA podem ser relacionadas ao prognóstico da doença, levando a uma subdivisão demonstrada na tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Subdivisões da LLA e suas alterações cromossômicas.

Subtipo	Prevalência (%)	Clínica
LLA B		
Hiperploídia com > de 50 cromossomos	20 a 30	Excelente prognóstico
Hiperploídia com < de 44 cromossomos	2 a 3	Pior prognóstico, alta frequência de vias Ras e mutações de genes da família IKAROS
Translocação t(12;21)(p13;q22) codificantes de <i>ETV6-RUNX1</i>	15 a 25	Excelente prognóstico
Translocação t(1;19)(q23;p13) codificante de <i>TCF3-PBX1</i>	2 a 6	Geralmente excelente prognóstico, associação com recaída no SNC
Translocação t(9;22)(q21;q23) codificante de BCR-ABL1	2 a 4	Pior prognóstico, indicação de imatinibe e/ou desatinibe a quimioterapia intensiva

LLA tipo Ph	10 a 15	Presença de lesões multiplas quinases ativadas, associada com o aumento da idade, elevados índices de contagem de células brancas, alteração <i>IKZF1</i> , possibilidade de terapia com inibidores de tirosina quinase
Translocação t(4;11)(q21;q23) que codifica fusão <i>MLL-AF4</i>	1 a 2	Comum em LLA infantil, especialmente em idade < 6 meses, associada a pior prognóstico
Translocação t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(q12;q24), t(2;8)(q12;q24) que codifica rearranjo MYC	2	Prognóstico favorável com quimioterapia de alta dose por tempo curto
Rearranjo <i>CRLF2</i> (IH-CRLF2; P2RY8-CRLF2)	5 a 7	Comum em síndrome de Down, associado com LLA tipo <i>Ph</i> (~50%), com deleção <i>IKZF1</i> e/ou mutação de <i>JAK1/2</i> (pior prognóstico em LLA não associada a síndrome de down)
LLA com defeito ERG	7	Distintos perfis de expressão gênica

LLA T

Translocação t(1;7)(p32;q32) e t(1;14)(p32;q11), deleção 1p32; desregulação <i>TAL1</i>	15 a 18	Geralmente desfechos favoráveis
Translocação t(11;14)(p15;q11) e deleção <i>LMO2</i>	10	Geralmente desfechos favoráveis
Translocações t(10;14)(q24;q11) e t(7;10)(q35;q24), desregulação <i>TLX1 [HOX 11]</i>	7	Geralmente desfechos favoráveis
Translocações t(5;14)(q35;q32), desregulação <i>TLX3</i>	20	Pior prognóstico, geralmente fusionado ao <i>BCL11B</i>
Translocação t(10;11)(p13;q14), <i>PICALM-MLLT10 [CALM-AF10]</i>	10	Piores desfechos clínicos
<i>MLL-MLLT1 [MLL-ENL]</i>	2 a 3	Prognóstico semelhante a outros tipos de leucemias com rearranjo <i>MLL</i>
Amplificação 9q34 codificando <i>NUP214-ABL1</i>	6	Possibilidade de terapia com inibidores de tirosina-quinase, fusões identificadas em LLA T inclui <i>EML1-ABL1</i> , <i>ETV6-JAK2</i> e <i>ETV6-ABL1</i>
Translocação t(7;9)(q34;q34)	1	Rearranjo de <i>NOTCH1</i> , com mutações de sequência em > de 50% das LLA T

LLA T precoce	10 a 15	Expressão de fatores mieloides e de marcadores de células tronco, relacionada a pior prognóstico, geneticamente heterogênea com mutações nos reguladores hematopoiéticos, citocinas, sinalização Ras, modificações epigenéticas
---------------	---------	---

Fonte: Adaptado de (HAMERSCHLAK, 2008; PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002a; TEACHEY; HUNGER, 2013).

1.3.4 Classificação de risco e fatores prognósticos

A classificação de risco é baseada através das manifestações e características clínicas do paciente, de forma que isso norteia a escolha do protocolo de tratamento, e estão listados na tabela 4.

Tabela 4. Diferença clínicas.

Baixo Risco	Alto Risco
≥ 1 e < 10 anos	< 1 e ≥10 anos
< 50.000 Leucócitos	≥ 50.000 Leucócitos
Sem acometimento do SNC e outros órgãos	SNC 3 (Envolvimento do SNC)
Presença de antígeno CALLA (CD10)	Ausência de CALLA
Sem citogenética de risco	Ploidia < 46 cromossomos
Avaliação do aspirado (D8) < 1.000 blastos/mm ³	Envolvimento mediastinal e testicular
DRM (D16) por CF < 10%	
DRM (D35) por PCR < 10 ⁻³	DRM (D35) POR pcr ≥ 10 ⁻³

Fonte: Adaptado de LEE; CHO, 2017; TEACHEY; HUNGER, 2013.

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

Além disso, características próprias da célula leucêmica também são utilizadas para determinar o risco da doença, de forma que estas formam ou fazem parte de uma descrição imunofenotípica, através da análise de expressão de proteínas ou marcadores que ajudam a identificar a linhagem celular da leucemia (WOHLFAHRT et al., 2015). Aproximadamente 80% dos pacientes infantis são classificados com o fenótipo LLA-B, os quais são incluídos no grupo de baixo risco da doença (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002a). Por outro lado, cerca de 10 a 15% dos pacientes são classificados fenotipicamente como LLA-T, e isto está fortemente associado a uma baixa taxa de cura. Entretanto, a identificação desses pacientes e o tratamento com esquemas mais agressivos tem levado a uma taxa de sobrevida que se assemelha com a de pacientes LLA-B (GAYNON et al., 2010).

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

Além disso, pacientes com 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 (BUITENKAMP et al., 2014). Este pior prognóstico pode estar relacionado ao maior número de alterações genéticas associadas que estes pacientes têm (LUNDIN et al., 2014). Os meninos costumam ter desfechos menos favoráveis em relação às meninas na maioria dos estudos, o que pode se dever em parte pelo acometimento testicular (HUNGER et al., 2012; PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002b).

A implantação da Doença Residual Mínima (DRM) como mais um critério de definição dos grupos de risco representa um importante avanço no tratamento oncológico no Brasil. O monitoramento periódico da resposta do paciente à terapia tornou-se um componente essencial para permitir possíveis modificações na dosagem e inclusão de outros agentes quimioterápicos ou até mesmo da escolha da modalidade terapêutica. O método de PCR em tempo real (RQ-PCR) consiste em uma técnica simplificada, que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação de PCR. Durante a RQ-PCR, o acúmulo de amplicons é detectado em "tempo real", para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas sequência-específicas ou primers usados na reação.

O uso de transcrição reversa associada a PCR em tempo real tornou a quantificação de mRNA mais simples e precisa. Várias tecnologias de PCR em tempo real estão disponíveis no mercado. Dois sistemas bastante usados são o TaqMan e o SYBR Green, este último, de baixo custo, que possui uma sensibilidade que varia de um mínimo de 10^{-2} até o máximo de 10^{-3} . (BRÜGGEMANN; KOTROVA, 2017; CHENG; ZHAI, 2018; CUI et al., 2018; SCRIDELI et al., 2009). Além da avaliação terapêutica, a técnica de RQ-PCR nas fases iniciais do tratamento pode ser uma ferramenta mais precisa e auxilia na estratificação de grupos de risco (BRÜGGEMANN; KOTROVA, 2017; BUCCISANO et al., 2012; CHENG; ZHAI, 2018). Pode ser realizado também por citometria de fluxo (BARAKA et al., 2017; DELBUONO et al., 2008; KARAWAJEW et al., 2015)

1.3.5 Tratamento

As taxas de sobrevivência para LLA melhoraram significativamente desde os anos 80, com uma taxa de sobrevida global em cinco anos estimada em mais de 85%, para crianças com menos de 15 anos, e em 75%, para adolescentes entre 15 e 19 anos de idade, nos grandes centros (VORA et al., 2013). Esse aumento das taxas se deve ao tratamento de um grande número de crianças em protocolos de pesquisa e de tratamento padronizados e sequenciais. Apesar dos avanços nos índices de cura,

existe a possibilidade da ocorrência de resistência à quimioterapia, além dos efeitos colaterais tardios, consequentes da terapia, como déficit de crescimento, distúrbios relacionados à insuficiência cardíaca e danos neurocognitivos (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002c).

Os pacientes de alto risco possuem uma expectativa de sucesso terapêutico inferior a 50% mesmo quando utilizada uma terapia invasiva. Nesse contexto, cerca de 25 a 30% das crianças apresentam recidiva da doença e, destes pacientes, 50% vão a óbito (TEACHEY; HUNGER, 2013). A LLA é ainda uma das principais causas de morte em crianças com câncer (INCA, 2015). A quimioterapia é o principal tratamento dos pacientes com leucemia, com o objetivo de eliminar as células leucêmicas utilizando compostos químicos combinados ou isolados (ABRALE, 2015).

O uso de fármacos isolados demonstrou ser um método ineficaz em induzir respostas significativas, na maioria dos tumores, sendo atualmente de uso muito restrito. A poliquimioterapia faz uso de diferentes combinações de quimioterápicos de eficácia comprovada e tem como objetivo atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular através da ação sinérgica das drogas. Essa estratégia terapêutica promove uma maior resposta por dose administrada, ao mesmo tempo que ameniza os efeitos colaterais das drogas e diminui o desenvolvimento de resistência (INCA, 2015).

O tratamento de crianças e de adolescentes com LLA leva em consideração o grupo ao qual estão inseridos. Aqueles pacientes com características que conferem um bom prognóstico, podem ser tratados com um regime terapêutico menos tóxico; enquanto que uma terapia mais agressiva é reservada para aqueles pacientes com doença de alto risco. Tais 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 (LEE; CHO, 2017). O tratamento bem-sucedido é geralmente composto de um regime que utiliza múltiplos fármacos divididos em 4 fases (indução, consolidação, manutenção e terapia dirigida ao sistema nervoso central (SNC)). A maioria dos protocolos de tratamento leva de dois a três anos para ser concluída, sendo dependente do grupo de risco do paciente e de características relativas à imunofenotipagem. Diversos fármacos citotóxicos são empregados no tratamento de LLA, sendo que os quimioterápicos mais utilizados são

metotrexato, vincristina, doxorubicina, daunorrubicina, L-asparaginase, 6-mercaptopurina, etoposídeo, citarabina e ciclofosfamida.

Os principais protocolos de tratamento de LLA, que utiliza esquemas com múltiplos fármacos antineoplásicos tem como consequência secundária a redução do desenvolvimento de resistência ao fármaco (SEIBEL et al., 2008). A intensidade e o tempo dos blocos de tratamento dependem do tipo de LLA (B ou T) e do grupo de risco. Como mencionado anteriormente, os grupos de risco são divididos em baixo, intermediário e alto; por sua vez o grupo baixo é dividido em dois subgrupos que são o Baixo Risco Verdadeiro (subgrupo BRV) e o Baixo Risco Intermediário (subgrupo BRI). Da mesma forma o grupo de alto risco é dividido em dois subgrupos que são os Alto Risco Responder Lento (subgrupo RL) e Alto Risco Responder Rápido (subgrupo RR) (BRANDALISE et al., 2014).

A terapia de indução é a fase inicial do tratamento. O principal objetivo da indução é obter uma remissão completa inicial, definida como a erradicação de todas as células leucêmicas detectáveis (menos de 5% de blastos) da medula óssea e do sangue periférico e a restauração da hematopoiese normal (>25% da celularidade e contagens normais de sangue periférico). A terapia de indução dada difere dependendo se a translocação t(9;22) está presente. Embora essa translocação seja incomum em pacientes pediátricos, os que apresentarem tal translocação se beneficiam com a adição de um inibidor de tirosina quinase (TK) que tem como alvo a oncoproteína Bcr-Abl (SCHULTZ et al., 2014).

A terapia de indução geralmente envolve a administração semanal de vincristina por três a quatro semanas, corticosteroides diários como prednisona ou dexametasona e asparaginase. Um quarto agente, como uma antraciclina (doxorubicina ou daunorrubicina) pode ser adicionado ao regime, particularmente em pacientes do grupo de alto risco. O término da terapia de indução corresponde ao momento D35. Neste período pode se verificar se o paciente reagiu ao tratamento, analisando a presença da doença residual mínima (DRM) e avaliação da medula óssea (MO) (PUI et al., 2015).

A falha da indução é definida pela persistência de blastos leucêmicos no sangue periférico, na medula óssea ou qualquer outro lugar extra medular após quatro a seis semanas de terapia de indução. Mais de 90% das crianças e adolescentes com LLA entram em remissão completa ao final da terapia de indução. Daqueles pacientes

que não alcançam a completa remissão até o final da indução, cerca de 50% demonstram uma falha da indução e o restante sucumbe ao tratamento indo a óbito. Para aqueles com falha da indução, em muitos casos, há necessidade um transplante alogênico de medula óssea, embora não exista um consenso sobre isto (SCHRAPPE et al., 2012).

A terapia de consolidação ou intensificação é a segunda fase do tratamento da LLA e é iniciada logo após a obtenção da remissão completa. O tratamento contínuo é necessário porque um pequeno número de linfoblastos leucêmicos permanece na medula óssea. Em virtude disso, há possibilidade de rápida recaída. O objetivo da terapia de consolidação é prevenir o crescimento leucêmico, reduzir a carga tumoral residual e prevenir o surgimento de resistência aos agentes nas células leucêmicas remanescentes (SEIBEL et al., 2008).

A segunda fase do tratamento leva em consideração a teoria de que durante a progressão da leucemia, as células leucêmicas passam por um processo chamado de evolução clonal, em que as células originadas do subclone dominante tornam-se a maioria (JAN; MAJETI, 2013). Durante a indução, um grande número de células descendentes desse subclone dominante é eliminado. No entanto, as células que iniciam a leucemia são frequentemente de uma população heterogênea no momento do diagnóstico, com pacientes individuais com múltiplos subclones genéticos com potencial para iniciar a leucemia (BARDINI et al., 2015).

Esses subclones estão presentes dentro de uma arquitetura clonal complexa no momento do diagnóstico, sendo muitas vezes consideradas células de iniciação de leucemia, que tem como características serem quimiorresistentes e indetectáveis, por ensaios de DRM (ANDERSON et al., 2011). Terapias de pós-indução tem como finalidade prevenir o surgimento de resistência a drogas, eliminando esses clones subdominantes (KARAWAJEW et al., 2015).

A terapia de consolidação geralmente dura de quatro a oito meses. Envolve na maioria das vezes, o uso de combinações diferentes de agentes com mecanismos de ação, que diferem daqueles utilizados durante a fase de indução. Com o objetivo de maximizar a sinergia e minimizar o desenvolvimento de resistência aos fármacos, a quimioterapia combina os agentes como citarabina, metotrexato, antraciclinas (daunorrubicina, doxorubicina), agentes alquilantes (ciclofosfamida, isofosfamida) e epipodofilotoxinas (etoposídeo) (HARRIS et al., 1998; LAUER et al., 2001).

Novamente, a intensificação dos regimes terapêuticos baseia-se classificação do grupo de risco do paciente. Isto permitiu uma redução da terapia para pacientes com bom prognóstico, ao mesmo tempo em que proporcionou um tratamento mais intenso para aqueles pacientes do grupo de alto risco (PUI et al., 2015).

Há uma terceira fase de terapia, chamada de intensificação tardia, que envolve a administração de um pulso de cinco a oito semanas de quimioterapia intensiva e combinada, semelhante a terapia de indução e consolidação. Esta fase tem melhorado a sobrevida de alguns pacientes do grupo de alto risco. Entretanto, estes regimes mais intensos trazem riscos e efeitos colaterais adicionais como o desenvolvimento de neoplasias secundárias (relacionado ao etoposídeo ou radiação) e infertilidade (associada a agentes alquilantes) (ROBISON, 2011).

A fase de manutenção é o último e mais longo estágio do tratamento da LLA infantil (de 30 a 42 meses), geralmente se constitui de um esquema menos intenso. Por ser um tratamento mais prolongado demonstra um risco baixo de recaída após a estabilização da remissão. A principal característica da terapia de manutenção é o uso de agentes antimetabólitos como metotrexato e mercaptopurina, além de vincristina e prednisona (BHATIA et al., 2012; BRACKETT et al., 2014).

Um quinto componente do tratamento de LLA em pacientes infanto-juvenis é a terapia direta do SNC, que incluem pacientes com manifestações clínicas no SNC, bem como a profilaxia de pacientes subclínicos. Os esquemas terapêuticos para erradicar a doença no SNC incluem administração intratecal de quimioterápicos como metotrexato, citarabina e corticoide, bem como a administração sistêmica com agentes que possuem capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e radiação intracraniana (MATLOUB et al., 2006).

O uso rotineiro da terapia preventiva do SNC é um grande avanço terapêutico no tratamento da LLA infantil. Esta modalidade de tratamento reduziu significativamente a indicação de radioterapia em crânio e neuroeixo, 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 (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002a).

Tabela 5. Quimioterápicos administrados no tratamento de Leucemia Linfóide Aguda.

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

Fonte: Adaptado de BRANDALISE et al., 2014.

Com a melhora dos resultados em 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 recaídas (STARÝ; HRUŠÁK, 2016). O transplante ainda é uma opção terapêutica de alto risco e significativa mortalidade, entretanto, o aumento do número de transplantes de medula óssea possíveis de serem realizados, com a melhor escolha de doadores, a possibilidade de novas técnicas como haploidêmico em casos selecionados, vem melhorando a sobrevida dos pacientes (MORANDO et al., 2010).

1.3.6 Perspectivas de tratamentos

Um princípio importante, não somente, no tratamento da LLA é a hipótese de Goldie-Coldman (GOLDIE, 1984), a partir do princípio de que as velocidades das mutações são constantes e que o risco de uma célula ser resistente, depende do número de células malignas presentes e do tempo que elas estão presentes. A falha no tratamento pode ser explicada em parte por mecanismos farmacocinéticos que reduzem o tempo ou os níveis de exposição dos blastos leucêmicos aos fármacos citotóxicos e, em parte, pela resistência celular a medicamentos (MILANI, 2014).

Novas intervenções, por exemplo, o uso dos inibidores da tirosina-quinase ou de anticorpos monoclonais com benefícios e riscos incompletamente definidos são primeiro introduzidos para os pacientes de maior risco e, somente mais tarde, para aqueles de baixo risco, após benefício comprovado (BLECKMANN; SCHRAPPE, 2016). O uso de tais inibidores da tirosina-quinase como o imatinibe e dasatinib nas LLAs com t(9;22), marca uma nova era no tratamento oncológico, mudando drasticamente o prognóstico para estes pacientes, inclusive desfazendo a necessidade de transplante alogênico de medula óssea em primeira linha (BLECKMANN; SCHRAPPE, 2016).

Novos agentes quimioterápicos em estudo e que vem demonstrando bons resultados em leucemias refratárias e/ou recaídas incluem: clofarabina, nelarabina e bortezomibe (SANTIAGO et al., 2017). Recentemente, a imunoterapia, a exemplo do blinatumomabe (anticorpo monoclonal bi-específico anti-CD3 e anti-CD19) e do rituximabe (anticorpo monoclonal anti-CD20), vem ganhando espaço na terapia das LLAs (STARÝ; HRUŠÁK, 2016). 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 (SANTIAGO et al., 2017).

Recentemente as CAR-T cells, células T com receptores quiméricos de antígenos, que já demonstrou eficácia em LLAs refratárias, vem ganhando um importante espaço como nova ferramenta terapêutica (BIONDI et al., 2017; SANTIAGO et al., 2017).

1.3.7 Doença residual mínima

Doença residual mínima (DRM) é o nome atribuído ao número muito baixo de células remanescentes no paciente durante ou após o tratamento antineoplásico; ou seja, durante o período de remissão. DRM é a principal razão para a recidiva em pacientes com leucemia e é detectado por métodos moleculares, estabelecidos como um padrão-ouro (BRÜGGEMANN; KOTROVA, 2017). A detecção da DRM tem vários papéis importantes; investigar a presença de células tumorais após a terapia,

determinação da eficácia do tratamento, monitorar o estado de remissão do paciente e prever a possibilidade de uma recaída (PUI et al., 2015).

Em um grande número de pacientes com leucemia, a DRM pode ser detectada por técnicas de microscopia quando em remissão completa. A DRM detectada nas fases iniciais do tratamento, independente de índices prognósticos clássicos como idade e contagem de leucócitos, imunofenotipagem e análise citogenética, entretanto são importantes para fornecer informações sobre o prognóstico (IRVING et al., 2009).

A DRM pode ser detectada por reação em cadeia da polimerase ou citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) (KARAWAJEW et al., 2015), e é de importância vital na maioria dos subtipos de leucemia. Existem dois métodos básicos para a detecção de DRM em crianças com LLA, a análise molecular de genes de receptores de células T e B e rearranjos e análise de CFM de fenótipos imunes aberrantes, sendo que ambos são preditivos para o desfecho da LLA (IRVING et al., 2009). Com ambos os métodos, é possível detectar uma única célula leucêmica em 10.000 ou mais células normais, aumentando assim a sensibilidade de um mínimo de 100 campos, quando comparados a microscopia óptica convencional (KARAWAJEW et al., 2015).

A Identificação de fatores de prognóstico é crítica na determinação da terapia para a subgrupos de pacientes e tem como objetivo atingir uma elevada taxa de cura, com uma toxicidade mínima. Outra meta importante de estratificação dos grupos de risco é definir pacientes com um alto risco de recaída, que podem se beneficiar do transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico, após a remissão completa (TEKGUNDUZ; DEMIR; AKPINAR, 2010). Atualmente os métodos de detecção da DRM em pacientes com LLA são: Imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica, já mencionada; RQ-PCR – baseada na detecção de transcritos de genes de fusão ou quebras cromossômicas, RQ-PCR: baseada na detecção de imunoglobulina clonal e rearranjo do gene do receptor de célula T (BRÜGGEMANN et al., 2010; BRÜGGEMANN; KOTROVA, 2017).

Tabela 6. Combinações Imunofenotípicas usadas no estudo de DRM na LLA.

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

Fonte: Adaptado de (BARAKA et al., 2017; BJÖRKLUND et al., 2003; WOHLFAHRT et al., 2015).

1.4 Receptores de Tipo Toll

Muito conhecimento tem sido produzido sobre Receptores de Tipo Toll, do inglês, *Toll-Like Receptors* (TLR) quanto a sua expressão gênica, a sua associação com fatores prognósticos e fatores de risco, a seus ligantes e sua ativação em algumas neoplasias malignas. Entretanto, pouco se sabe quanto ao seu papel em relação as leucemias pediátricas, principalmente LLA. Um dos primeiros estudos com leucemias mostrou que células B precursoras de leucemia linfóide aguda (CBP-LLA) expressam os TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 e TLR9, no entanto, não ficou claro se a expressão elevada observada dos TLR3, TLR4 e TLR5 ocorre como consequência da malignidade tumoral ou representa um fenótipo (CHIRON et al., 2008; IACOBUCCI et al., 2012).

Toll-like receptors (TLR), são receptores que pertencem a uma família de receptores evolutivamente conservados responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a organismos patogênicos, do inglês, *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), e de padrões moleculares associados ao dano, do inglês, *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) (KAWAI; AKIRA, 2011). Estes receptores foram descritos inicialmente em moscas das frutas - *Drosophila melanogaster* - e denominados Toll e associados a defesa contra patógenos. Posteriormente, foram descritos como receptores homólogos em mamíferos e designados de “Toll-like receptors” (GANESAN et al., 2011).

Atualmente, 13 membros de TLRs foram identificados em humanos e em ratos e todos eles apresentam pequenas diferenças nas cadeias de aminoácidos que compõem as proteínas que os formam. Por causa dessa diferença, cada TLR é capaz de reconhecer classes diferentes de moléculas biológicas presentes em diversos microrganismos, como por exemplo, LPS, lipoproteínas, flagelina, peptidoglicana, DNA e outras (KAWAI; AKIRA, 2010). Dessa forma, estes receptores tornam-se moléculas essenciais para o sistema imune inato, além de representar uma via pela qual ocorre a regulação do sistema imune adquirido (HARSINI et al., 2014).

Os TLRs são constituídos estruturalmente por um domínio extracelular rico em repetições do aminoácido leucina, um domínio transmembrana constituído por uma glicoproteína que possui uma cauda N-terminal com um sítio de ligação da molécula

ligante reconhecida e um domínio intracelular homólogo ao domínio, do inglês, Toll/Interleukin-1 receptor (TIR), com a porção da cauda C-terminal com sítios responsáveis pelas cascatas de sinalização celular recrutamento de moléculas adaptadoras específicas que também possuem um domínio do tipo TIR (MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011).

As moléculas adaptadoras inicialmente recrutadas, essenciais à transdução de sinal pelos TLRs, são as proteínas MyD88, Mal (Tirap), TRIF (Ticam) e TRAM (CHANG, 2010). Os membros da família de TLRs são expressos diferencialmente em uma grande variedade celular e tecidual, incluindo tanto células do sistema imune inato (como monócitos e células dendríticas), quanto linfócitos do sistema imune adaptativo, além de outras células não constituintes do sistema imune como queratinócitos e células endoteliais (CHANG, 2010; HOPKINS; SRISKANDAN, 2005).

Quanto a sua distribuição, sabe-se que existem 11 tipos de TLRs expressos em humanos localizados na superfície da membrana celular ou em endossomos. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são expressos na superfície da membrana celular, enquanto que as formas TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão presentes no interior de endossomos (LI; JIANG; TAPPING, 2010).

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

Uma via é dependente do fator 88 de diferenciação mieloide, do inglês, *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), e outra que, por sua vez, é independente do MyD88. Todos os TLRs ativam a cascata de sinalização celular via MyD88, com exceção do TLR3 (HARSINI et al., 2014). Após a ativação do TLR pelo seu respectivo ligante, ocorre o recrutamento do MyD88, o que leva a uma subsequente ativação de fatores *downstream* incluindo NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), interferon (IFN) e outros fatores regulatórios tais como fatores de transcrição (KIM et al., 2018) (figura 2).

Após o reconhecimento dos ligantes pelo TLR2 e pelo TLR4, respectivamente, ocorre uma dimerização formando complexos. Essa configuração é então alterada e moléculas adaptadoras específicas são recrutadas, incluindo MyD88, TRIF, TRAM e Tirap/Mal, inicializando a cascata de sinalização intracelular. Este processo resulta no recrutamento de outras proteínas adaptadoras tais como IRAK, TRAF3 e TRAF6, juntamente com a indução de fosforilação de IKBKE e a formação de complexos IKK constituído de TBK1/TRAF3/IKK ϵ , NEMO/IKBKE levam a ativação de fatores de transcrição de genes envolvido na inflamação, regulação da resposta imune, sobrevivência, proliferação celular e tumorigênese (ROLF et al., 2015). A partir de diversos estudos, foi visto que sem a presença de TLRs funcionais, a fagocitose não conduz a ativação da resposta imune (KAWAI; AKIRA, 2011; KIM; SHIN; NAHM, 2016).

Nesse trabalho, dissertaremos sobre os TLR2, TLR3 e TLR4, em relação a sua estrutura, principais ligantes e particularidades (tabela 7).

Tabela 7. Toll-Like Receptors, principais ligantes, proteínas adaptadoras e resposta.

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

Fonte: Adaptado de (AKIRA; TAKEDA, 2004).

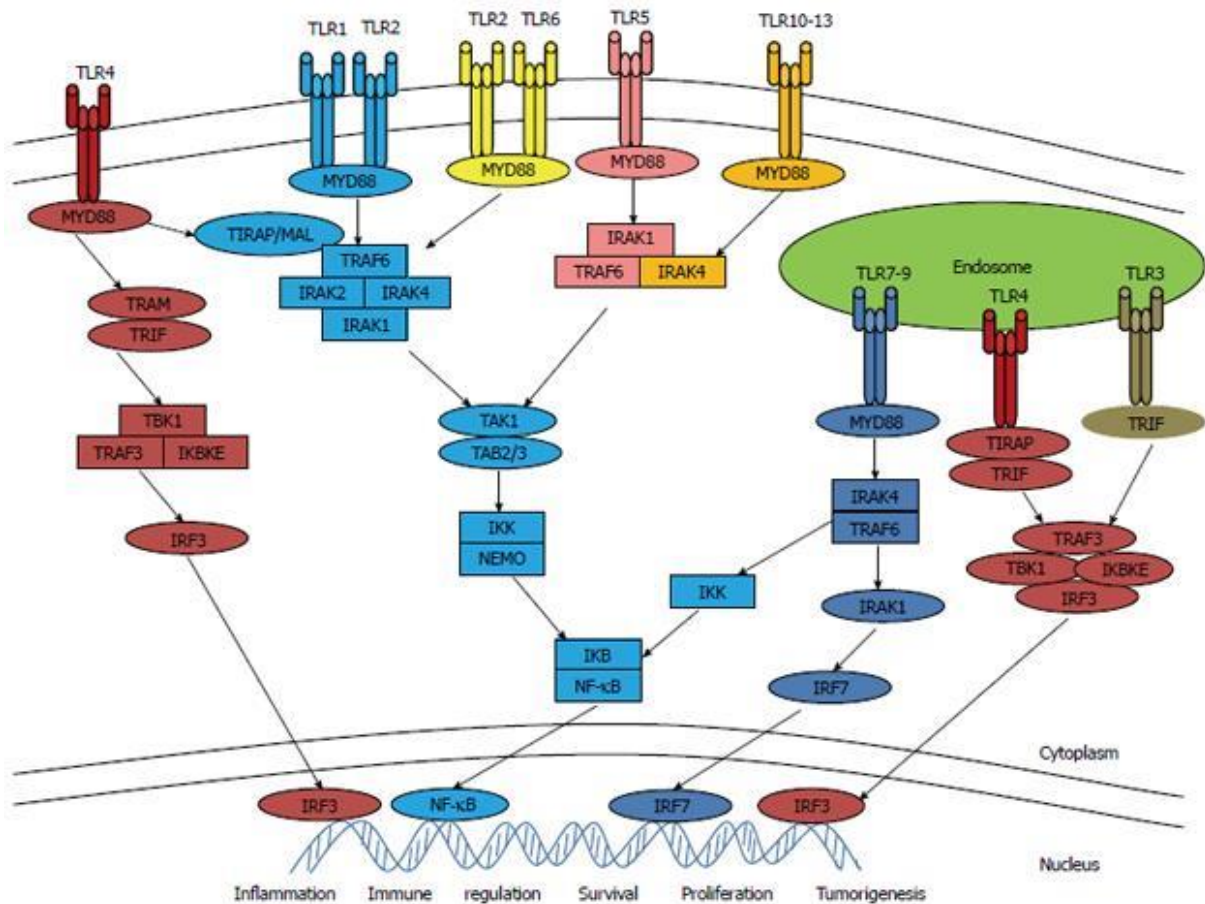


Figura 2. Demonstração das vias de sinalização, juntamente com a cascata intracelular ativada pelo TLRs, com o recrutamento das moléculas adaptadoras e seus principais efeitos.

Fonte: Li, et al. 2014.

1.4.1 TLR2

O TLR2 é considerado o principal mediador na ativação de macrófagos em resposta ao bacilo de Koch - *Mycobacterium tuberculosis* (GOPALAKRISHNAN; SALGAME, 2016). TLR2 forma um heterodímero em forma de m com TLR1 ou TLR6 para reconhecer uma gama de PAMPs, tais como ligantes lipopeptídeos diacilados patogênicos derivados de bactérias Gram-negativas, mycoplasma, fungos, parasitas

e vírus) (MUKHERJEE; KARMAKAR; BABU, 2016). O TLR2 atua em conjunto com o co-receptor CD36, na detecção de alguns, mas não de todos seus agonistas, o que induz a sua internalização, a qual é necessária para ativação do NF- κ B e transdução do sinal (BRANDT et al., 2013). Em resposta ao bacilo de Koch, o TLR2 é ativado por uma lipoproteína de 19 kDa que leva à produção de citocinas inflamatórias, principalmente TNF- α e IFN- γ (VAN BERGENHENEGOUWEN et al., 2013).

Um polimorfismo encontrado no gene do TLR2 pode levar a uma redução da ativação dos macrófagos contra peptídeos bacterianos, resultando em uma atenuada resposta imune contra o hospedeiro (ZHAO et al., 2015). Muitos SNPs já foram identificados no gene de TLR2, embora a maioria não cause alterações sobre a função das células, alguns SNPs podem levar tanto a ganho de função, levando a uma resposta aguda ou que levam ao portador ter uma maior suscetibilidade a infecções (FRAZÃO; ERRANTE; CONDINO-NETO, 2013).

1.4.2 TLR3

O TLR3 é o único receptor da família dos TLRs que quando acionado pelo seu ligante não ativa uma cascata de sinalização celular via MyD88 e sim pela molécula auxiliadora TRIF, também conhecida como, TICAM-1 (PARK et al., 2015). A partir desse acoplamento, há o recrutamento de moléculas como TRAF3 (*TNF receptor-associated factor 3*), TBK1 (*TANK-binding kinase 1*), IKK ϵ (*inhibitor of kappa-B kinase epsilon*), TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) e TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), o que leva à fosforilação de fatores de transcrição, sendo IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) e NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) os principais (KAWAI; AKIRA, 2011; VERCAMMEN; STAAL; BEYAERT, 2008) (figura3).

Ao contrário do que acontece aos outros TLR, a fosforilação de Tyr759 e Tyr858 no domínio citoplasmático do TLR3 é necessária para ativar a cascata de sinalização (SARKAR et al., 2006). As principais estruturas ligantes de TLR3 são RNAs virais de fita única (ssRNA) e fita dupla (IRF-3). Mais recentemente, foi visto que o TLR3 pode ser ativado por ligantes endógenos derivados de células necróticas (MATIJEVIC GLAVAN et al., 2017). As informações sobre o TLR3 são escassas em comparação

ao que se conhece sobre outros TLRs, entretanto sabe-se que muitos SNPs no gene do TLR3 podem levar ao aumento da suscetibilidade a câncer, doenças autoimunes e infecções. Em virtude disso, esses SNPs tem um grande potencial para se tornar biomarcadores para avaliação do risco para essas doenças (GENG et al., 2016).

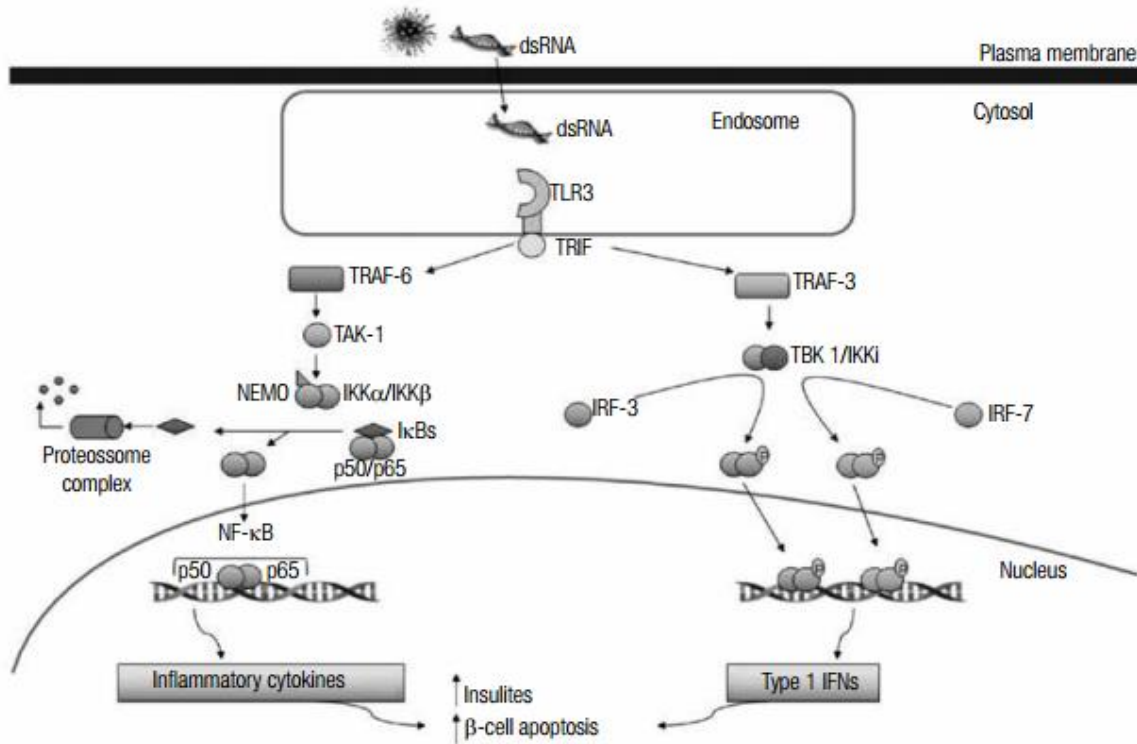


Figura 3. Sinalização do TLR3. A ligação do ligante de TLR3 (dsRNA) com o posterior recrutamento de moléculas adaptadoras que levam a ativação de fatores de transcrição que intensificam a codificação de citocinas pró-inflamatórias.

Fonte: Adaptado de Kumar, 2009.

1.4.3 TLR4

O TLR4 é um receptor de superfície celular, principalmente expresso em células mieloides, mas também em mastócitos, células endoteliais, células NK e linfócitos, células epiteliais, queratinócitos, fibroblastos e inclusive em células tumorais (CHANG, 2010). Seu principal ligante é o LPS de bactérias Gram-negativas e o ácido lipoteicoico (LTA). Ambos LPS e LTA ligam-se primeiramente no receptor de CD14 que em seguida os transfere para o TLR4. Após essa ligação corre uma homo-

dimerização do TLR4 com outros TLRs formando um complexo no qual é adicionado a proteína co-receptora MD-2 que será transportado para a superfície celular (COCHET; PERI, 2017; MUKHERJEE; KARMAKAR; BABU, 2016; PARK et al., 2009).

A transdução do sinal do TLR4 pode levar ao recrutamento das quatro moléculas adaptadoras envolvidas no processo de sinalização: a MyD88, TRIF, TIRAP e TRAM (GANGLOFF, 2012; SRIVASTAVA et al., 2017). O efeito global dessa transdução é indução da expressão de uma série de genes envolvidos na resposta inflamatória, como quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, moléculas antimicrobianas e moléculas coestimulatórias da resposta imune adaptativa (MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011).

O domínio transmembrana do TLR4 tem um papel importante e crítico no processo de oligomerização funcional que constitui uma mutação sem sentido. Tal mutação pode alterar a resposta do TLR4 ao LPS. Embora o reconhecimento de patógenos ou de outros agentes inflamatórios pelas células da imunidade inata seja essencialmente importante no controle ou no curso da doença, a resposta inflamatória desencadeada precisa ser controlada a fim de se evitar danos teciduais extensivos e a manifestação de estados patológicos (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009; FUKATA et al., 2011; JIN et al., 2016; KUZMICH et al., 2017).

1.4.4 TLRs e o câncer

As vias que levam a indução das respostas imune e inflamatória já foram parcialmente caracterizadas, no entanto ainda não está claro o seu papel em algumas doenças, tanto em doenças inflamatórias, doenças autoimunes e em neoplasias malignas. Porém, sabemos que existe uma importante relação de equilíbrio entre a presença de TLRs e sua ativação por patógenos, isto é, uma espécie de homeostase imune, a exemplo do que acontece com o TLR4 no epitélio intestinal, onde há um balanço entre a tolerância e a resposta imune (YU et al., 2014). Por outro lado, evidências sugerem que o funcionamento inadequado de sinalizações dos TLRs contribui significativamente para o desenvolvimento de doenças autoimunes, tuberculose, pancreatite aguda grave, enterocolite necrosante, aterosclerose, doença

hepática alcoólica e hepatites não alcoólicas (MAJUMDAR et al., 2015; MANNI et al., 2015). A exemplo do que foi descrito agora, polimorfismos que afetam a expressão de TLR2 e TLR4 estão bastante relacionados com aumento do risco de câncer gástrico (PAARNIO et al., 2017).

É interessante ressaltar também que outras vias levam a inflamações crônicas e agudas associadas a processos de carcinogênese. O que é comum entre essas vias com a via dos TLRs é a presença de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL1 β e IL-11 entre outras moléculas como NF- κ B. Tais citocinas estão super-expressas e promovem tumorigênese através da modulação/programação dos “status” de indiferenciação, pelo recrutamento de células supressoras mieloides e aumento da sobrevivência de células tumorais (WANG et al., 2016). Dessa forma, a sinalização dos TLRs parece modular a transformação do tecido ou de células que sofreram por um processo de inflamação crônica e/ou agudo em lesões pré-malignas (ZHANG et al., 2014). Além disso, o desenvolvimento do câncer tem sido associado a um processo de malignidade celular que apresenta baixos níveis de moléculas imunogênicas; e, dessa forma, pouca estimulação de moléculas precursoras de células T que facilitam sua evasão da resposta imune antineoplásica (BARROS et al., 2018; FÚRI et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Um estudo com câncer colorretal (CCR), neoplasia que está fortemente associada a infecções bacterianas e à indução de uma resposta inflamatória crônica, demonstrou uma expressão gênica elevada de TLR1, TLR2, TLR4, TLR8 em células tumorais provenientes de pacientes com CCR, em relação a células normais dos mesmos pacientes (DING; LI; LU, 2013). Entretanto a expressão gênica de MyD88, IFN- α , IL-6 e IL-8 das células tumorais não mostrou aumento significativo em relação às células normais.

Outro estudo recente com CCR corroborou a ideia da relação do desenvolvimento e progressão tumoral com processos inflamatórios, isto é, os mecanismos da patogênese incluem alterações na microbiota intestinal, ativação de oncogenes induzida por resposta imune, bem como, o microambiente, fortemente associado a progressão tumoral. Neste estudo foi observado que pacientes com CCR apresentavam um perfil de expressão de TLR2 e TLR4 diferente do grupo controle, uma vez que a expressão de TLR2 era maior e de TLR4 era menor do que no grupo controle. Os pesquisadores consideraram que apesar dos TLRs ativarem o mesmo tipo de cascata de sinalização, a “*up-regulation*” de TLR2 e a “*downregulation*” de

TLR4, durante a progressão, desde a mucosa normal até ao tecido carcinogênico, indicam a ocorrência de um conjunto distinto de alterações na resposta imune inata durante o desenvolvimento do CCR. Este estudo mostrou que a baixa expressão de TLR4 no epitélio colorretal foi associada ao desenvolvimento de metástases à distância e pior sobrevida em 5 anos. Além disso, com a progressão da doença a estágios mais avançados, a expressão de TLR4 aumentou. Por outro lado, níveis de TLR2 não foram associadas com diferenças de estágio ou de prognóstico (PAARNIO et al., 2017).

Uma das principais vias ativadas pelos TLRs, a via MyD88 dependente está fortemente associada ao desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias, tais como câncer colorretal, gástrico, câncer hepático, câncer de pele e sarcomas, bem como promotor de metástases (CHEN et al., 2015; CUI et al., 2014; DING; LI; LU, 2013; ECHIZEN et al., 2016; GRONDONA et al., 2018; MAEDA et al., 2016; MONLISH; BHATT; SCHUETTPELZ, 2016). Reforçando isso, dois estudos mostraram que a ativação do TLR por PAMPs, via MYD88, está relacionada à gravidade da colite crônica, que por sua vez mostrou-se diretamente correlacionada com o desenvolvimento de câncer colorretal e com a progressão de adenoma para carcinoma invasivo (LI; OGINO; QIAN, 2014). Outras moléculas adaptadoras e proteínas consideradas, como fatores de transcrição de genes relacionado à inflamação, as quais são recrutadas para a ativação da resposta *downstream* iniciada pelos TLRs também estão associadas ao desenvolvimento tumoral (KAWAI et al., 2004).

Além de associação da expressão de TLRs, de moléculas adaptadoras que participam da cascata de sinalização celular, muitos ensaios clínicos têm mostrado a relação da super-expressão de diversos tipos de TLRs a um pior diagnóstico em diferentes neoplasias (LI; OGINO; QIAN, 2014). Em câncer de pâncreas, a ativação de TLRs parece promover mecanismos que favorecem a invasão tecidual por células tumorais, produzindo metástases, o que está intimamente relacionado a um pior desfecho (GRIMMIG et al., 2016). Além disso, sabemos que existem alterações genéticas, como variações de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes de TLRs que podem influenciar tanto a incidência quanto a severidade e desfecho de alguns tipos de câncer como linfoma, leucemia linfóide crônica (LLC), mieloma (NTOUFA et al., 2016).

Em um estudo com adultos diagnosticados com leucemia mieloide aguda (LMA), a expressão de TLR2 e TLR4 foi maior em relação a indivíduos saudáveis, embora não existiu diferenças significantes estatisticamente. A expressão de mRNA de TLR2 e TLR4 foi significativamente elevada em pacientes que não obtiveram uma resposta completa ao término da terapia de indução em relação aos pacientes que tiveram uma resposta completa. Além disso, foi observado que a expressão destes receptores foi significativamente mais alta em pacientes com LMA mielomonocítica e monoblástica do que outros tipos de LMA. O mesmo estudo mostrou que aqueles pacientes com alta expressão de TLR2 e TLR4 tiveram uma taxa de sobrevivência menor do que os pacientes com baixa expressão destes receptores (RYBKA et al., 2015).

Outro estudo, em pacientes adultos com leucemia linfóide crônica de células B (LLC-B), mostrou diferenças na expressão do TLR2 e TLR4 em relação a indivíduos saudáveis do grupo controle (GC) (RYBKA et al., 2016). Tais pacientes apresentaram alta expressão de TLR2 e baixa expressão de TLR4, por outro lado o GC, baixa expressão de TLR2 e alta de TLR4. Além disso, houve um aumento na amplitude das diferenças de expressão em pacientes com estágios mais avançados da doença. Este estudo avaliou a expressão de TLRs e sua possível relação com algumas características clínicas dos pacientes. Foi encontrada correlação positiva entre expressão de TLR2 e células brancas, TLR2 e lactato desidrogenase (LDH) e TLR2 e microglobulina Beta-2, TLR2 e anemia, uma vez que a expressão de TLR2 em pacientes com anemia foi significativamente mais alta do que em pacientes sem anemia; por outro lado, uma correlação negativa entre TLR2 e níveis de hemoglobina (Hb). Barcellini e colegas, mostraram uma possível associação do aumento da expressão de TLR4 em pacientes com LLC-B com a progressão da doença e com uma incidência maior de complicações autoimunes (BARCELLINI et al., 2014).

O primeiro estudo com LLA infantil, demonstrou diferenças de expressão de TLR1, TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9 entre pacientes e grupo controle. A expressão destes receptores nos pacientes foi extremamente menor do que no grupo controle. Quando eles analisaram os níveis de expressão dos TLRs com diferentes subtipos de LLA (Pró-B, Pré-B, B e T) eles encontraram valores extremamente baixos do TLR1 para os subtipos pré-B e T e do TLR4 para os subtipos Pró-B e B. Tais valores foram considerados extremamente baixos quando comparados com o grupo controle (SÁNCHEZ-CUAXOSPA et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da grande evolução na terapêutica, ainda é preciso melhorar os protocolos, ou desenvolver tratamentos personalizados para alguns tipos de pacientes, aqueles incluídos nos subgrupos 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, é imprescindível reduzir as toxicidades do tratamento, pois aqueles pacientes que chegam à remissão completa, muitos deles ficam com sequelas permanentes após o tratamento.

Apesar da diferença de expressão dos TLRs entre pacientes e indivíduos saudáveis estar descrita em diversos estudos, a análise da contribuição dos TLRs para o desenvolvimento das neoplasias hematológicas em pacientes pediátricos se torna importante, bem como se as diferenças na sua expressão afetam o curso clínico da doença e, assim como, aspectos relacionados ao tratamento farmacológico ou até mesmo imunoterápico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de TLR2, TLR3 e TLR4 em leucemias agudas pediátricas e o papel de seus agonistas específicos sobre a proliferação e viabilidade celular bem como possíveis mecanismos de sinalização celular que atuam nesses processos em linhagens celulares.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de mRNA de TLR2, TLR3 e TLR4 nas amostras de medula óssea dos pacientes com LLA ao diagnóstico (D0) e no término da terapia de indução (D35), através da técnica de RT-PCR;
- Avaliar a expressão de mRNA de TLR2, TLR3 e TLR4 nas linhagens celulares de LLA Jurkat e Sup-B15, através da técnica de RT-PCR;
- Avaliar os efeitos celulares do tratamento com agonistas de TLRs (PGN, LPS, Poly IC) durante 48 horas sobre a viabilidade e proliferação Jurkat e Sup-B15, pelo método de contagem com exclusão por Tripán Blue;
- Avaliar os efeitos celulares e moleculares do tratamento com agonistas de TLRs (PGN, LPS, Poly IC) durante 24 horas sobre a viabilidade e proliferação celular de linhagens celulares de leucemia linfóide aguda; pela análise do ciclo celular em citometria de fluxo;
- Correlacionar os resultados obtidos sobre a expressão de TLR2, TLR3 e TLR4 com desfecho e dados clínicos dos pacientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Neste estudo foram incluídos 26 pacientes pediátricos (de zero a 18 anos de idade) diagnosticados com LLA no Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente e/ou seu responsável.

Foram coletados 4 mL de medula óssea e/ou sangue periférico em tubos a vácuo com EDTA dos pacientes apenas quando solicitado para avaliação clínica, minimizando riscos e desconfortos. Estas avaliações aconteceram nos momentos do diagnóstico (antes do início do tratamento, dia zero; D0) e ao final do tratamento de indução, no dia 35 (D35). Idealmente, todos os pacientes deveriam coletar amostra em ambos os momentos, entretanto este fator não foi considerado um critério de exclusão, sendo classificado eletivo qualquer paciente diagnosticado com LLA, independente do momento que foi incluído no estudo, completando os grupos D0 ou D35. Este projeto foi aprovado no CEP-HCPA, CAAE nº: 46929015.7.0000.5327, GPPG-HCPA nº 15-0318.

4.2 Extração de RNA

As extrações de RNA total das amostras de medula óssea e sangue periférico foram realizadas através do kit PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies#12183018A) e a extração de RNA total das linhagens celulares ocorreu pelo método Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), ambos os métodos de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas em Nanodrop® de acordo com aspectos de quantidade e pureza.

4.3 Reação da Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

Foram otimizadas as condições de RT-PCR semiquantitativo para determinar o número de ciclos que permitem a detecção do produto dentro da fase linear da amplificação do transcrito de mRNA. O RNA mensageiro (mRNA) foi amplificado usando os primers de β -actina, TLR2, TLR3 e TLR4 (todas as sequências foram desenhadas de acordo com Gen Bank, ver (tabela 1). A expressão de β -actina foi utilizada como um controle interno.

Tabela 1. Sequência de primers.

Gene	Gene sequence
β-actin	
ForwardSequence	AAACTGGAACGGTGAAGGTG
Reverse Sequence	AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT
TLR2	
ForwardSequence	ATTGTGCCCATTTGCTCTT
Reverse Sequence	CTGCCCTTGCAGATACCATT
TLR3	
ForwardSequence	AGCCTTCAAGCACTGATGCT
Reverse Sequence	TTCCAGAGCCGTGCTAAGTT
TLR4	
ForwardSequence	TGAGCAGTCGTGCTGGTATCC
Reverse Sequence	CAGGGCTTTTCTGACTCGTC

Todas as amostras foram constituídas de um volume total final de 15 μ L usando 35 ciclos para amplificação que consistiram em 1 minuto a 95°C, desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, e extensão dos primers a 72°C por 45 segundos, seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da reação de PCR foram aplicados no gel de agarose 1 % (contendo GelRedTM 10X [Biotium, USA]), seguindo da técnica de eletroforese e visualizado em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi confirmado usando Low DNA Mass Ladder

(Invitrogen) e a expressão relativa de cada primer foi determinada por densitometria usando o software ImageJ 1.45 para Windows®.

4.4 Compostos Químicos

A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas utilizando os seguintes compostos: peptidoglicano (PGN; agonista de TLR2; Sigma#77140), ácido poliinosínico (Poly IC; agonista de TLR3; Sigma #P9583) e lipolissacarídeo (LPS; agonista de TLR4; Sigma#L6529). As concentrações foram determinadas com base em dados da literatura (WANG et al., 2012; ZHANG; LIN; HAN, 2010; LEHNER et al., 2007): PGN, LPS e Poly IC (1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL) durante 48 horas.

4.5 Cultivo Celular e Avaliação de Viabilidade e Proliferação Celular

As linhagens celulares de LLA, Jurkat e Sup-B15, foram obtidas do American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, Maryland, EUA). As células foram cultivadas em frascos estéreis de 25 cm² em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), suplementado com soro fetal bovino, antibiótico e antifúngico. As células foram mantidas em incubadora à temperatura de 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados em, no mínimo, triplicata, em três experimentos independentes.

A viabilidade e proliferação celular foram realizadas pelo método de contagem com exclusão por azul de Tripán, conforme descrito por Freshney e colaboradores (1994). Brevemente, uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi homogenizada a uma alíquota de 10 µL de azul de Tripán 0,4 % e a contagem celular foi realizada em um hemocítmetro. As células mortas ou com danos na membrana celular são permeáveis ao corante. A viabilidade celular é a razão entre as células coradas (inviáveis) e não coradas (viáveis).

4.6 Ciclo celular

Para avaliar o ciclo celular, a linhagem celular Jurkat foi cultivada em placas de 24 poços, em uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células/poço e tratadas com PGN, POLY:IC e LPS nas concentrações de 100 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente, e comparadas ao controle sem tratamento. Após 24 horas, as células foram coletadas, centrifugadas e lavadas com PBS duas vezes. Depois, as células foram ressuspensas em 50 µg/mL de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em 0,1 % de Triton X-100 em 0,1 % de citrato de sódio contendo 5 µg/mL de RNase A. As células foram coradas com 1 mL da solução do ciclo celular iodeto de propídeo (IP) durante 5 minutos, seguido de avaliação no citômetro de fluxo Attune Acoustic (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, EUA). Em cada amostra, 20 mil células foram analisadas. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo Cytometric versão 10.1. Três experimentos individuais foram realizados em triplicata.

4.7 Análise Estatística

Baseado na estimativa de casos novos diagnosticados no HCPA, considerando-se um intervalo de confiança de 95% e um erro beta de 80%, a amostra constituiu-se de 26 pacientes. Os experimentos com amostras de pacientes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e as comparações entre os grupos realizadas comparando as médias pelo teste T de Wilcoxon. Os experimentos com linhagens celulares foram realizados de forma separadas e independentes (n=3). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e comparações foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida por teste post-hoc de Tukey's. A sobrevida global, *overall survival* (OS) foi determinada pelo método de Kaplan-Meier. O teste de *long rank* foi usado para comparar as curvas. Valor de $p < 0.05$ indica diferença significativa. Os gráficos foram realizados usando o GraphPad versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos com este trabalho serão organizados para submissão à revista *Leukemia Research*.

5.1 Viabilidade e proliferação celular das linhagens celulares tratadas com agonistas de TLRs

Houve uma diminuição na viabilidade celular de Jurkat após o tratamento com os três agonistas de TLR2, TLR3 e TLR4, respectivamente (PGN, POLY:IC e LPS) na concentração de 100 µg/mL (todos com $p \leq 0.0001$) em relação às células do controle. Os tratamentos com PGN e LPS reduziram a viabilidade celular em mais de 75 %, já o agonista POLY:IC reduziu a viabilidade em aproximadamente 50 % (Figura 1 a, b e c). Nas demais concentrações testadas (1 µg/mL e 10 µg/mL), não houve diferença significativa em relação ao controle.

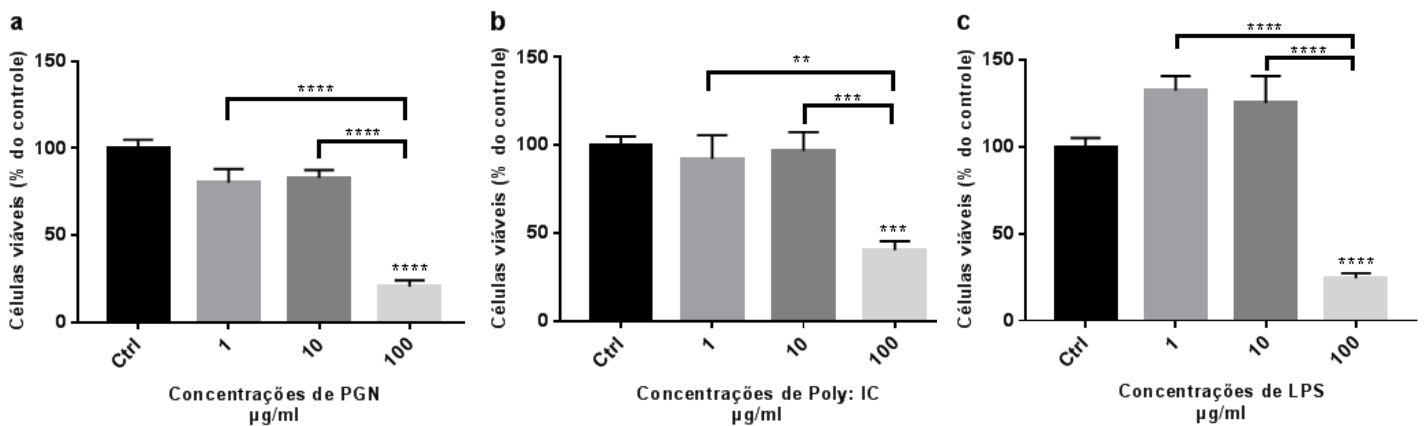


Figura 1. Viabilidade celular das células Jurkat após 48h de tratamento com agonistas de TLRs. O tratamento com agonistas de TLR2, TLR3 e TLR4 reduziram a viabilidade celular da Jurkat. (a) tratamento com PGN. (b) tratamento com Poly:IC. (c) tratamento com LPS. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e comparações realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida por teste post-hoc de Tukey's. ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$.

Na linhagem celular Sup-B15, após as 48 horas de tratamento com PGN, foi observada uma redução na viabilidade celular em relação ao controle a partir da

concentração de 10 µg/mL (P=0,0039). Na concentração de 100 µg/mL houve uma redução de cerca de 50 % na viabilidade celular (P<0.0001; figura 2 a).

Nos tratamentos com POLY:IC e LPS, após 48 horas, foi observado na linhagem celular de Sup-B15 uma redução da viabilidade celular em relação ao controle, na concentração de 1 µg/ml, (P=0.0029) e (P=0,0002). Figura 2 (b e c).

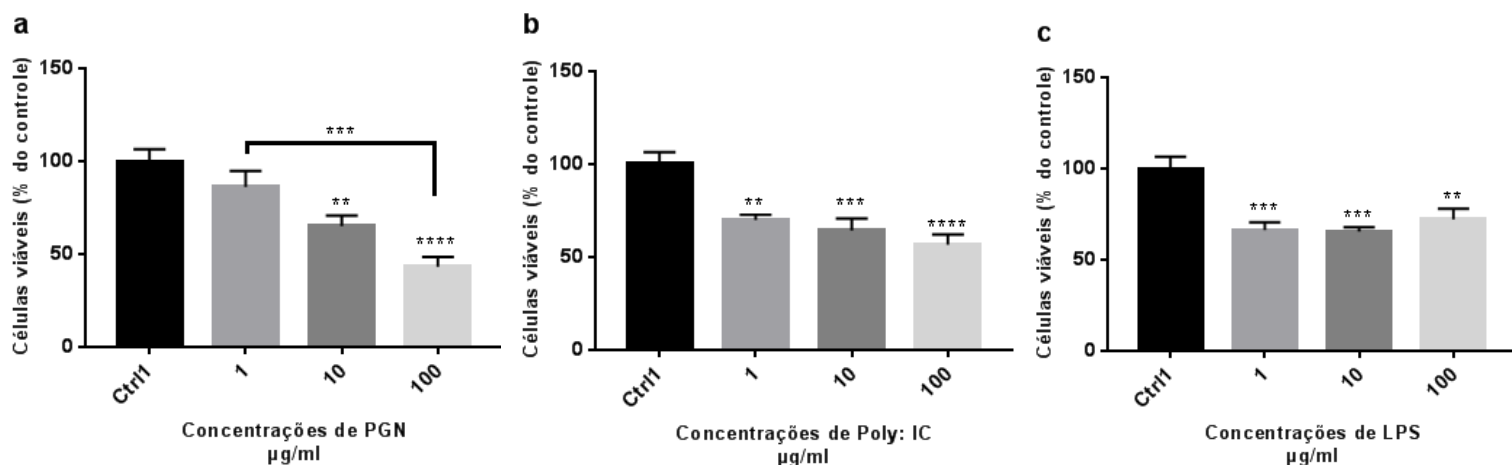


Figura 2. Viabilidade celular das células Sup-B15 após 48h de tratamento com agonistas de TLRs. (a) tratamento com PGN. (b) tratamento com Poly:IC. (c) tratamento com LPS. Dados foram expressos como média ± erro padrão da média e comparações realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida por teste post-hoc de Tukey's. **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001.

5.2 Ciclo celular

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo mostrou que após 24 horas de tratamento com os agonistas específicos de TLR2, 3 e 4 (PGN, POLY:IC e LPS), as células Jurkat apresentaram um aumento da fase Sub-G1 do ciclo celular (P=0.0013, P=0.0412 e P=0.0026) e redução da poliploidia (P=0.0021, P=0.012 e P=0.0015). Além disso houve um aumento na fase G2 após o tratamento com PGN e POLY:IC (P<0.0001 e P=0.037), redução na fase S após o tratamento com LPS (P=0.0016). A fase G0-G1 reduziu após o tratamento com PGN (P=0.00119) e aumentou após o tratamento com LPS (P=0.0078).

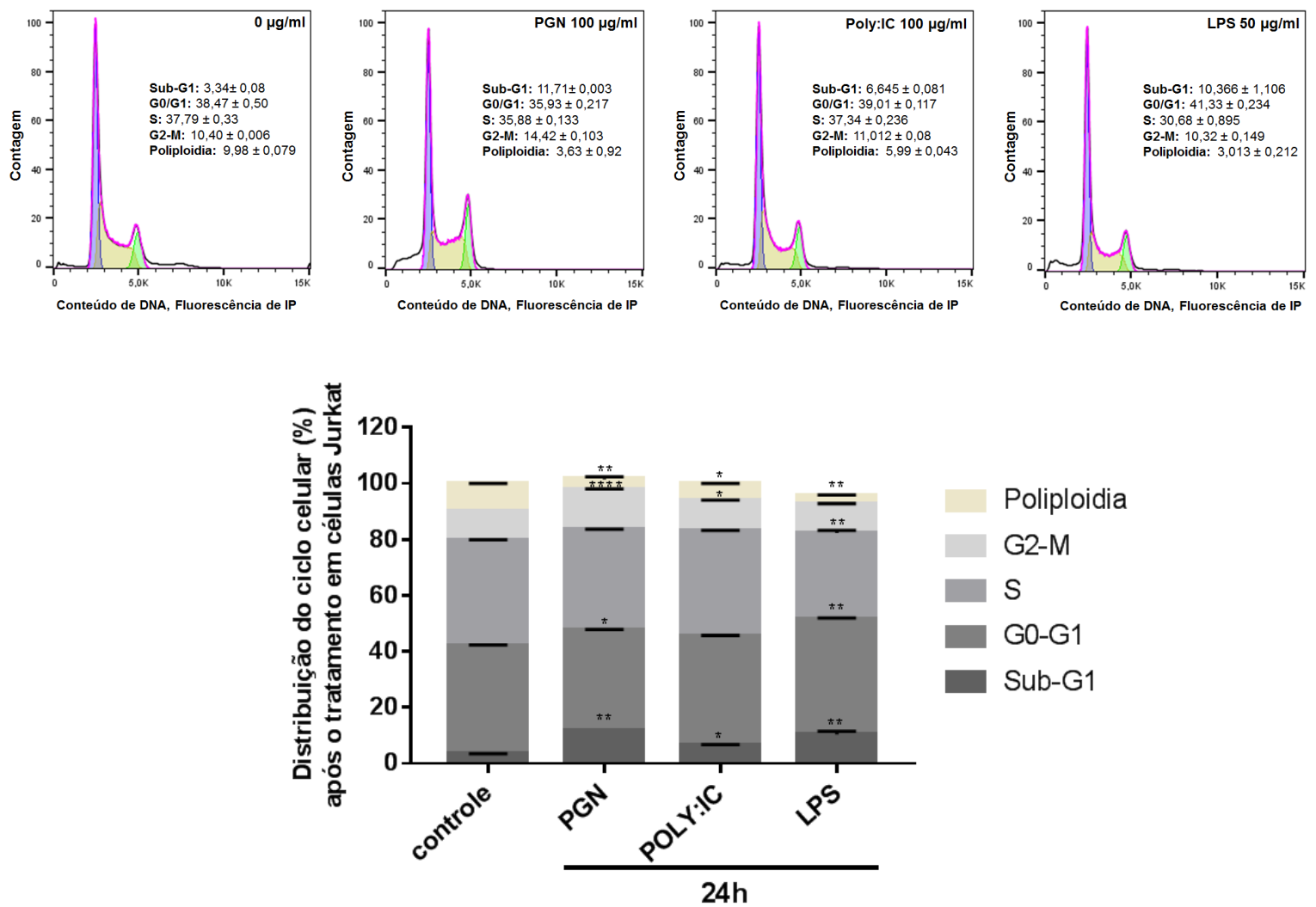


Figura 3. Alterações no ciclo celular induzidas pelo tratamento em células Jurkat. Uma distribuição do ciclo celular das células Jurkat após 24 h. N = 3. Experimentos independentes. O tratamento com os três agonistas aumentou a fase Sub-G1 do ciclo celular e reduziu a poliploidia. Além disso houve um aumento significativo na fase G2 após o tratamento com PGN e na fase S após o tratamento com LPS. Dados foram expressos como média ± erro padrão da média e comparações realizadas por análise de variância de uma via (ANOVA de uma via), seguida por teste post-hoc de Bonferroni. *p=0.0119, *p=0.012, *p=0.037, *p=0,0412, **p=0.0013, **p=0.0015, **p=0.0016, **p=0.0021, **p=0.0026, **p=0.0078, ****p<0.0001.

5.3 Pacientes

Vinte e seis pacientes com LLA foram recrutados, distribuídos em grupos e/ou em blocos de tratamento em relação à classificação de risco da doença, de acordo com critérios médicos e características do paciente conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2. Dados demográficos dos pacientes.

		Dados demográficos dos pacientes com LLA			
		Linhagem B (n=21)	Linhagem T (n=5)	Total (n=26)	
Gênero	Masculino	13 62%	4 80%	17 65%	
	Feminino	8 38%	1 20%	9 35%	
Etnia	Branca	20 95%	4 80%	24 92%	
	Negra	1 5%	0 0%	1 4%	
	Parda	0 0%	1 20%	1 4%	
Idade ao DO	≥ 1 e < 10 anos	17 81%	2 40%	19 73%	
	< 1 e ≥10 anos	4 19%	3 60%	7 27%	
Recidivas	0	15 71%	3 60%	18 69%	
	1	4 19%	1 20%	5 19%	
	2	2 10%	0 0%	2 8%	
	3	0 0%	1 20%	1 4%	
Risco	Baixo risco	3 14%	1 20%	4 15%	
	Intermediário	6 29%	0 0%	6 23%	
	Alto risco	12 57%	4 80%	16 62%	
Antígeno Calla	Sim	12 57%	0 0%	12 46%	
	Não	9 43%	5 100%	14 54%	
Citogenética	Bom prognóstico	9 43%	4 80%	13 50%	
	Pior prognóstico	12 57%	1 20%	13 50%	
Protocolo de Tratamento	GBTLI 2009 baixo risco intermediário	7 33%	1 20%	8 31%	
	GBTLI 2009 alto risco	7 33%	2 40%	9 35%	
	BFM 2002	4 19%	0 0%	4 15%	
	St.Judes	2 10%	2 40%	4 15%	
	HyperCVAD	1 5%	0 0%	1 4%	
	DRM no D35	Negativo	15 71%	3 60%	18 69%
		Positivo	6 29%	2 40%	8 31%
Óbito	Sim	7 33%	2 40%	9 35%	
	Não	14 67%	3 60%	17 65%	

Dentre os pacientes, 13 eram meninos e idade média dos pacientes foi de 6 ± 4 anos (variação de 11 meses a 14 anos). Dos 26 pacientes, 16 estão no grupo de alto risco, 6 estão do grupo intermediário e 4 no grupo de baixo risco. Além dessa classificação, separamos os pacientes de acordo com a linhagem celular (B ou T). Dentre os 26 pacientes, 21 são de linhagens de células B e 5 pacientes de linhagem células T, dos quais 4 estão no grupo de alto risco, padrão este verificado na literatura (MAINO et al., 2015).

5.4 Expressão gênica de TLR2, TLR3 e TLR4 em pacientes com LLA

A expressão de TLRs nas células provenientes da medula óssea foi analisada por PCR semiquantitativo nos dois momentos propostos, em D0, bem como em D35. Ao avaliar a expressão de TLR2, TLR3 e TLR4 em valores normalizados pela β -Actina, verificamos que houve um aumento dos valores da média e da mediana da expressão relativa desses receptores em D35 relação ao momento D0. Quando analisadas, isoladamente, as expressões relativas dos receptores TLR2, TLR3 e TLR4 aumentaram no momento D35 em relação ao D0, respectivamente, de 11,58%, 3,89% e 5,75%. Essas diferenças foram consideradas significantes, para TLR2 ($P=0.0039$), TLR3 ($P<0.0001$) e TLR4 ($P=0.0382$). (teste T de Wilcoxon). Figura 5 (a,b e c).

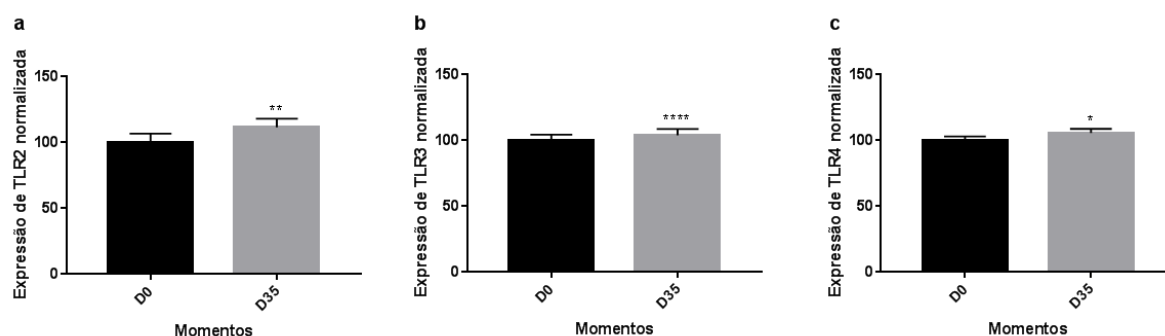


Figura 5. Expressão relativa de TLRs normalizada pela β -actina em células provenientes da medula óssea de pacientes pediátricos. (a) Expressão de TLR2 em D0 e D35. (b) Expressão de TLR3 em D0 e D35. (c) Expressão de TLR4 em D0 e D35. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e as comparações entre os grupos realizadas comparando as médias pelo teste T de Wilcoxon. ** $p<0.005$, **** $p<0.0001$, * $p<0.05$.

Ao avaliar as expressões relativas dos receptores TLR2, TLR3 e TLR4 nos pacientes do grupo de alto risco, novamente houve um aumento da expressão de TLR3 e TLR4 no momento D35 em relação ao D0, respectivamente, de 9,14% e 11,67% ($P=0.001$) e ($P=0,021$). Essas diferenças foram consideradas significantes, (teste T de Wilcoxon). Figura 6 (a,b).

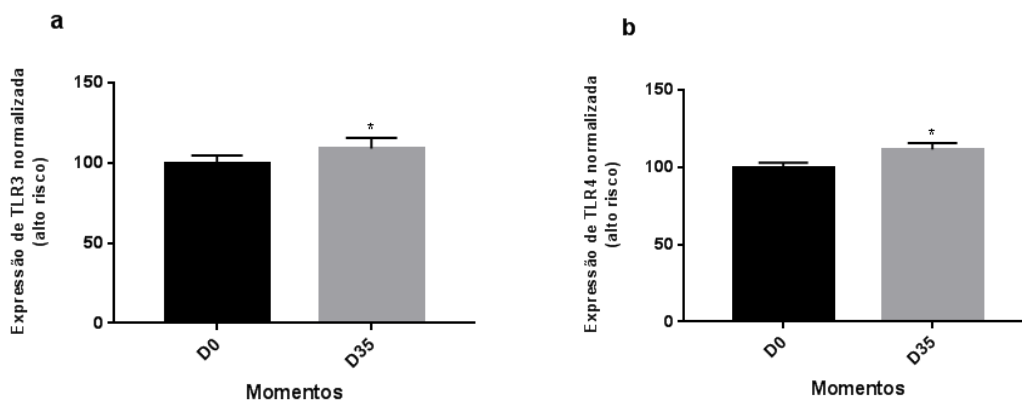


Figura 6. Expressão relativa de TLRs normalizada pela β -Actina em células provenientes da medula óssea de pacientes pediátricos do grupo de alto risco. (a) Expressão de TLR3 em D0 e D35. (b) Expressão de TLR4 em D0 e D35. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e as comparações entre os grupos realizadas comparando as médias pelo teste T de Wilcoxon. * $p<0.05$.

Ao avaliar as expressões relativas dos receptores TLR2, TLR3 e TLR4 nos pacientes de baixo risco e risco intermediário, houve um aumento da expressão de TLR2 no momento D35 em relação ao D0, de 14,89%. Essa diferença foi considerada significativa, ($p=0.048$). (teste T de Wilcoxon). Figura 7.

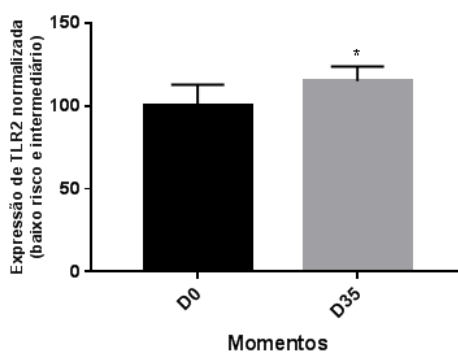


Figura 7. Expressão relativa de TLRs normalizada pela β -Actina em células provenientes da medula óssea de pacientes pediátricos dos grupos baixo risco e

intermediário. Expressão de TLR2 em D0 e D35. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e as comparações entre os grupos realizadas comparando as médias pelo teste T de Wilcoxon. * $p < 0.05$

5.5 Sobrevida Global

A mediana da expressão de TLR2 foi 110,76 (Me=110,76), o primeiro quartil foi 74,72(Q1=74,72) e do terceiro quartil foi 144,43 (Q3=144,43). Pacientes com o valor da expressão de TLR2 entre a mediana e o terceiro quartil tiveram menor sobrevida global, *overall survival* (OS), do que pacientes com baixa expressão de TLR2, ($P < 0.05$). Os resultados mostrados na tabela 3 e figura 8.

Tabela 3. Expressão de TLR2 e sobrevida global em pacientes com LLA.

	OS x \pm SEM	P
TLR2(D35) <Q1	76.34 \pm 2.32	<0.05
TLR2(D35) Q1-Me	82.77 \pm 2.08	<0.05
TLR2(D35) Me-Q3	61.73 \pm 2.66	<0.05

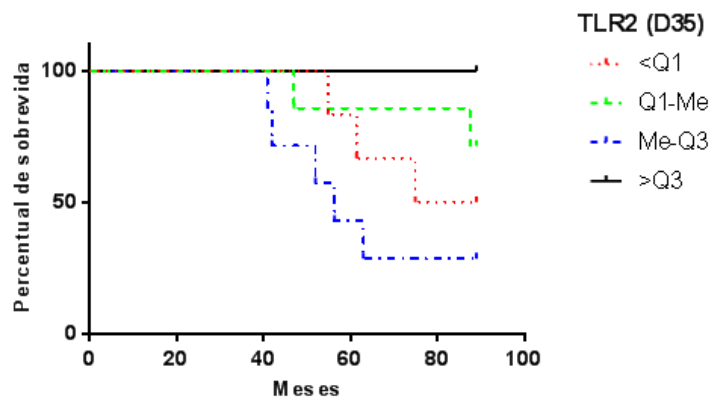


Figura 8. Estimativa Kaplan-Meier de sobrevida em pacientes com LLA e expressão de TLR2 em D35.

A mediana da expressão de TLR4 foi 106,57 (Me=106,57), o primeiro quartil foi 93,39 (Q1=93,39) e do terceiro quartil foi 118,42 (Q3=118,42). Pacientes com o valor da expressão de TLR4 entre a mediana e o terceiro quartil tiveram maior sobrevida

global do que pacientes com baixa expressão de TLR4, ($P < 0.05$). Os resultados mostrados na tabela 4 e figura 9.

Tabela 4. Expressão de TLR4 e sobrevida global em pacientes com LLA.

	OS	P
	$x \pm SEM$	
TLR4(D35) <Q1	65.25±2.97	<0.05
TLR4(D35) Q1-Me	65.63±2.99	<0.05
TLR4(D35) Me-Q3	85.53±1.14	<0.05

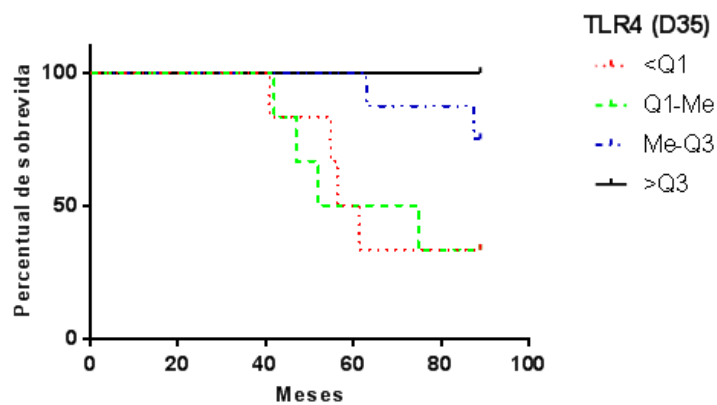


Figura 9. Estimativa Kaplan-Meier de sobrevida em pacientes com LLA e expressão de TLR4 em D35.

Não houve diferença significativa entre a relação de sobrevida global e expressão de TLR3 em D35.

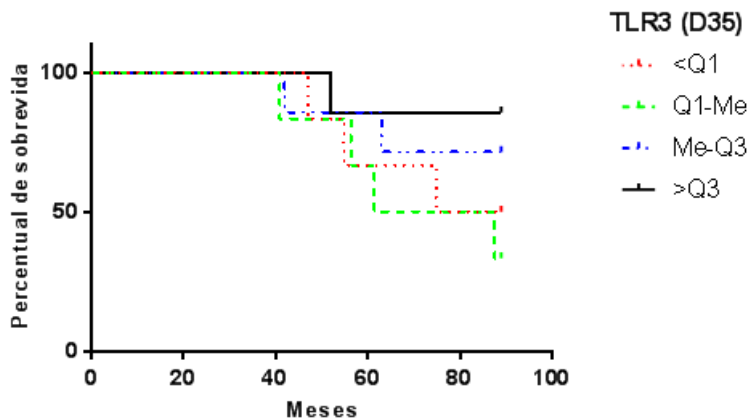


Figura 10. Estimativa Kaplan-Meier de sobrevida em pacientes com LLA e expressão de TLR3 em D35.

6. DISCUSSÃO

A interação entre os tumores e o seu microambiente tumoral e, também, imunológico, é complexa e difícil de decifrar, mas a sua compreensão é de suma importância para o desenvolvimento de novos marcadores de prognóstico e estratégias terapêuticas. As células tumorais desenvolvem sistemas de autorregulação e também de proteção, sobrepujando o sistema imunológico (CAMPESATO et al., 2017).

Esse mecanismo anti-imunogênico é a chave para compreender o microambiente tumoral e imunológico e também para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas na imunoterapia (CHANG et al., 2017; MATSUMOTO et al., 2017; RIDNOUR et al., 2013).

A estimulação de TLRs participa de forma crucial na homeostase de linfócitos B maduros (ANTOSZ, 2014), linfócitos T, células NK, monócitos, neutrófilos, macrófagos e outras células do sistema imune (KAWAI; AKIRA, 2010). Entretanto sua participação na etiologia de doenças malignas hematológicas como leucemias e linfomas ainda permanecem desconhecidas.

Em certos casos, não só a presença de TLRs em câncer confere um pior prognóstico, mas também toda a maquinaria de moléculas adaptadoras que participam da resposta intracelular desses receptores está envolvida, bem como suas respostas extracelulares (MAEDA et al., 2016). Dentre as respostas celulares, observa-se que, a partir da ativação dos TLRs, há uma consequente resposta inflamatória e imunológica, assim como mecanismos que promovem angiogênese, proliferação, permeabilidade, sobrevivência celular e atividade pró-apoptótica através da produção de moléculas e citocinas como TNF- α , TNF- β , VEGF, IL-6, IL-8 (quimiocina pró-angiogênica) (ENCISO et al., 2016; GRIMMIG et al., 2016; TRUCCO et al., 2017).

O efeito global dessa ativação favorece a invasão tecidual, a formação de metástases e a criação de um microambiente tumoral ideal, propiciando condições para a expansão do tumor (MAEDA et al., 2016). Tem se visto também que os TLRs estão envolvidos na transferência de sinais celulares através das cascatas de MAPK, PI3K e AKT.

Tais sinalizações, já caracterizadas como vias que participam do desenvolvimento e expansão tumoral (HUA; HOU, 2013). A presença de TLRs na superfície celular de células tumorais pode indicar seu papel na carcinogênese e sua influência no desenvolvimento e crescimento tumoral (BALKWILL; COUSSENS, 2004). Além disso, a própria reação inflamatória causada pela via ativada por TLRs é um fator que aumenta a lesão tecidual, uma vez que as células saudáveis são destruídas e as células tumorais parecem ser mais imunes a esse processo (SPANOU et al., 2017) e por isso passam pelo processo de expansão clonal maligno.

No presente estudo, o tratamento de células Jurkat e Sup-B15 com os agonistas de TLRs utilizados promoveu a redução da viabilidade celular. Esse efeito parece ser dose dependente, apesar de não termos visto diferenças significantes nas concentrações de 1 µg/ml e 10 µg/ml no tratamento da linhagem Jurkat. O tratamento de células Sup-B15 com agonistas reduziu a viabilidade celular.

No tratamento com PGN houve diferença estatística a partir da concentração de 10 µg/ml em relação ao controle, não havendo diferenças estatística entre esta concentração e a da 100 µg/ml. No tratamento com Poly:IC e LPS houve diferença estatística entre a concentração de 1 µg/ml e o controle, mas não entre as demais concentrações.

A diferença da resposta entre os tratamentos pode ser atribuída às diferenças entre as linhagens celulares utilizadas, uma vez que a sensibilidade aos agonistas foi menor nas células Jurkat que são derivadas de LLA de células T, um tipo de leucemia mais agressiva, estratificada no grupo de alto risco. Por outro lado, a sensibilidade aos agonistas foi maior nas células Sup-B15, que são derivadas de LLA de células B, que geralmente, são estratificadas no grupo de baixo risco.

Nosso estudo é o primeiro a mostrar diferenças de expressão de TLR2, TLR3 e TLR4 ao D35, após a quimioterapia de indução, em que o próprio paciente no D0 é seu controle. A análise da expressão de TLRs nos pacientes entre os momentos D0 e D35 demonstrou um aumento da expressão de TLR2, TLR3 e TLR4 de 11,58%, 3,89% e 5,75, respectivamente.

Quando analisados os pacientes, separando-os pelos grupos de risco, a análise também revelou que esse aumento foi mais significativo. Para os pacientes do grupo de alto risco, o aumento da expressão de TLR3 e TLR4 foi de 9,14% e 11,67%, respectivamente. Na análise da expressão de TLRs dos pacientes dos grupos de

baixo risco e intermediário foi observado um aumento de 15,89% na expressão de TLR2.

Este aumento pode estar associado ao próprio sistema imunológico que modula a proliferação, expansão e diferenciação de células imunes, uma vez que nos pacientes dos grupos de baixo risco e intermediário, o aumento de TLR2 foi mais significativo. Por outro lado, o aumento da expressão de TLR3 e TLR4 em pacientes do grupo de alto risco pode estar associado a processos carcinogênicos, por meio de mecanismos pró-tumorais envolvidos na regulação de mecanismos de diferenciação e proliferação de células leucêmicas.

A análise de sobrevivência dos pacientes em relação a expressão de TLR2 e TLR4 mostrou que os pacientes que tiveram menor sobrevida global apresentaram em D35 maior expressão de TLR2 e menor expressão de TLR4. Pacientes com maior sobrevida global, apresentaram menor expressão de TLR2 e maior expressão de TLR4. Esses resultados estão em concordância com outros estudos que sugerem que a baixa expressão de TLR4 e a alta expressão de TLR2, possam ser marcadores de prognósticos ou de estadiamento para LLC-B.

Rybka e colegas compararam indivíduos saudáveis com pacientes acometidos por LMA (ambos estudos com adultos) e mostraram uma possível relação da alta expressão de TLR2 e de TLR4 com piores prognósticos em LMA. O mesmo grupo mostrou uma relação da alta expressão de TLR2 com estadiamento da LLC-B, uma vez que a expressão de TLR2 foi maior em pacientes com estágios mais avançados da doença, além de a redução da expressão de TLR4, foi associada a estágios mais avançados da LLC-B e a um prognóstico mais desfavorável.

A análise do ciclo celular mostrou que o tratamento induzido pelos agonistas, aumentou a população de células em Sub-G1, o que é um indicativo de morte celular por apoptose (MAHARJAN et al., 2018). Por outro lado, o tratamento reduziu a fase da poliploidia, mostrando que os agonistas diminuíram a proporção de células com o cromossomo aumentado.

A Poliploidia é muito associada com instabilidade genômica, indução de heterogeneidade tumoral e processos de malignidade tumoral, bem como características que levam a inativação de genes supressores tumorais ou ativação de oncogenes (ALONSO-LECUE et al., 2017; HAVAS et al., 2016; JO; SHIN, 2017).

Além disso, a poliploidia tem sido associada a processos que levam à

resistência de medicamentos, sendo a própria instabilidade genética uma das causas. Tal instabilidade pode originar diferenças cromossômicas aberrantes necessárias para o desenvolvimento tumoral e podem conferir às células a capacidade de se tornarem insensíveis a certos fármacos (DENISENKO et al., 2016).

O tratamento com PGN e com POLY:IC aumentou a fase G2, sugerindo que vias relacionadas a síntese proteica também são ativadas. O tratamento com LPS reduziu em torno de 20% a fase S, mas aumentou a fase G0-G1 sugerindo um prolongamento da fase G0-G1, em detrimento da fase S. O tratamento com PGN reduziu a fase G0-G1.

Com a análise do ciclo celular, nós podemos sugerir que a redução da viabilidade celular observada em células Jurkat, após o tratamento com agonistas específicos, pode estar atribuída a ativação de mecanismos pró-apoptóticos. Essa ativação pró-apoptótica pode ser iniciada por mecanismos diferentes, uma vez que as cascatas de sinalização celular são ativadas por TLRs diferentes.

Wang e colegas, observaram que o tratamento com PGN, induziu a apoptose dependente de TNF- α em linhagem celular de leucemia monocítica aguda THP-1 e aumentou significativamente a produção gênica de citocinas como IL-1 β , IL-8 e TNF- α e induziu a fosforilação de p38, Erk e NF- κ B (WANG et al., 2012).

Salaun B e colegas foram os primeiros a mostrar um possível mecanismo ativado por agonistas de TLR3 em células tumorais, que identificou que esta resposta parece requerer IFN-1 (SALAUN et al., 2011) e ativação de caspase-8 e FADD. Essa ativação parece ser dependente da ligação TNF- α e IL-1 β em FADD (*Fas-associated death domain*), o qual forma um complexo que inativa a proteína cIAP2 (inibidor celular da proteína de apoptose) (ZHANG; LIN; HAN, 2010).

Já para TLR4, a cascata iniciada por agonistas tem como possível mecanismo a ativação da via apoptótica dependente de caspase-8 e pode ser atribuído ao aumento da produção de moléculas e citocinas como IFN- α , TNF- α e balanço negativo (*down-regulation*) de NF- κ B (LEHNER et al., 2007)

Ainda não estão totalmente esclarecidos por quais mecanismos os TLRs promovem o crescimento celular, diferenciação celular e morte celular, tanto por apoptose, quanto por necrose. Tais processos ocorrem em células de origens linfóide e mieloide. Além disso, não está claro se há diferença em como os TLRs influenciam esses mecanismos em células normais e em células tumorais.

Ademais, conhecimento em torno dos TLRs tem ganhado importância ora pela sua associação com prognósticos e desfechos, quanto pelos efeitos causados por agonistas ou antagonistas nas vias celulares que modulam o desenvolvimento e promoção de neoplasias malignas.

7. CONCLUSÕES

Esse trabalho revelou que o tratamento com agonistas de TLR2, TLR3 e TLR4 reduziu a viabilidade celular de linhagens celulares Jurkat e Sup-B15, com sensibilidades diferentes entre as linhagens e os tratados. Entretanto este trabalho não demonstrou o efeito dos agonistas sobre a viabilidade celular após realização de protocolos de resistência, nem de tratamentos combinados. Além disso, esse trabalho mostrou que o tratamento de células Jurkat com agonistas específicos aumentou a proporção de células em Sub-G1, o que sugere uma indução de morte celular por apoptose, bem como redução da proporção de células poliploides, característica essa associada a fatores que levam a piores prognósticos.

Esse trabalho revelou que pacientes com LLA apresentaram aumento da expressão de TLR2, TLR3 e TLR4, após a quimioterapia de indução. Quando analisada a sobrevida global em relação a expressão de TLR2 e TLR4, após a quimioterapia de indução, encontramos que uma menor sobrevida global estava associada a maior expressão de TLR2 e menor expressão de TLR4.

É importante a realização de um estudo a longo prazo, onde será necessário aumentar o número de amostra, bem como analisar outros momentos do tratamento além de D0 e D35. Esse estudo evidenciou o aumento da expressão dos TLR2, TLR3 e TLR4 em relação aos momentos D0 e D35. Também revelou sua importância ao demonstrar a relação entre a expressão de TLR3 e TLR4 e o grupo de alto risco onde esse aumento foi maior; bem como a possível relação entre TLR2 e o grupos de baixo risco e intermediário, onde o aumento expressão foi significativo.

8. PERSPECTIVAS

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

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pelo Ministério da Saúde/CNPq/FAPERGS PPSUS Processo nº: 1245-2551/13-0. Instituto do Câncer Infantil (ICI) e pelo fundo de pesquisa institucional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE / HCPA).

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver potenciais conflitos de interesse.

9. REFERÊNCIAS

- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499–511, jul. 2004.
- ALONSO-LECUE, P. et al. Inefficient differentiation response to cell cycle stress leads to genomic instability and malignant progression of squamous carcinoma cells. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 6, p. e2901, jun. 2017.
- ANDERSON, K. et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 356–361, 20 jan. 2011.
- ANTOSZ, H. Distinct IRAK4 Expression in Normal and B-CLL Lymphocytes. **Journal of Cytology & Histology**, v. 05, n. 03, 2014.
- ARELLANO-GALINDO, J. et al. Infectious Agents in Childhood Leukemia. **Archives of Medical Research**, v. 48, n. 4, p. 305–313, maio 2017.
- BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. Cancer: an inflammatory link. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 405–406, 23 set. 2004.
- BARAKA, A. et al. Detection of minimal residual disease in childhood B-acute lymphoblastic leukemia by 4-color flowcytometry. **International Journal of Hematology**, v. 105, n. 6, p. 784–791, jun. 2017.
- BARCELLINI, W. et al. Toll-like receptor 4 and 9 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: relationship with infections, autoimmunity and disease progression. **Leukemia & Lymphoma**, v. 55, n. 8, p. 1768–1773, ago. 2014.
- BARDINI, M. et al. Clonal variegation and dynamic competition of leukemia-initiating cells in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangement. **Leukemia**, v. 29, n. 1, p. 38–50, jan. 2015.
- BARROS, M. R. et al. Viral Modulation of TLRs and Cytokines and the Related Immunotherapies for HPV-Associated Cancers. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 2912671, 2018.
- BÉNÉ, M. C. et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. **Leukemia**, v. 25, n. 4, p. 567–574, abr. 2011.
- BHATIA, S. et al. Nonadherence to Oral Mercaptopurine and Risk of Relapse in Hispanic and Non-Hispanic White Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: A

Report From the Children's Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 17, p. 2094–2101, 10 jun. 2012.

BIONDI, A. et al. Redirecting T cells with Chimeric Antigen Receptor (CAR) for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Autoimmunity**, v. 85, p. 141–152, dez. 2017.

BISWAS, S. K.; LOPEZ-COLLAZO, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 10, p. 475–487, out. 2009.

BJÖRKLUND, E. et al. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 17, n. 1, p. 138–148, jan. 2003.

BLECKMANN, K.; SCHRAPPE, M. Advances in therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood and adolescence. **British Journal of Haematology**, v. 172, n. 6, p. 855–869, mar. 2016.

BRACKETT, J. et al. Use of allopurinol in children with acute lymphoblastic leukemia to reduce skewed thiopurine metabolism: Concurrent use of allopurinol and 6-MP. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 61, n. 6, p. 1114–1117, jun. 2014.

BRANDALISE, SR.; PINHEIRO, VR.; LEE, ML. M. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Criança e do Adolescente: **GBTLI LLA-2209**, v1, p. 160-228, versão revisada, jan. 2014.

BRANDT, K. J. et al. TLR2 ligands induce NF- κ B activation from endosomal compartments of human monocytes. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e80743, 2013.

BRÜGGEMANN, M. et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. **Leukemia**, v. 24, n. 3, p. 521–535, mar. 2010.

BRÜGGEMANN, M.; KOTROVA, M. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2017, n. 1, p. 13–21, 8 dez. 2017.

BUCCISANO, F. et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 119, n. 2, p. 332–341, 12 jan. 2012.

BUITENKAMP, T. D. et al. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. **Blood**, v. 123, n. 1, p. 70–77, 2 jan. 2014.

CAMPESATO, L. F. et al. High IL-1R8 expression in breast tumors promotes tumor growth and contributes to impaired antitumor immunity. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 49470–49483, 25 jul. 2017.

CAMPO, E. et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. **Blood**, v. 117, n. 19, p. 5019–5032, 12 maio 2011.

CHANG, H. et al. Ethanol extract of propolis and its constituent caffeic acid phenethyl ester inhibit breast cancer cells proliferation in inflammatory microenvironment by inhibiting TLR4 signal pathway and inducing apoptosis and autophagy. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 471, 26 set. 2017.

CHANG, Z. L. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. **Inflammation Research**, v. 59, n. 10, p. 791–808, out. 2010.

CHEN, X. et al. Significance of TLR4/MyD88 expression in breast cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 6, p. 7034–7039, 2015.

CHENG, Y.-Q.; ZHAI, X.-W. [Clinical application of minimal residual disease detection in childhood acute leukemia]. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi = Chinese Journal of Contemporary Pediatrics**, v. 20, n. 5, p. 416–420, maio 2018.

CHIRON, D. et al. Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2205–2213, 15 set. 2008.

COCHET, F.; PERI, F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2318, 3 nov. 2017.

CORRIGAN, J. J.; FEIG, S. A.; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Guidelines for pediatric cancer centers. **Pediatrics**, v. 113, n. 6, p. 1833–1835, jun. 2004.

CUI, J. et al. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 11, p. 3270–3285, 2014.

CUI, L. et al. Outcome of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia treated with CCLG-ALL 2008: The first nation-wide prospective multicenter study in China. **American Journal of Hematology**, 20 abr. 2018.

DELBUONO, E. et al. Simplified flow cytometric assay to detect minimal residual disease in childhood with acute lymphoblastic leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 4, p. 281–286, ago. 2008.

DENISENKO, T. V. et al. Mitotic catastrophe and cancer drug resistance: A link that must to be broken. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 24, p. 1–12, jan. 2016.

DING, H.; LI, W.; LU, Q. Role of Toll-like receptors in microbiota-associated gastrointestinal cancer metastasis. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 9, n. 7, p. 142, 2013.

DIXON, S. B. et al. Factors influencing risk-based care of the childhood cancer survivor in the 21st century. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 2, p. 133–152, mar. 2018.

ECHIZEN, K. et al. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E₂ and Toll-like receptor/MyD88 pathways. **Cancer Science**, v. 107, n. 4, p. 391–397, abr. 2016.

ENCISO, J. et al. Modeling the Pro-inflammatory Tumor Microenvironment in Acute Lymphoblastic Leukemia Predicts a Breakdown of Hematopoietic-Mesenchymal Communication Networks. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 19 ago. 2016.

FACINA, T. Estimación 2014 – Incidencia de Cáncer en Brasil. p. 2, [s.d.].

FRAZÃO, J. B.; ERRANTE, P. R.; CONDINO-NETO, A. Toll-Like Receptors' Pathway Disturbances are Associated with Increased Susceptibility to Infections in Humans. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, n. 6, p. 427–443, dez. 2013.

FUKATA, M. et al. Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis: **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1464–1473, jul. 2011.

FÚRI, I. et al. Epithelial toll-like receptor 9 signaling in colorectal inflammation and cancer: clinico-pathogenic aspects. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 26, p. 4119–4126, 14 jul. 2013.

GANESAN, S. et al. NF-κB/Rel proteins and the humoral immune responses of *Drosophila melanogaster*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 349, p. 25–60, 2011.

GANGLOFF, M. Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 92–98, mar. 2012.

GAYNON, P. S. et al. Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a Children's Oncology Group Report. **Leukemia**, v. 24, n. 2, p. 285–297, fev. 2010.

GENG, P.-L. et al. Toll-Like Receptor 3 is Associated With the Risk of HCV Infection and HBV-Related Diseases. **Medicine**, v. 95, n. 21, p. e2302, maio 2016.

GERR, H. et al. Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations. **British Journal of Haematology**, v. 149, n. 1, p. 84–92, abr. 2010.

GOLDIE, J. The Genetic Origin of Drug Resistance in Neoplasms: Implications for Systemic Therapy. v. 44, p. 12, 1984.

GOPALAKRISHNAN, A.; SALGAME, P. Toll-like receptor 2 in host defense against Mycobacterium tuberculosis: to be or not to be-that is the question. **Current Opinion in Immunology**, v. 42, p. 76–82, out. 2016.

GRIMMIG, T. et al. Toll Like Receptor 2, 4, and 9 Signaling Promotes Autoregulative Tumor Cell Growth and VEGF/PDGF Expression in Human Pancreatic Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2060, 8 dez. 2016.

GRONDONA, P. et al. NF- κ B Activation in Lymphoid Malignancies: Genetics, Signaling, and Targeted Therapy. **Biomedicines**, v. 6, n. 2, 26 mar. 2018.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal de Pediatria**, v. 0, n. 0, 1 set. 2008.

HARRIS, M. B. et al. Consolidation therapy with antimetabolite-based therapy in standard-risk acute lymphocytic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group Study. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 16, n. 8, p. 2840–2847, ago. 1998.

HARSINI, S. et al. Toll-like receptors in lymphoid malignancies: Double-edged sword. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 89, n. 2, p. 262–283, fev. 2014.

HAVAS, A. P. et al. Belinostat and vincristine demonstrate mutually synergistic cytotoxicity associated with mitotic arrest and inhibition of polyploidy in a preclinical model of aggressive diffuse large B cell lymphoma. **Cancer Biology & Therapy**, v. 17, n. 12, p. 1240–1252, 28 out. 2016.

HEALY, J. et al. Promoter SNPs in G1/S checkpoint regulators and their impact on the susceptibility to childhood leukemia. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 683–692, 15 jan. 2007.

HEEREMA, N.; CATALINA RAIMONDI, S. Cytogenetics of Acute Leukemia. **Neoplastic Diseases of the Blood**. jan. 2018.

HOPKINS, P. A.; SRISKANDAN, S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 140, n. 3, p. 395–407, jun. 2005.

HOWARD, S. C. et al. Establishment of a Pediatric Oncology Program and Outcomes of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in a Resource-Poor Area. **JAMA**, v. 291, n. 20, p. 2471–2475, 26 maio 2004.

HSU, W.-L. et al. The incidence of leukemia, lymphoma, and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950 – 2001. **Radiation research**, v. 179, n. 3, mar. 2013.

HUA, Z.; HOU, B. TLR signaling in B-cell development and activation. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 10, n. 2, p. 103–106, mar. 2013.

HUNGER, S. P. 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**, v. 30, n. 14, p. 1663–1669, 10 maio 2012.

IACOBUCCI, I. et al. Cytogenetic and Molecular Predictors of Outcome in Acute Lymphocytic Leukemia: Recent Developments. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 7, n. 2, p. 133–143, jun. 2012.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: < <http://controlecancer.bvs.br/>>. Acesso em 15 de mai. de 2018.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **A Situação do Câncer no Brasil - Leucemia 2015**. Disponível em: < www.inca.gov.br >. Acesso em 15 de mai. de 2018.

IRVING, J. et al. Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting; **Haematologica**, v. 94, n. 6, p. 870–874, 1 jun. 2009.

JAFFE, E. S. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. **Hematology**, v. 2009, n. 1, p. 523–531, 1 jan. 2009.

JAN, M.; MAJETI, R. Clonal evolution of acute leukemia genomes. **Oncogene**, v. 32, n. 2, p. 135–140, 10 jan. 2013.

JIN, S.-H. et al. TLR4 polymorphism and periodontitis susceptibility: A meta-analysis. **Medicine**, v. 95, n. 36, p. e4845, set. 2016.

JO, Y.; SHIN, D. Y. Repression of the F-box protein Skp2 is essential for actin damage-induced tetraploid G1 arrest. **BMB Reports**, v. 50, n. 7, p. 379–383, jul. 2017.

KARAWAJEW, L. et al. Minimal residual disease analysis by eight-color flow cytometry in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 100, n. 7, p. 935–944, 1 jul. 2015.

KAWAI, T. et al. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p. 1061–1068, out. 2004.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, maio 2010.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637–650, maio 2011.

KIM, S. et al. Differential Regulation of Toll-Like Receptor-Mediated Cytokine Production by Unfolded Protein Response. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 9827312, 2018.

KIM, Y. K.; SHIN, J. S.; NAHM, M. H. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. **Yonsei Medical Journal**, v. 57, n. 1, p. 5–14, jan. 2016.

KUZMICH, N. N. et al. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. **Vaccines**, v. 5, n. 4, 4 out. 2017.

LAUER, S. J. et al. A comparison of early intensive methotrexate/mercaptopurine with early intensive alternating combination chemotherapy for high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group phase III randomized trial. **Leukemia**, v. 15, n. 7, p. 1038–1045, jul. 2001.

LEE, J. W.; CHO, B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 60, n. 5, p. 129, 2017.

LEHNER, M. et al. Caspase-8 dependent apoptosis induction in malignant myeloid cells by TLR stimulation in the presence of IFN-alpha. **Leukemia Research**, v. 31, n. 12, p. 1729–1735, dez. 2007.

LI, K. et al. Targeting acute myeloid leukemia with a proapoptotic peptide conjugated to a toll-like receptor 2-mediated cell-penetrating peptide: Targeting AML with TLR2-binding CPP. **International Journal of Cancer**, v. 134, n. 3, p. 692–702, 1 fev. 2014.

LI, T.-T.; OGINO, S.; QIAN, Z. R. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: Carcinogenesis to cancer therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 47, p. 17699–17708, 21 dez. 2014.

LI, X.; JIANG, S.; TAPPING, R. I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. **Cytokine**, v. 49, n. 1, p. 1–9, jan. 2010.

LIU, G. J. et al. Pax5 loss imposes a reversible differentiation block in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. **Genes & Development**, v. 28, n. 12, p. 1337–1350, 15 jun. 2014.

LUNDIN, C. et al. Clinical and genetic features of pediatric acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome in the Nordic countries. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 7, p. 32, 11 abr. 2014.

MAEDA, Y. et al. Myeloid Differentiation Factor 88 Signaling in Bone Marrow-Derived Cells Promotes Gastric Tumorigenesis by Generation of Inflammatory Microenvironment. **Cancer Prevention Research**, v. 9, n. 3, p. 253–263, 1 mar. 2016.

MAHARJAN, S. et al. Gomisin G Suppresses the Growth of Colon Cancer Cells by Attenuation of AKT Phosphorylation and Arrest of Cell Cycle Progression. **Biomolecules & Therapeutics**, 14 jun. 2018.

MAIA, R. DA R. P.; WUNSCH FILHO, V. Infection and childhood leukemia: review of evidence. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 6, p. 1172–1185, dez. 2013.

MAINO, E. et al. MODERN IMMUNOTHERAPY OF ADULT B-LINEAGE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA WITH MONOCLONAL ANTIBODIES AND CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR MODIFIED T CELLS. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 2015001, 1 jan. 2015.

MAJUMDAR, M. et al. Role of TLR gene expression and cytokine profiling in the immunopathogenesis of viral hepatitis E. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 73, p. 8–13, dez. 2015.

MANNI, M. et al. IRF4-Dependent and IRF4-Independent Pathways Contribute to DC Dysfunction in Lupus. **PloS One**, v. 10, n. 11, p. e0141927, 2015.

MATIJEVIC GLAVAN, T. et al. Toll-like receptor 3 stimulation triggers metabolic reprogramming in pharyngeal cancer cell line through Myc, MAPK, and HIF: TLR3 ACTIVATION TRIGGERS METABOLIC REPROGRAMMING. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 4, p. 1214–1226, abr. 2017.

MATLOUB, Y. et al. Intrathecal triple therapy decreases central nervous system relapse but fails to improve event-free survival when compared with intrathecal methotrexate: results of the Children's Cancer Group (CCG) 1952 study for standard-risk acute lymphoblastic leukemia, reported by the Children's Oncology Group. **Blood**, v. 108, n. 4, p. 1165–1173, 15 ago. 2006.

MATSUMOTO, M. et al. Toll-Like Receptor 3 Signal in Dendritic Cells Benefits Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 21 dez. 2017.

MAZLOUMI, S. H. M. et al. Combined Study of Cytogenetics and Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) Analysis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in a Tertiary Cancer Centre in South India. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 8, p. 3825–3827, 31 ago. 2012.

MEYER, C. et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. **Leukemia**, v. 27, n. 11, p. 2165–2176, nov. 2013.

MILANI, R. MAPEAMENTO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA RESISTÊNCIA A QUIMIOTERÁPICOS EM CÉLULAS LEUCÊMICAS: UMA ABORDAGEM COMPUTACIONAL. p. 128, [s.d.].

MONLISH, D. A.; BHATT, S. T.; SCHUETTPELZ, L. G. The Role of Toll-Like Receptors in Hematopoietic Malignancies. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 28 set. 2016.

MORANDO, J. et al. Transplante de células-tronco hematopoéticas em crianças e adolescentes com leucemia aguda: experiência de duas instituições Brasileiras. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 350–357, 2010.

MORESCO, E. M. Y.; LAVINE, D.; BEUTLER, B. Toll-like receptors. **Current biology: CB**, v. 21, n. 13, p. R488-493, 12 jul. 2011.

MUKHERJEE, S.; KARMAKAR, S.; BABU, S. P. S. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 193–204, mar. 2016.

MURPHY, S. L.; XU, J.; KOCHANNEK, K. D. Deaths: final data for 2010. **National Vital Statistics Reports: From the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System**, v. 61, n. 4, p. 1–117, 8 maio 2013.

NCI. National Cancer Institute. Leukemia. 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq>>. Acesso em: 15 jun. de 2018.

NTOUFA, S. et al. Toll-like receptors signaling: A complex network for NF- κ B activation in B-cell lymphoid malignancies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 39, p. 15–25, ago. 2016.

PAARNIO, K. et al. Divergent expression of bacterial wall sensing Toll-like receptors 2 and 4 in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 26, p. 4831–4838, 14 jul. 2017.

PARK, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191–1195, abr. 2009.

PARK, G. B. et al. TLR3/TRIF signalling pathway regulates IL-32 and IFN- β secretion through activation of RIP-1 and TRAF in the human cornea. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 19, n. 5, p. 1042–1054, maio 2015.

PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In: **PDQ Cancer Information Summaries**. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US), 2002a.

PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD. Childhood Acute Myeloid Leukemia/Other Myeloid Malignancies Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In: **PDQ Cancer Information Summaries**. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US), 2002b.

PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD. Late Effects of Treatment for Childhood Cancer (PDQ®): Patient Version. In: **PDQ Cancer Information Summaries**. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US), 2002c.

PUI, C.-H. et al. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. **The Lancet. Oncology**, v. 16, n. 4, p. 465–474, abr. 2015.

REDAELLI, A. et al. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). **European Journal of Cancer Care**, v. 14, n. 1, p. 53–62, mar. 2005.

RIDNOUR, L. A. et al. Molecular pathways: toll-like receptors in the tumor microenvironment--poor prognosis or new therapeutic opportunity. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 6, p. 1340–1346, 15 mar. 2013.

ROBAZZI, T. C. M. V. et al. Osteoarticular manifestations as initial presentation of acute leukemias in children and adolescents in Bahia, Brazil. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 29, n. 9, p. 622–626, set. 2007.

ROBISON, L. L. Late Effects of Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy in Patients Diagnosed at 0-20 Years of Age. **Hematology**, v. 2011, n. 1, p. 238–242, 1 dez. 2011.

ROLF, N. et al. Heterodimer-specific TLR2 stimulation results in divergent functional outcomes in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Immunomodulation. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1980–1990, jul. 2015.

RON, E. et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part IV: Comparison of cancer incidence and mortality. **Radiation Research**, v. 137, n. 2 Suppl, p. S98-112, fev. 1994.

RYBKA, J. et al. The expression of Toll-like receptors in patients with acute myeloid leukemia treated with induction chemotherapy. **Leukemia Research**, v. 39, n. 3, p. 318–322, mar. 2015.

RYBKA, J. et al. The Expression of Toll-Like Receptors in Patients with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 64, n. S1, p. 147–150, dez. 2016.

SALAUN, B. et al. TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 5, p. 1607–1614, 1 mar. 2011.

SÁNCHEZ-CUAXOSPA, M. et al. Low expression of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 2, p. 675–681, ago. 2016.

SANTIAGO, R. et al. Novel therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 18, n. 11, p. 1081–1099, 24 jul. 2017.

SARKAR, S. N. et al. Two Tyrosine Residues of Toll-like Receptor 3 Trigger Different Steps of NF- κ B Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 6, p. 3423–3427, 30 nov. 2006.

SCHRAPPE, M. et al. Outcomes after Induction Failure in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1371–1381, 12 abr. 2012.

SCHULTZ, K. R. et al. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. **Leukemia**, v. 28, n. 7, p. 1467–1471, jul. 2014.

SCHWICKERT, T. A. et al. Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros. **Nature Immunology**, v. 15, n. 3, p. 283–293, mar. 2014.

SCRIDELI, C. A. et al. A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. **Haematologica**, v. 94, n. 6, p. 781–789, jun. 2009.

SEIBEL, N. L. et al. Early postinduction intensification therapy improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. **Blood**, v. 111, n. 5, p. 2548–2555, 1 mar. 2008.

SMITH, M. A. et al. Declining childhood and adolescent cancer mortality: Childhood & Adolescent Cancer Mortality. **Cancer**, v. 120, n. 16, p. 2497–2506, 15 ago. 2014.

SPANOU, E. et al. Genetic Variability as a Regulator of TLR4 and NOD Signaling in Response to Bacterial Driven DNA Damage Response (DDR) and Inflammation: Focus on the Gastrointestinal (GI) Tract. **Frontiers in Genetics**, v. 8, 29 maio 2017.

SRIVASTAVA, N. et al. *Aeromonas hydrophila* utilizes TLR4 topology for synchronous activation of MyD88 and TRIF to orchestrate anti-inflammatory responses in zebrafish. **Cell Death Discovery**, v. 3, p. 17067, 2 out. 2017.

STARÝ, J.; HRUŠÁK, O. Recent advances in the management of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **F1000Research**, v. 5, p. 2635, 4 nov. 2016.

TEACHEY, D. T.; HUNGER, S. P. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 162, n. 5, p. 606–620, set. 2013.

TEKGUNDUZ, E.; DEMIR, M.; AKPINAR, S. Prognostik Faktörler İfloranda Akut Lenfoblastik Lösemi. v. 20, n. 1, p. 11, 2010.

TRUCCO, L. D. et al. Downregulation of adaptor protein MyD88 compromises the angiogenic potential of B16 murine melanoma. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179897, 29 jun. 2017.

VAN BERGENHENEGOUWEN, J. et al. TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 5, p. 885–902, nov. 2013.

VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937–951, 30 jul. 2009.

VERCAMMEN, E.; STAAL, J.; BEYAERT, R. Sensing of Viral Infection and Activation of Innate Immunity by Toll-Like Receptor 3. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 13–25, 1 jan. 2008.

VORA, A. et al. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. **The Lancet. Oncology**, v. 14, n. 3, p. 199–209, mar. 2013.

WANG, C. et al. Expression signature distinguishing two tumour transcriptome classes associated with progression-free survival among rare histological types of epithelial ovarian cancer. **British Journal of Cancer**, v. 114, n. 12, p. 1412–1420, jun. 2016.

WANG, D. et al. Peptidoglycans Promotes Human Leukemic THP-1 Cell Apoptosis and Differentiation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 12, p. 6409–6413, 31 dez. 2012.

WARD, E. et al. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014: Cancer in Children and Adolescents. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 2, p. 83–103, mar. 2014.

WOHLFAHRT, A. B. et al. The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 1, p. 7–12, fev. 2015.

YU, S. et al. TLR sorting by Rab11 endosomes maintains intestinal epithelial-microbial homeostasis. **The EMBO journal**, v. 33, n. 17, p. 1882–1895, 1 set. 2014.

ZHANG, D.; LIN, J.; HAN, J. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 7, n. 4, p. 243–249, jul. 2010.

ZHANG, J. et al. Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: Ligand specificity and signal pathways. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 380–388, dez. 2014.

ZHAO, Y. et al. Genetic polymorphisms of CCL1 rs2072069 G/A and TLR2 rs3804099 T/C in pulmonary or meningeal tuberculosis patients. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 10, p. 12608–12620, 2015.