UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TATIANA SILVEIRA SANTIAGO

Expressão dos genes das metaloproteinases na medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda

Ribeirão Preto
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

TATIANA SILVEIRA SANTIAGO

Expressão dos genes das metaloproteinases na medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Opção: Investigação em Pediatria

Orientador: Dr Luíz Gonzaga Tone

Ribeirão Preto

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

SANTIAGO, TATIANA SILVEIRA

Expressão dos genes das metaloproteinases na medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Luís Gonzaga Tone

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Tudo que sou, tudo que conquistei foi graças a presença de Deus em minha vida, meu Pai onipresente e onisciente, que me deu forças nas diversas vezes que achei que não poderia continuar, e que por várias vezes me abriu mais uma porta nessa atribulada e fantástica caminhada da vida. Agradeço a ele todas a minhas conquistas.

Aos meus queridos pais, que mesmo distantes geograficamente, permeiam minha vida com amor, mostrando-me o valor de cada conquista que temos, e nunca deixaram de estar ao meu lado.

Ao meu marido, um incansável estimulador dessa dura jornada de mestrado que aventei há três anos. Você é meu porto seguro.

Aos meus irmãos que estavam me apoiando, emitindo exemplos de superação diariamente. Meus queridos, seus exemplos valem mais que mil palavras em minha vida.

Ao meu orientador, Dr. Tone, que foi incansavelmente paciente comigo, posso dizer que foi um pai orientador, e acho que sua sabedoria de lidar com situações tão adversas é que permitiu a conclusão deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Carlos Scrideli, um pesquisador de corpo e alma, que me forneceu valiosas orientações, e me ajudou em cada etapa de realização deste estudo.

Ao Daniel, por sua imensa ajuda na execução desse projeto independente do horário e dia que seu auxílio fosse solicitado. Meus sinceros agradecimentos.

E a toda equipe do laboratório de biologia molecular, Rosane, Angélica, Elvis, Cleiton, Vanessa, e do laboratório de Imunoinfantil, Ruchele e Mel que me ajudaram nas várias etapas que trilhei naqueles laboratórios.

RESUMO

SANTIAGO, T.S. **Expressão dos genes das metaloproteinases na medula óssea de pacientes com leucemia linfóide aguda.** 2010. 60f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

As leucemias linfóides correspondem ao câncer mais freqüente na infância, com sobrevida em torno de 70 a 80%, apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticos. Os mecanismos envolvidos na propagação dos blastos leucêmicos e na infiltração de órgãos extramedulares são de fundamental importância para melhor compreensão da leucemogênese. Estudos com tumores sólidos e suas metástases mostraram relação das metaloproteinases com a liberação de células cancerígenas para outros sítios do organismo. As metaloproteinases são endopeptidases que atuam na degradação e renovação da matriz extracelular. A relação das MMPs com blastos leucêmicos é pouco conhecida. ***Objetivo***: analisar a expressão gênica das metaloproteinases: MMP1, MMP2, MMP3, MMP14, TIMP2, TIMP3 e TIMP4, em medulas ósseas de pacientes com leucemia linfóide aguda ao diagnóstico, correlacionando com características clínicas das LLAs T e B. ***Metodologia***: Foram analisadas 29 amostras de medulas ósseas de pacientes pediátricos com LLA armazenadas no banco de medulas do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para expressão gênica dos referidos genes por técnica de RQ-PCR. Análise estatística foi feita com o *software* SPSS 16.0. A expressão dos genes nas amostras de medula óssea de LLA-T e B foram comparadas usando os valores da mediana através do teste exato de Fisher, e os valores absolutos através do teste de Mann-Withney. ***Resultados***: A expressão aumentada do gene da TIMP2 apresentou correlação com glóbulos brancos acima de 50.000 ao diagnóstico e LLA-T, a MMP14 e razão MMP14/TIMP2 com Calla + (p=0,001), TIMP3 com má resposta ao tratamento de indução quimioterápica, e a razão MMP2/TIMP2 com fatores de mau prognóstico e menor sobrevida livre de doença. ***Conclusão:*** A MMP14 parece estar relacionada à LLA-B e o desbalanço entre MMP2/TIMP2 sugere ser mais importante como valor prognóstico para LLA da infância que a avaliação isolada de um único gene.

Palavras-chave: leucemia, linfóide, aguda, metaloproteinase

ABSTRACT

SANTIAGO, T.S. Gene expression of metalloproteinases in bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia. 2010. 60f. Dissertation (Master) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The lymphoid leukemia represents the most common cancer in childhood, with survival rates between 70 to 80%, despite advances in diagnosis and treatment. The mechanisms involved in the spread of leukemic blasts and extramedullary infiltration of organs are the great importance for better understanding of leukemogenesis. Studies with solid tumors and their metastases showed relationship between metalloproteinases and the release of cancer cells to other sites in the body. The metalloproteinases are endopeptidases which act in degradation and renewal of the extracellular matrix. The relationship of MMPs with leukemic blasts is unclear. ***Objective***: To analyze the gene expression of metalloproteinases: MMP1, MMP2, MMP3, MMP14, TIMP2, TIMP3 and TIMP4 in bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and correlation with clinical features of ALL-T and B. ***Methods***: We evaluate 29 samples from bone marrow of pediatric patients with ALL stored in the marrow bank of the Clinical Hospital of Ribeirão Preto for the gene expression of these genes by RQ-PCR tecnique. Statistical analysis was performed with SPSS 16.0. Genes expression in samples of bone marrow ALL-T and -B were compared using the median values for Fisher's exact test, and absolute expression to compare the variables by the Mann-Whitney. ***Results***: TIMP2 gene increased expression correlated with white blood cell count above 50,000 at diagnosis with ALL-T, MMP14 gene and MMP14/TIMP2 ratio with Calla + ($p = 0.001$), TIMP3 with poor response to standard induction chemotherapy, and MMP2/TIMP2 ratio with poor prognosis factors and lower disease-free survival. ***Conclusion***: MMP14 appears to be related to B-ALL and imbalance between MMP2/TIMP2 suggests greater importance as a prognostic value for ALL in childhood than the isolated assessment of a single gene.

Keywords: leukemia, lymphoma, leukemia, metalloproteinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Domínios estruturais das MMPs.....17

Figura 2 – Capacidade das MMPs de se ativar umas com as outras na superfície celular.....18

Figura 3 – Sobrevida livre de eventos em crianças com LLA-B e –T.....29

Figura 4 – Nível de expressão relativa de RNAm da MMP14 na medula óssea de 15 crianças com LLA-B e 14 com LLA-T.....30

Figura 5 – Expressão relativa de RNAm de TIMP2 na medula óssea de pacientes pediátricos com LLA – T e – B.....31

Figura 6 – Relação TIMP3 elevada com má resposta ao tratamento.....34

Figura 7 – Relação da expressão gênica MMP14/TIMP2 com LLA-B.....35

Figura 8 – Expressão gênica da relação MMP2/TIMP2 e recidiva/óbito ou remissão completa.....36

Figura 9 – Sobrevida livre de eventos em crianças com LLA de acordo com a expressão da razão dos genes MMP2/TIMP2 abaixo e acima da mediana.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios do GBTLI para definição de risco de recaída 12

Tabela 2 - Grupos das MMPs listadas com seus nomes, sinônimos e substratos específicos 15

Tabela 3 - Exemplos da relação das MMPs e TIMPs com neoplasias 21

Tabela 4 - Variáveis clínicas dos grupos analisados 29

Tabela 5 - Análise de variáveis clínicas com expressão das MMPs utilizando o teste de Fisher (valor de *p*), o odds ratio e intervalo de confiança de 95% 31

Tabela 6 - Análise de variáveis clínicas com expressão das TIMPs utilizando o teste de Fisher (valor de *p*), odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% 32

Tabela 7 - Avaliação das variáveis clínicas com a expressão das MMPs e suas medianas, com valor mínimo e máximo. Utilizado teste de Mann-Whitney (*p)* 33

Tabela 8 - Avaliação das variáveis clínicas com a expressão das TIMPs e suas medianas, com valor mínimo e máximo. Utilizado teste de Mann-Whitney (*p*) 33

Tabela 9 - Avaliação das variáveis clínicas com a expressão gênica das razões entre a MMP2/MMP14, MMP2/TIMP2 e MMP14/TIMP2 utilizando o teste de Fisher (valor de *p*), odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% 35

Tabela 10 - Avaliação das variáveis clínicas com a expressão gênica das razões entre a MMP2/MMP14, MMP2/TIMP2 e MMP14/TIMP2 e suas medianas. Utilizado teste de Mann-Whitney (*p)* 36

Tabela 11 - Nível de expressão gênica das MMP1, MMP2, MMP14, TIMP2, TIMP3, TIMP4 e as relações MMP2/MMP14, MMP2/TIMP2 e MMP14/TIMP2 e suas associações com sobrevida livre de eventos em cinco anos 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CALLA	Antígeno comum da leucemia linfóide aguda
Col	Colágeno
FAB	Franco-Americano-Britânico
GBTLI	Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda da Infância
HC-FMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
LLA	Leucemia linfóide aguda
MEC	Matriz extracellular
MMP	Matriz metaloproteinase
MT1—MMP	Metaloproteinase de membrana tipo 1 ou metaloproteinase 14 (MMP14)
PCR	Reação em cadeia da polimerase, em inglês *Polymerase Chaim Reaction*
RNAm	RNA (ácido ribonucléico) mensageiro
RQ-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
SNC	Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
1.1 Revisão da Literatura 10
1.1.1 Leucemia 10
1.1.2 Metaloproteinases 14
1.2 Justificativa 22
1.3 Objetivos 22

2 METODOLOGIA 23
2.1 Casuística 23
2.2 Métodos 25
2.3 Análise Estatística 26

3 RESULTADOS 28
3.1 Dados epidemiológicos 28
3.2 Análise das variáveis relacionadas com a expressão gênica 30

4 DISCUSSÃO 38

5 CONCLUSÃO 43

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO 44

7 REFERÊNCIAS 45

ANEXOS 56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão da Literatura

1.1.1 Leucemia

O câncer corresponde à segunda causa de morte na infância, apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticos. A leucemia é a neoplasia maligna mais freqüente na faixa etária de zero a dezoito anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997).

A leucemia resulta da proliferação descontrolada de blastos na medula óssea, podendo infiltrar outros órgãos, como o sistema nervoso central. A doença pode ser de linhagem mielóide, linfóide, bifenotípica ou de bilinhagem, a depender do precursor celular que sofreu malignização, podendo ser determinada e classificada por imunofenotipagem, análise morfológica, citogenética e molecular do aspirado de medula óssea (BENNETT et al., 1976; BENNETT et al., 1981; FOON; TODD, 1986; ABSHIRE et al., 1992; PUI et al., 2004; ARMSTRONG; LOOK, 2005; WANG; DICK, 2005).

A leucemia linfóide aguda (LLA) é a mais freqüente das leucemias, responsável por setenta a oitenta por cento dos casos na infância, com incidência de 29,2 casos por milhão de crianças nos Estados Unidos (PIZZO; POPLACK, 2002). A faixa etária mais acometida é entre dois e cinco anos, mas sofre variações entre os diferentes países e épocas analisadas, com possível correspondência com maiores períodos de industrialização dos países, o que sugere existir diferentes períodos de exposição a novo ambiente leucemogênico. (AHLBOM et al., 2000; KINLEN, 2004; BUFFER et al., 2005; GREAVES, 2006). Os pesquisadores britânicos Kinlen (2004) e Greaves (2006) sugeriram hipóteses para o aumento dos casos novos de LLA, principalmente nas novas cidades: o primeiro defendia que os casos novos resultavam da exposição de indivíduos suscetíveis (não imunizados) a infecções não patológicas após contato com portadores. O segundo elaborou a hipótese da infecção tardia, sugerindo que indivíduos com clone pré-leucêmico adquirido intra-

útero, vivendo em ambiente com baixa exposição a infecções comuns da primeira infância, estariam predispostos à resposta aberrante ou patológica do sistema imune por se exporem tardiamente, no período em que há um aumento da proliferação das células linfóides.

Vários fatores ambientais têm sido descritos como relacionados à ocorrência da LLA, como a exposição à radiação ionizante, ao tabaco, aos agrotóxicos e outros, entretanto, devido ao pequeno tempo de vida para exposição da população pediátrica, acredita-se haver também fatores intrínsecos ao paciente envolvidos na gênese da leucemia (PRESTON et al., 1994; INFANTE-RIVARD et al., 1999; BRONDUM et al., 1999; SPECTOR et al.,2006).

Assim, a leucemia se apresenta como uma doença heterogênea e ainda sem fatores etiológicos bem compreendidos (BHOJWANI et al., 2007). As variações genéticas têm despertado interesse por representarem importante ponto na suscetibilidade individual ao câncer, com alguns estudos alertando para a relação entre a LLA na infância e polimorfismos de genes envolvidos com citocromo P450, quinona oxiredutase NAD(P)H, glutationa S-transferase, e a inibição do ciclo celular (KRAJINOVIC et al., 2002; GREAVES; WIEMELS, 2003; CANALLE et al., 2004; LANCIOTTI, 2005; GAST et al., 2007; HEALY et al., 2007; SINNETT et al., 2007). Entretanto, até o momento, nenhuma interação ambiental direta foi convincentemente estabelecida com qualquer gene (PUI et al., 2008).

As alterações nos mecanismos biológicos contribuem para maior suscetibilidade à leucemogênese, podendo ser agrupadas em seis categorias: 1 - crescimento e diferenciação celular, 2 - replicação e reparo do DNA, 3 - metabolismo de xenobiótico, 4 - apoptose, 5 - resposta ao estresse oxidativo e 6 - ciclo celular. Alguns oncogenes são ativados através de translocações e fusões, o que poderia permitir que alguns linfoblastos escapassem do controle do ciclo celular, e não respeitassem a maquinaria de morte celular fisiológica. Além disso, foi demonstrado que o ambiente interfere nestes mecanismos biológicos por favorecer ou inibir a expressão de oncogenes (SINNETT et al., 2007).

As leucemias linfóides agudas podem ser divididas de acordo com a célula linfóide maligna expressa. Pode ser de células T e B, variando com a maturação da célula de pró B, pré B e B madura. As de células T representam 15% das LLAs, das quais, metade manifestam-se com massas mediastinais, um terço ou até metade dos casos tem mais de 100.000 leucócitos por mm^3 ao diagnóstico, além de

apresentarem maior ocorrência de invasão para sistema nervoso central (SNC) (DOWELL et al., 1987; PUI et al., 1990).

Segundo o Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento da LLA na infância (GBTLI - 99) a leucemia linfóide aguda é estratificada como de alto risco (AR) e risco básico (RB) de recaída, segundo critérios de idade, contagem leucocitária ao diagnóstico, resposta à terapêutica de indução quimioterápica nos dias 7 (com a contagem de glóbulos brancos no sangue periférico abaixo ou acima de 5000 células/mm^3), dia 14 (com medula óssea como M1, M2 ou M3) e no dia 28 (através da contagem de linfoblastos na medula óssea abaixo ou acima de 5%) (BRANDALISE et al., 1993) e alterações citogenéticas, a fim de estabelecer tratamentos com intensidade quimioterápica distintos. Entretanto, ainda não são bem compreendidos os mecanismos envolvidos na apresentação de LLA-AR ou RB (Tabela 1).

Tabela 1 - Critérios do GBTLI para definição de risco de recaída

Variáveis	Alto Risco	Risco Básico
Idade [1]	< 1 ano e > 9 anos	> 1 ano e > 9 anos
Glóbulos Brancos (GB) ao diagnóstico	> 50.000/mm^3	< 50.000/mm^3
GB no D7 [2]	> 5000/mm^3	< 5000/mm^3
Medula óssea (MO) no D14 [2]	M3[3]	M1[4] ou M2[5]
Linfoblastos na MO no D28 [2]	> 5%	< 5%
Citogenética desfavorável [7]	Presente	Ausente

Legenda: 1 – idade ao diagnóstico; 2 – Dia da indução quimioterápica; 3 - mais de 25% de blastos na medula óssea; 4 – menos que 5% de blastos na medula óssea ; 5 – entre 5 e 25% de blastos na medula óssea ; 6 – BCR/ABL

Nas ultimas três décadas, houve melhora significativa nos recursos terapêuticos para tratamento da LLA na infância, com chance de sobrevida em cinco anos superando 75% em alguns centros de referência. Entretanto, aproximadamente 25% destes indivíduos recaem da doença, sendo altamente refratários às terapêuticas atuais (CARROLL et al., 2003; PUI, 2006).

A descrição de diferentes translocações tem possibilitado melhor compreensão sobre a variabilidade das características celulares da LLA que regem o comportamento dessas células, e determinam a resistência a tratamentos clínicos (PEGAHI et al., 2005). A translocação *t*(12;21)(p13;q22) da fusão dos genes *TEL*-

AML1 está presente em 25% dos casos de LLA de células precursores de linfócitos B, a LLA mais freqüente na infância. Esse parece ser um ponto de partida para o desenvolvimento dos linfoblastos leucêmicos, visto que o gene *AML1* é essencial para hematopoiese (OKUDA et al., 1996), e o gene *TEL*, um importante regulador do desenvolvimento da célula hematopoiética (HOCK et al., 2004). A análise da translocação TEL-AML1 em células de cordão sugere que esta funciona como uma primeira mutação para os clones leucêmicos, com alteração dos reparos e propriedades de sobrevivência celular (HONG et al., 2008). Outras anormalidades cromossômicas foram associadas à pior evolução e sobrevida em LLA – B, como a amplificação intracromossomal do gene *AML1*(iAMP21) descrita em 1 a 2% dos casos de LLA, e rearranjos do gene *MLL* (leucemia de linhagem mista - em inglês *mixed lineage leukemia* – *MLL*) localizado no cromossomo 11q23, identificado em 5 a 8% das crianças com LLA, principalmente lactentes com menos de 12 meses de vida (VROOMAN; SILVERMAN, 2009).

Nas LLAs de células T, mais de 50% apresentam mutações que envolvem NOTCH1, gene que codifica um receptor transmembrana que regula o desenvolvimento normal das células T (WENG et al., 2004). As anormalidades citogenéticas, que envolvem o receptor de células T nos loci TCR-α/δ ou TCR-β, ocorrem presumidamente por um erro durante a tentativa de rearranjo de segmentos do gene (CAUWELIER et al., 2006). Outras translocações recorrentes incluem os genes *MYC*, *TAL1*, *TAL2*, *LYL1* e *bHLHB1* (básico *helix-loop-helix)*, genes ricos em cisteína (contendo domínio LIM) (*LMO2 e LMO1*), genes do domínio *homeo* (*HOX11/TLX1, HOX11L2/TLX3 ou o HOXA ou agrupamentos de* genes) ou como o mais recentemente descrito, o oncogene *MYB* (RUBNITZ; LOOK, 1998; CLAPPIER et al., 2007).

O estroma da medula óssea expressa proteínas que estão relacionadas com a propagação de metástases em outros cânceres (STETLER-STEVENSON et al., 1993), e que quando em excesso ou em desequilíbrio com seus inibidores naturais poderiam favorecer a expansão de células com alterações estruturais ou gênicas. Algumas proteínas de adesão celular, as metaloproteinases, por exemplo, vêm sendo estudadas por essa relação, mas a expressão destas em leucemias, principalmente nas LLAs da infância, ainda é pouco esclarecida (KUITTINEN et al., 2001, SCRIDELI et al., 2008)).

1.1.2 Metaloproteinases

Metaloproteinases de matriz (*matrix metalloproteinase*- MMP*)* compreendem uma família de endopeptidases extracelulares neutras, zinco (Zn^{2+}) e cálcio dependentes, hidrolíticas, que podem degradar vários componentes da matriz extracelular e da membrana basal (WOESSNER, 1991).

Expressam-se em todo organismo ou em tecidos específicos como enzimas intracelulares e intranucleares. Estão distribuídas no reino animal, dos mamíferos aos invertebrados, e desempenham importante papel em processos fisiológicos e patológicos múltiplos, incluindo o desenvolvimento embrionário, reparação celular, angiogênese, imunidade, inflamação, invasão tumoral e metastização. As MMPs participam do *turnover* da matriz extracelular no microambiente hematopoiético, da liberação de células tronco hematopoiéticas e de leucócitos maduros da medula óssea para o sangue periférico (WOESSNER, 1991; MATRISIAN 1992; STELER STEVESON et al., 1993; HEISSIG et al*.,* 2002*)*.

O substrato das MMPs inclue uma ampla variedade de proteínas, como as moléculas quimiotáxicas, moléculas de adesão, inibidores de proteinases, receptores de superfície celular, fatores de coagulação e fatores de crescimento (KLEIN et al*.*, 2004) .

As MMPs humanas podem ser classificadas de acordo com a estrutura primária, especificidade do substrato e localização celular dentro de diversas classes. Existem mais de 25 MMPs descritas, compreendidas em cinco classes: colagenases, gelatinases, estromalisinas, MMPs de membrana e novas MMPs (Tabela 2) (PENDÁS et al*.*, 1997; VISSE; NAGASE, 2003).

Tabela 2 - Grupos das MMPs listadas com seus nomes, sinônimos e substratos específicos (NAGASE, 2006; RA; PARKS, 2007).

Subgrupo MMP	Sinônimo comum	Substrato
Colagenases		
MMP-1	Colagenase intersticial	Colágeno (Col)-I-III, VII, VIII, X, XI, entactina, Ln, tenascina IGFBP-3, IL-1, vitronectina, fibronectina, fibrina, TNF-α, caseína
MMP-8	Colagenase neutrofílica	Col-I-III, caseina, C1, fibrina, substância P
MMP-13	Colagenase-3	Col-I-III, VI, IX, X, XIV, fibronectina, fibrilina, osteonectina, perlecan, Ln, α-2-M, caseina, C1, FXII, TNF-α
Gelatinases		
MMP-2	Gelatinase A	Col-I, III-V, VII, X, XI, condroitina, Fn, osteonectina, IGFBP-3, IL-1, decorina, elastina, fibrilina, fibulina, Ln, tenascina, vitronectina, fibrina, TGF-β, TNF-α, substância P, quinogênio
MMP-9	Gelatinase B	Col (I-IV), V, VI, XI, XIV, ICAM-1, IL-1, IL-2, TGF-β, decorina, elastina, fibrilina, Ln, osteonectina, vitrinectina, caseina, C1, fibrina
Estromelisinas		
MMP-3	Estromelisina-1	Col-III-V, VII, IX-XI, plasminogênio, IGFBP-3, IL-1, E-caderina decorina, elastina, fibrilina, Fn, Ln, osteonectina, tenascina, vitronectina, caseína, fibrina, TNF-α, Pn, substância P
MMP-10	Estromelisina-2	Col III-V, elastina, fibrinogênio, Ln, caseina, fibrina
Matrilisinas		
MMP-7	Matrilisina	Col-I, IV, Fn, Pn, osteonectina, IGFBP-3, E-caderina, TNF-α, EGFs decorina, elastina, fibulina, osteonectina, tenascina vitronectina, casein
MMP-26	Estromelisina-3	Col-V, Fn, fibrina, α-2-M
MMP-11	Endometase	IGFBP-1, α-2-M
Tipo-Membrana		
MMP-14	MT1-MMP	Col-I-II, CD44, Ln, mucina-1, fibrilina, fibronectina, vitronectina, FXII, fibrina, MMP-2, TNF-α
MMP-15	MT2-MMP	
MMP-16	MT3-MMP	Col-III, fibronectina, MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	
MMP-24	MT5-MMP	
MMP-25	MT6-MMP	
Outras		
MMP-12	Elastase macrofágica	Col-I, IV, elastina, fibrilina, fibronectina, Ln, plasminogênio, FXII
MMP-19	RASI-1	Col-I, IV, fibronectina, IGFBP-3, Ln, tenascina
MMP-20	Enamelisina	
MMP-21		
MMP-23	CA-MMP	
MMP-27		
MMP-28	Epilisina	
MMP-4, -5, -6 e -22 foram mais tarde identificadas como homólogas a outras MMPs; MMP-18 não foi descrita com expressão em humanos.		

Legenda: MMP - metaloproteinase; IL - interleucina; IGFBP - proteína ligadora ao fator de crescimento *insulin-like;* TGF - fator de crescimento transformante; TNF - fator de necrose tumoral.

1.1.2.1 Estrutura das MMPs

Todas são sintetizadas como pré pró enzimas e secretadas como pró MMP ou zimógenos (BARRETT et al., 1998), e são ativadas por clivagem do pró domínio N-terminal (CURRAN; MURRAY, 2000).

A estrutura primária das MMPs consiste de três regiões básicas: (1) domínio catalítico; (2) domínio amino-terminal; (3) e o domínio translacional (Figura 1) (KLEIN et al., 2004;). O primeiro acomoda um átomo de zinco no sítio ativo, é responsável por hidrólise de substratos e semelhante em todas as classes de MMPs. O segundo é também chamado de domínio propeptídio, composto de aproximadamente oitenta aminoácidos. É responsável pela latência da enzima, sendo removido quando a enzima é ativada. O resíduo de cisteína na seqüência de aminoácidos interage com o átomo de zinco catalítico no sítio ativo, impedindo a atividade da MMP. Para ativar a MMP, a interação zinco-cisteína tem que ser bloqueado na interação zinco-água (chamada de cisteína *switch*). In vitro, a ativação da MMP pode ocorrer por diferentes métodos: agentes modificadores do Thiol (acetato 4-aminofenilmercúrico, cloreto de mercúrio e N-etilmaleimide), glutationa oxidada, agentes caotrópicos, e oxigênios reativos (NAGASE, 1997; VISSE; NAGASE, 2003).

Os dois métodos mais comuns são o tratamento organomercurial com acetato de mercúrio 4-aminofenol e a proteólise. O tratamento organomercurial resulta na modificação da cisteína, com permanente interrupção da interação zinco-cisteína; e a proteólise resulta da remoção do domínio propeptídio, que contem o resíduo de cisteína, ativando a MMP (MORGUNOVA et al., 1999). O terceiro é o domínio translacional, peptídeo sinal que direciona o produto para secreção. A maioria das MMPs também possui um domínio C-terminal com uma sequência de homologia a hemopexina, apresenta-se numa estrutura de quatro hélices, com um disco que estrutura no meio o íon de cálcio, e apesar de contribuir com a especificidade do substrato e constituir um sítio de ligação para os inibidores teciduais, sua função ainda não é bem compreendida (OVERALL et al., 1999, PICCARD et al., 2007).

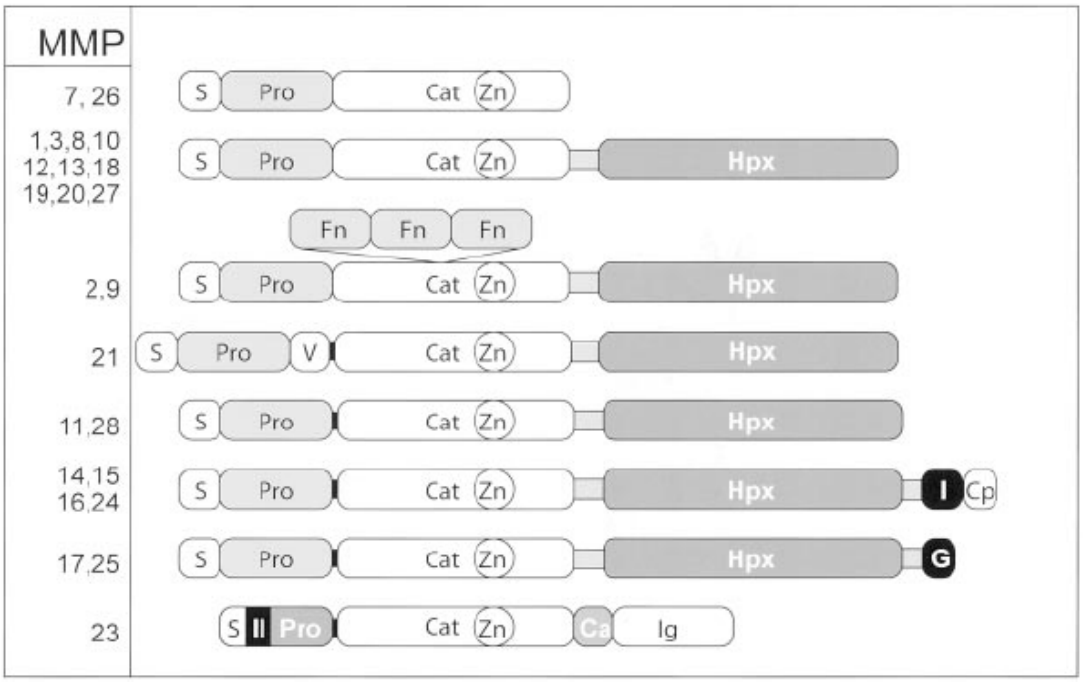

Figura 1 - Domínios estruturais das MMPs. As MMPs são classificadas dentro de subgrupos e dependendo das estruturas dos domínios e especificidade de substrato (http://www.circresaha.org) (VISSE; NAGASE, 2003).
Legenda: S - sinal peptídeo; Pro - propeptídeo; Cat - domínio catalítico; Zn - sítio ativo do zinco; Hpx - domínio hemopexina; Fn - domínio fibronectina; V - inserção vitronectina; I - domínio tipo 1 transmembrana; II - domínio tipo II transmembrana; G - "âncora" GPI; Cp - domínio citoplasmático; Ca - região de cisteína *array*; e Ig - domínio IgG-*like.*

1.1.2.2 Regulação das MMPs

As MMPs são proteínas altamente reguladas em três níveis diferentes de regulação: da transcrição, ativação das MMPs latentes e inibição das MMPs (CURRAN et al., 2000).

A regulação transcricional é a primeira etapa. Nem todas MMPs contem elementos transcricionais bem definidos, dentre elas a MMP-2. O nível basal de expressão gênica e a estabilidade do RNAm podem, em sua maioria, ser rapidamente modificados quando é solicitado um remodelamento extracelular. Essa modificação pode ocorrer por mudanças nos componentes da matriz extracelular, por fatores de crescimento ou citoquinas (RIES; PETRIDES, 1995).

Muitos genes de MMPs (MMP1, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12 e MMP13) podem ser induzidos por estímulos extracelulares que ativam um fator de

transcrição dimérico, o complexo AP1. Esse complexo, composto pelas proteínas JUN e FOS, liga-se ao promotor de MMPs no núcleo celular e ativa sua transcrição. A indução da expressão e atividade de AP1 são mediadas por três classes de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), ERKs, quinase do N-terminal de JUN ativada por estresse (JNK) e a de p38 (WESTERMARCK; KAHARI, 1999). A proteína quinase C (PKC) ativa a via de sinalização de ERK1/ERK2. Foi demonstrado que a super expressão de isoformas de PKC, tais como, PKCd, PKCę e PKCt, resultam na ativação do promotor de MMP1, e que a PKC também desempenha função importante na expressão de MMP-9 em células de gliomas malignos (YABKOWITZ et al., 1999).

Todas MMPs são secretadas como zimógenos inativos e são ativadas por clivagem do pró-domínio N-terminal. A maioria é ativada por tecidos ou por proteases do plasma sérico, como a plasmina. A seqüência de propeptídio é clivada no aminoácido alvo e então a ativação catalítica das MMPs é iniciada (CURRAN et al., 2000). Exceção a essa ativação são as MMPs do tipo membrana, que são ativadas antes de serem transportadas para superfície celular, e a pro-MMP-2 que perde o aminoácido alvo necessário para ser ativada por proteases séricas (ITOH et al., 2001).

As MMPs ativadas são capazes de ativar outros membros da família das MMPs. Por exemplo, a MMP-3 pode ativar a MMP-2, a MMP-9 e a MMP-7. As gelatinases, MMP-2 e MMP-9 podem ativar-se reciprocamente. A MMP-2 pode ser ativada por outras metaloproteinases, incluindo as MT-MMPs, que apresentam a capacidade de ativar à pro-MMP-2 (Figura 2) (OKADA et al., 1990; MAQUOI et al., 1998).

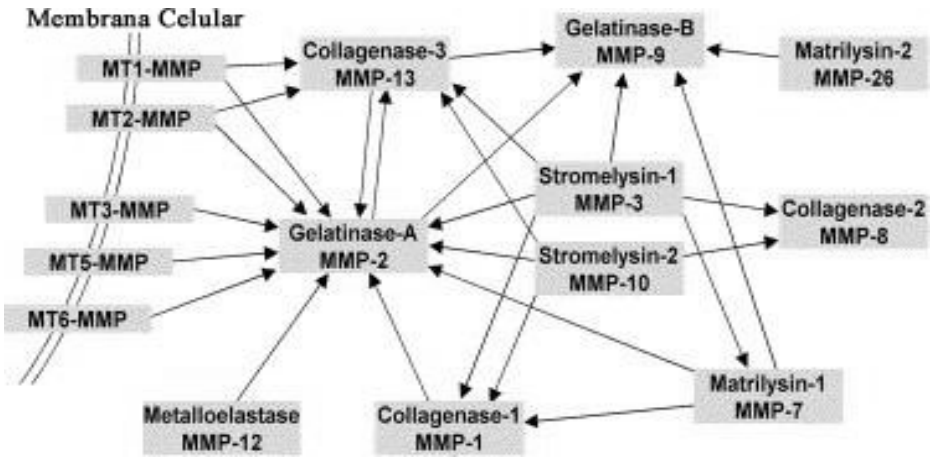

Figura 2 - Capacidade de ativação recíproca das MMPs na superfície celular.
Legenda: MT1-MMP = MMP14. MMP-2 é a metaloproteinase, mais, ativada pelas outras MMPs.

Três mecanismos foram descritos para explicar a ativação da proMMP-2: ativação autocatalítica, ativação dependente de TIMP-2 (inibidor tecidual das metaloproteinases – TIMP) e ativação dependente do sistema plasmina/plasminogênio tipo uroquinase associado a superfície celular (OVERALL et al., 2000). Os mecanismos diferem, mas têm uma característica em comum, pois envolvem processos de ativação da proMMP-2 para uma forma intermediária, depois para a MMP-2. O mecanismo via TIMP-2 para ativação da pro-MMP-2 envolve uma formação complexa entre MMP-14/TIMP-2/MMP-2, onde a TIMP-2 livre da MMP-14 é eventualmente responsável pela clivagem do propeptídeo (ITOH et al., 2001), modificando a idéia de que as TIMPs eram meramente inibidores das MMPs. Assim, foi demonstrado que uma parcela da TIMP-2 é obrigatória para ativação da MMP-2, e o desbalanço na relação MMP-14/TIMP-2 em outra direção pode levar a diminuição da ativação da MMP-2.

A terceira forma de regulação das MMPs é através dos inibidores endógenos naturais, sendo os mais comuns as α-macroglobulinas e os inibidores teciduais das MMPs (TIMP). Foram identificadas quatro TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4), com distribuição tecidual diversa e com função inibitória eficiente e reversível da atividade enzimática das MMPs, diferindo entre elas na forma de inibição contra as diferentes MMPs (NAGASE; VISSE, 2006), apresentando ainda influência na angiogênese e crescimento tumoral através da inibição das MMPs, ativação da MMP-2, redução do crescimento celular e indução da apoptose (GIAVAZZI; TARABOLETTI, 2001; ITOH et al., 2001).

1.1.2.3 MMP e o Câncer

Evidências do papel das MMPs no câncer foram descritas no estudo com ratos com a redução da MMP-2 e a diminuição do crescimento tumoral (ITOH *et al*., 1998). Existem diversos relatos de tumores sólidos em adultos relacionando o crescimento tumoral, metástase e prognóstico com as MMPs (NELSON et al., 2000 GIAVAZZI, 2001, PAUPERT et al., 2008; HU et al., 2009). Há estudos que demonstram a maior expressão de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP em pacientes com neoplasia maligna que naqueles com tumores benignos, além de haver associação

dos altos níveis destas MMPs com pior prognóstico e fenótipo mais agressivo (DAVIDSON et al., 1999; MYLONA et al., 2007; SHIM et al., 2007).

Graças à capacidade das MMPs de degradação da matriz extracelular, ocorre a migração das células endoteliais e células tumorais, que perdem o contato célula-matriz e célula-célula, com a liberação de fatores de crescimento da matriz extracelular (MEC) e complexos inativados, que clivam os receptores dos fatores de crescimento e os ativam, com excreção de pré-pró-enzimas, como o fator de crescimento transformado (TGF-α, TGF-β, fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), fator de crescimento insulina *like* (IGF) e receptor de crescimento de fibroblastos (FGRF)-1 (LEVI et al., 1996; YU; HAN, 2006).

Como as MMPs estão envolvidas em várias etapas pré-cancerígenas, não é surpresa que elas afetem também as etapas finais, como na evasão de células de carcinoma do sítio primário (DUFFY et al., 2008). Sozinhas estas células não sobreviveriam na circulação sem o contato com células adjacentes ou estroma, e somente pequena fração delas estaria apta a desenvolver o tumor em outros sítios (MARTH et al., 2002). É sugerido que a mudança no perfil da expressão das MMPs e TIMPs em células metastáticas parece afetar este processo quando comparadas com células do tumor primário (ITO et al., 2003).

1.1.2.4 O Papel das MMPs em Leucemia Linfóide Aguda

Essa hipótese tem sido estudada pelo papel das MMP-2 e -9 e MMP-14 na angiogênese tumoral. A MMP-2 é expressa em linhagens celulares linfoblásticas correlacionadas com habilidade para invadir a matrigel *in vitro* e com a capacidade de metastizar em modelo animal (HENDRIX et al., 1992). A expressão da MMP-9 em células linfoblásticas foi descrita em linfomas de Burkitt implantados com esta MMP e maior possibilidade de invasão do sistema nervoso central e de metástases em modelos de ratos.

Poucos ensaios clínicos têm sido feitos para estudar a expressão de MMP na LLA em humanos. Kuittinen et al. (2001) demonstrou uma diferente expressão entre adultos e crianças com LLA, enquanto os adultos apresentaram 65 e 25% para

expressão de MMP-2 e MMP-9 respectivamente, houve 12.7% com reação positiva para blastos para expressão de ambas MMPs nos casos pediátricos.

Em estudo por RQ-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) realizado com células blásticas da medula óssea (MO) de134 pacientes pediátricos com LLA foi sugerido que o perfil de hiper expressão dos genes da MMP-2 e da TIMP-2 poderia estar associado com LLA-T, e a co-expressão de MMP2/MMP9 associada com mais de 25% de blastos na medula óssea do D14 (indução), mais de 5% no D28 e LLA-T, apesar de não haver relação com sobrevida livre de doença (SCRIDELI et al., 2008).

As outras MMPs e TIMPs são pouco ou ainda não foram estudadas em LLA, apesar de vários trabalhos sugerirem alteração na expressão delas em outros cânceres (Tabela 3).

Tabela 3 - Exemplos da relação das MMPs e TIMPs com neoplasias

MMP/TIMP	***Tipo de cancer***
MMP-1	Carcinoma de cabeça e pescoço (POLETTE et al., 1991*)
	Carcinoma de pele (GRAY, 1992*)
	Carcinoma de cólon intestinal (D'ERRICO et al., 1991*)
MMP-2	Câncer de mama (TALVENSAARI-MATTILA et al., 1999*)
	Carcinoma de cólon (BODEY et al., 2000*)
	Melanoma (HOFMANN et al., 2000*)
MMP-3	Carcinoma de cabeça e pescoço (MULLER et al., 1991*)
	Carcinoma de pele (TSUKIFUJI et al., 1997*)
	Neoplasia de cérebro (NAKANO et al., 1993*)
MMP-7	Carcinoma de cabeça e pescoço (MULLER et al., 1991*)
	Carcinoma de pulmão (MULLER et al., 1991*)
MMP-14	Carcinoma de pulmão (TOKURAKU et al., 1995*)
	Carcinoma de tireóide (NAKAMURA et al, 1999*)
	Neoplasia de cérebro (YAMAMOTO et al., 1996*)
	Carcinoma de cólon intestinal (OHTANI et al., 1996*)
	Leucemia mielóide aguda (SHIRVAIKAR et al., 2008*)
TIMP-2	Câncer de mama (REMACLE et al., 2000*)
	Câncer de ovário (SAKATA, et al.,2000*)
TIMP-3	Carcinoma colo retal (POWE et al., 1997*)
	Câncer de mama (URIA et al., 1994*)
TIMP-4	Gliomas (GROFT et al., 2001*)
	Câncer cervical (LIZARRAGA, 2005*)
	Carcinoma de células renais (HAGENANN et al., 2001*)

Legenda : * - artigos que descreveram a relação da metaloproteinase com o câncer.

1.2 Justificativa

A leucemia linfóide aguda é a neoplasia mais freqüente na infância, e apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticos, em torno de 25% dos casos há recaída da doença.

Descobrir outros fatores prognósticos e a utilização da terapia gênica são necessidades na realidade atual da LLA.

Neste estudo analisaremos as células blásticas da medula óssea de pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda através da expressão dos genes das MMPs: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-14 (MT1-MMP) e TIMPs (TIMP2, TIMP3 e TIMP4), de acordo com a linhagem linfóide, T ou B, e variáveis clínicas de prognóstico.

1.3 Objetivos

Analisar a expressão dos genes da MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-14, TIMP-2, TIMP-3 E TIMP-4 por RQ-PCR nas células blásticas da medula óssea de pacientes pediátricos com LLA-T e LLA-B.

Correlacionar variáveis clínicas ao diagnóstico, perfil citogenético e sobrevida com a intensidade de expressão dos genes acima citados isoladamente e com suas razões de expressão.

2 METODOLOGIA

2.1 Casuística

Foram analisadas amostras de RNA da medula óssea do diagnóstico de 29 pacientes pediátricos com LLA que estavam congelados (- 80°C) e armazenados no banco de medula óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**.** O diagnóstico seguiu critérios morfológicos e citoquímicos e foram confirmados por imunofenotipagem utilizando painel de anticorpos monoclonais do Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, sendo classificados em LLA pré B, pré pré B (pro B), B madura e LLA-T.

As amostras fizeram parte do projeto de pesquisa "PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DA CRIANÇA ASSOCIADA À RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA", que foi aprovado pelo Comitê de Ética, bem como o termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sob registro no CEP 8681/2001, e através do processo n° 021533/2002-26, parecer n° 1164/2002 (ANEXO A).

Critérios de inclusão:

a. Amostras de RNA de medula óssea de paciente menor de 18 anos, com diagnóstico de LLA confirmado por imunofenotipagem e análise morfológica do esfregaço de medula óssea, inserido no GBTLI 99, e no trabalho descrito acima, o qual foi previamente aprovado pelo comitê de ética.

Critérios de exclusão:

a. Amostras de medula óssea de pacientes com LLA que não estivessem armazenadas de maneira adequada, no banco de medula óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**.**

Foram analisadas quatorze amostras de medula óssea de LLA de células T e quinze de LLA de células B (consecutivas) colhidas ao diagnóstico.

Os dados referentes às variáveis clínicas e laboratoriais de prognóstico foram coletados através de informações atualizadas do GBTLI. As variáveis utilizadas foram:

Idade ao diagnóstico

1 - > que 1 ano e < que 9 anos

2 - < que 1 ano e > que 9 anos

Glóbulos brancos (GB) ao diagnóstico

1- < que 50.000

2 - ≥ que 50.000

GB no dia 7 da indução quimioterápica (D7)

1 - < que 5000

2 - > que 5000

Medula óssea no D14 (Mod14)

1 – M1 ou M2

2 – M3

Mod28

1 - menos que 5% de blatos

2 - mais que 5% de blastos

Resposta ao tratamento (quimioterapia de indução)

1- Boa

2- Ruim

Grupo de risco de recaída

1- Alto risco (AR)

2- Risco Básico (RB)

Calla (apresenta antígeno CD10 – leucemia comum- nos blastos)

1 - Calla +

2 - Calla -

LLA de células T

1 - negativo

2 - positivo

Citogenética (presença de translocações cromossômicas)

1 - Bom prognóstico t(4;11) e t(12;21)

2 - Mau prognóstico t(9,21)

Invasão de SNC

1- Presente

2- Ausente

Sobrevida Livre de eventos (SLE) ou status

1 - sem eventos (em remissão completa)

2 - com eventos (recaída ou óbito)

2.2 Métodos

Células de medula óssea foram coletadas de pacientes com menos de 18 anos de idade ao diagnóstico. Foi realizada a separação por centrifugação em gradiente de *Ficoll-Hypaque* de densidade 1077g/ml, em baixa densidade. O plasma foi retirado (fase superior) e a fase sedimentada das hemácias e granulócitos foi utilizada para extração do RNA.

Procedeu-se à extração do RNA das amostras armazenadas em Trizol®, conforme protocolo (ANEXO B). O RNA extraído foi quantificado por espectofotometria a 260 nm (Eppendorf® BioPhotometer Plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) e posteriormente verificado sua qualidade por meio de corrida em gel de agarose a 1,2% (ANEXO C). Posteriormente foi produzido o DNA complementar (cDNA) utilizando-se o protocolo da transcriptase reversa e este foi diluído para a utilização no aparelho de RQ-PCR (ANEXO D). A expressão dos genes das MMP-1, MMP-2, MMP-3, MT1-MMP, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 em células da medula óssea foi avaliada diretamente pela quantificação da expressão do RNA mensageiro por PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500 RT-PCR System, São Paulo, SP).

Para o RQ-PCR, foram utilizadas sondas Taqman® (ANEXO E) para MMP-1 humana [referência: Hs_00233958_m1], MMP-2 humana [referência: Hs_01548733_m1], MMP-3 humana [referência: Hs_00233962_m1], MT1-MMP humana [referência: Hs_00237119_m1], TIMP2 humana [referência: Hs_01079206_s1], TIMP3 humana [referência: Hs_00165949_m1] e TIMP4 humana [referência: Hs_00162784_m1] (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) e

controle endógeno GUS-beta [*Reporter*: FAM] (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) (ANEXO E). Todas as análises foram feitas em duplicata. O cálculo das expressões gênicas foi feito pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito previamente (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O calibrador foi escolhido de cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de linhagem de leucemia linfóide aguda, LUCENA 1, derivada da linhagem eritro-leucêmica K562, resistente ao alcalóide da Vinca e a antracíclicos, que expressava todos os genes citados e o controle GUS-beta, exceto a MMP-3. Esta escolha foi feita após teste de expressão para outros calibradores, como medulas ósseas normais de crianças, linhagem de LLA K562, linhagens de tumores de sistema nervoso central, e tecido de placenta. Apenas as linhagens de tumores de glioblastoma, U87 e T98G, expressavam a MMP-3.

O resultado é expresso em unidades arbitrárias, devendo ser interpretado como a quantidade de vezes que o gene de interesse encontra-se expresso em relação ao controle endógeno e em relação ao calibrador (Linhagem Lucena). O controle endógeno (Gus-beta) é um gene cuja expressão permanece constante na presença de estados mórbidos.

2.3 Análise Estatística

Os resultados estão expressos como mediana (variação) ou número de casos.

Foram feitas comparações entre expressão gênica de cada MMP e TIMP com as variáveis de prognóstico separadamente.

As análises foram feitas de duas formas distintas: a primeira utilizou os valores absolutos da expressão gênica para comparação (variável continua); a segunda foi realizada através da expressão relativa dos genes das MMPs e TIMPs, dividida arbitrariamente em dois grupos, definidos como de baixa expressão (valores menores ou iguais a mediana) ou de alta expressão (valores maiores que a mediana) (variável categórica ou nominal).

Para as variáveis contínuas foi utilizado o teste de Mann-Whitney (teste não paramétrico), e para as variáveis categóricas o teste exato de Fisher.

Realizado o intervalo de confiança (IC) entre a expressão de cada gene e variáveis de prognóstico, como também a razão de chance (*odds ratio* - OR).

Testes de correlação entre duas variáveis contínuas foram feitos pelo coeficiente de correlação de Spearman para avaliar associação entre expressão gênica das MMP2 e MMP14 com TIMP2.

A análise de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier, apresentada em curvas e gráficos.

Foram utilizados os programas estatísticos do SPSS® 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e considerados significantes os resultados quando $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Dados epidemiológicos

Determinamos a associação entre a expressão dos genes da MMP1, MMP2, MMP3, MMP14, TIMP2, TIMP3, TIMP4 e a razão MMP2/MMP14, MMP2/TIMP2 e MMP14/TIMP2 com as variáveis clínicas e laboratoriais de 29 pacientes, de acordo com idade e contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico (GB), grupo de risco de recaída (baixo e alto risco), imunofenotipagem [como LLA de células T (LLA-T) ou de células B (LLA-B)], resposta ao tratamento (resposta à quimioterapia de indução: bons e maus respondedores), envolvimento do SNC e status (em remissão completa ou com evento desfavavorável – morte ou recaída).

Alguns dados clínicos não foram obtidos por ausência da informação no banco de dados do GBTLI: Medula óssea (MOD14) no dia 14 da indução de 04 pacientes, MOD28 de 01 paciente, resposta ao tratamento de 02 pacientes e citogenética de 03 pacientes.

Os resultados sobre os critérios iniciais para classificação do risco de recaída evidenciaram que os pacientes com LLA-T apresentavam maiores médias de idade (10,71 anos versus 6,12 anos) e glóbulos brancos (260.650 células/dl versus 34.073 células/dl) ao diagnóstico que aqueles com LLA-B. Por conseguinte, o risco de recaída sugere ser maior nos casos de LLA-T, com sobrevida livre de eventos menor (64.3 ±7.1% versus 93.3 ±3.9%, p=0.06) (Tabela 4) (Figura 3).

Três pacientes tiveram mais de 5000/dl glóbulos brancos no sétimo dia da indução (D7), dois pacientes apresentaram medulas ósseas no D14 como M3, e um possuía MO com mais de 5% de blastos no D28.

A infiltração de SNC esteve presente em um paciente com LLA-T.

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes portadores de LLA segundo variáveis clínicas, tipo de linfoblastos e perfil citogenético.

		LLA-T (n:14) **Frequencia % (nº Absoluto)**	***LLA-B (n:15)*** **Frequencia % (nº Absoluto)**
Idade	1-9 anos (n:16)	35,7 (5)	73,3 (11)
	≥ 9 anos (n:13)	64,3 (9)	26,7 (4)
GB *[1]	<50,000/dL (n:15)	28,6 (4)	73,3 (11)
	>50,000/dL (n:14)	71,4 (10)	26,7 (4)
Grupo de risco	Baixo (n:8)	14,3 (2)	40 (6)
de recaída	Alto (n:21)	85,7 (12)	60 (9)
GB no D7	<5000/dl (n:26) Grupo1	85,7 (12)	93,3 (14)
	>5000/dl (n:3) Grupo 2	14,3 (2)	6,7 (1)
MO*[2] no D14	M1 (n:23)	90 (9)	93,3 (14)
	M2 ou M3 (n:2)	10 (1)	6,7 (1)
MO*[3] no D28	<5% de blastos (n:27)	92,3 (12)	100 (15)
	≥5% de blastos (n:1)	7,6 (1)	-
Resposta*[4]	Boa (n:22)	75 (9)	86,7 (13)
	Ruim (n:5)	25 (3)	13,3 (2)
Citogenética	Favorável (n:25)	100 (11)	93,3 (14)
	Desfavorável (n:1)	-	6,7 (1)
Envolvimento	<5blastos/mm^3 (n:28)	92,9 (13)	100 (15)
SNC*[5]	≥5blastos/mm^3 (n:1)	7,1 (1)	
Status*[6]	Remissão completa (n:23)	64,3 (9)	93,3 (14)
	Recída/óbito(n:6)	35,7 (5)	6,7 (1)
Sobrevida*[7]	Meses (média)	40,28	66,66

Legenda: *1 - glóbulos brancos ao diagnóstico; *2 – medula óssea analisada morfologicamente no 14º dia de indução quimioterápica;*3 - medula óssea analisada morfologicamente no 28º dia de indução quimioterápica *4 - Resposta à quimioterapia de indução no 28º dia; *5 – sistema nervoso central; *6 – Situação clínica até setembro-2008; *7 – sobrevida livre de eventos.

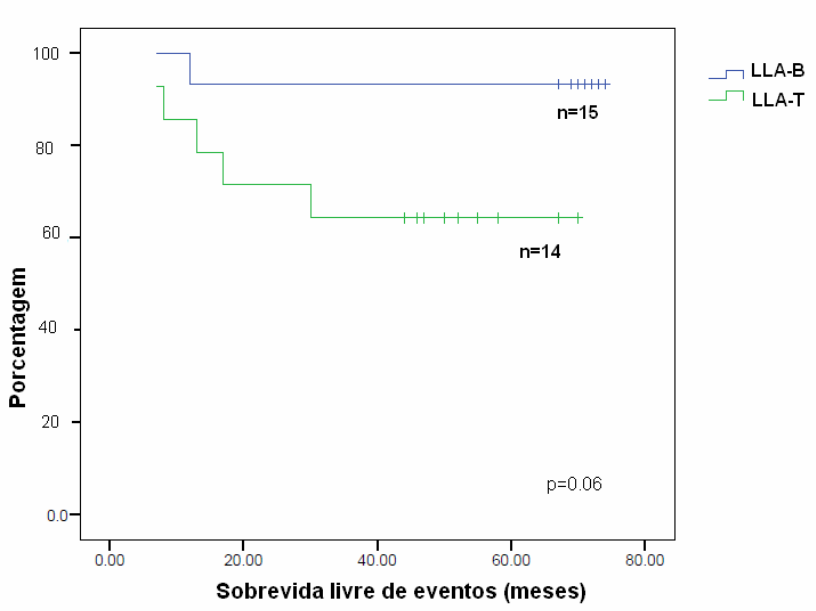

Figura 3 - Sobrevida livre de eventos em crianças com LLA-B e -T
Legenda: Porcentagem de sobrevida livre de eventos versus valor absoluto em meses.

3.2 Análise das variáveis relacionadas com a expressão gênica

Foram correlacionadas as expressões dos genes com as variáveis clínicas e laboratoriais de prognóstico na LLA, entretanto o gene da MMP3 não esteve expresso em nenhuma das amostras estudadas. A expressão do RNAm da MMP1 não foi detectada em 27/29 (93.1%) amostras analisadas, da MMP2 em 21/29 (72.4%), MMP14 em 4/29 (13.8%), TIMP2 em 1/29 (3.4%), TIMP3 em 11/29 (37.9%) e TIMP4 em 21/29 (72.4%).

A variável idade ao diagnóstico não se relacionou com nenhum dos genes analisados isoladamente.

Quanto à variável da imunofenotipagem, foi observado que MMP14 esteve mais expressa nos casos de LLA-B que os LLA-T (*OR*: 0.09; 95% IC: 0.01-0.55; *p* = 0.01) (Figura 4), enquanto a TIMP2 esteve relacionada com LLA-T (*OR*: 9.16; 95% IC: 1.63-51.4; *p* =0.001) (Figura 5), quando analisados pelos testes de Fisher (Tabela 5 e 6) e Mann-Whitney (Tabela 7 e 8).

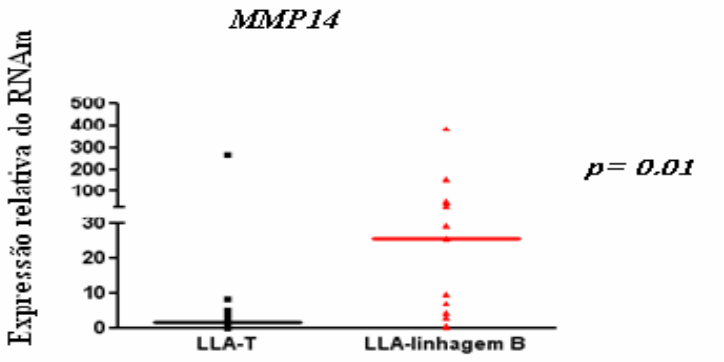

Figura 4 - Nível de expressão relativa de RNAm da MMP14 na medula óssea de 15 crianças com LLA-B e 14 com LLA-T.
Legenda: Os valores da mediana estão representados pelas linhas vermelha e preta em negrito.

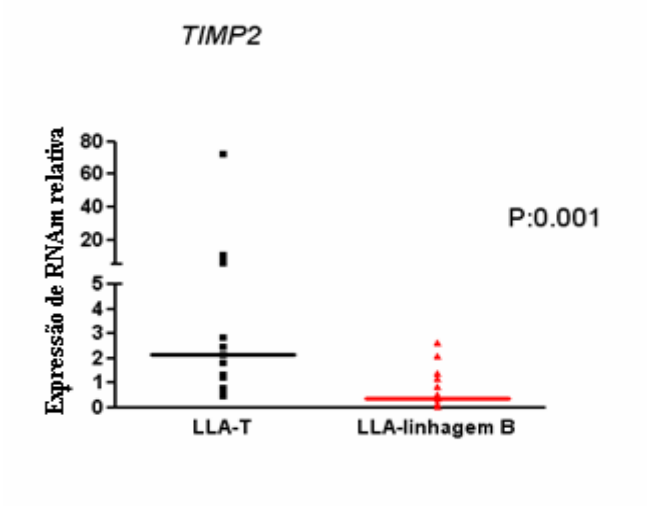

Figura 5 - Expressão relativa de RNAm de TIMP2 na medula óssea de pacientes pediátricos com LLA – T e – B.

Legenda: os valores da mediana estão representados pelas linhas vermelha e preta na horizontal em negrito. TIMP2 mais expressa nas amostras de LLA-T analisadas.

Tabela 5 - Análise de variáveis clínicas com expressão das MMPs utilizando o teste de Fisher (valor de *p*), o *odds ratio* (*OR*) e intervalo de confiança de 95%.

		MMP1		***MMP2***		***MMP14***	
		***OR* (95%IC)**	**P**	***OR* (95%IC)**	**P**	***OR* (95%IC)**	**P**
Idade	1-9 anos (n:16)	***	0.48	***	0.23	***	0.13
	≥ 9 anos (n:13)	0.87(0.72-1.0)		3.0(0.56-16.95)		0.26(0.05-1.26)	
GB[1]	<50.000/dL (n:15)	***	1.00	***	1.00	***	0.27
	>50.000/dL (n:14)	1.00(0.06-19.0)		1.00(0.19-5.15)		0.37(0.08-1.66)	
GB D7	>5.000/dl		1.00		1.00		0.59
	<5.000/dl	0.92(0.82-1.03)		1.28(0.1-16.5)		2.33(0.18-29.03)	
MO D14*[2]	M1 ou M2		0.08		0.25		1.00
	M3	2.00(0.5-7.99)		0.21(0.10-0.47)		1.09(0.06-19.6)	
MO D28*[3]	>5% blastos		1.00		-		1.00
	<5% blastos	0.92(0.83-1.03)		-		0.51(0.36-0.74)	
Risco de recaída	Baixo (n:8)	***	1.00	***	0.37	***	0.10
	Alto (n:21)	1.1(0.96-1.27)		3.76(0.38-37.1)		0.20(0.03-1.27)	
Imunofenotipagem	Linhagem B (n:15)	***	1.00	***	0.41	***	**0.009**
	LLA-T (n:14)	1.00(0.06-19.0)		2.5(0.46-13.5)		0.09(0.01-0.55)	
Citogenética	Favorável		1.00		1.00		1.00
	Desfavorável	0.96(0.88-1.04)		0.66(0.50-0.88)		0.52(0.35-0.75)	
Resposta *[4]	Boa(n:22)	***	0.18	***	0.37	***	0.64
	Ruim (n:5)	1.25(0.8-1.93)		3.40(0.37-30.6)		1.80(0.24-12.98)	
Infiltração SNC*[5]	<5blastos/mm^3 (n:28)	***	0.06	***	1.00	***	1.00
	≥5blastos/mm^3 (n:1)	0.03(0.005-0.2)		0.70(0.55-0.89)		0.50(0.34-0.72)	
Status*[6]	RC* [7](n:23)	***	0.37	***	0.28	***	0.16
	Recaída/obito (n:6)	4.4(0.23-82.9)		0.65(0.48-0.87)		0.15(0.01-1.53)	

Legenda: *1 - glóbulos brancos ao diagnóstico; *2 – medula óssea analisada morfologicamente no 14^0 dia de indução quimioterápica;*3 - medula óssea analisada morfologicamente no 28^0 dia de indução quimioterápica *4 - Resposta à quimioterapia de indução no 28^0 dia; *5 – sistema nervoso central; *6 – Situação clínica até setembro-2008; *7 – Remissão completa; *** com base no valor de referência (1.00).

Os glóbulos brancos (GB) acima de 50.000/dl ao diagnóstico se correlacionaram com maior expressão do RNAm da TIMP2, segundo análise pelo teste de Mann-Whitney (Tabela 8).

Não se observou diferença estatisticamente significativa na expressão da MMP2 e TIMP4 entre as LLAs T e B, e nas demais variáveis estudadas.

Dezoito dos vinte e nove pacientes (62%) expressaram a TIMP3. Todos os cinco casos analisados que apresentaram má resposta à quimioterapia de indução também tiveram hiperexpressão do gene da TIMP3, segundo análise por Teste exato de Fisher, com significância estatística (p = 0.01) (Tabela 6 e Figura 6).

Tabela 6 - Análise de variáveis clínicas com expressão das TIMPs utilizando o teste de Fisher (valor de *p*), *odds ratio* (*OR*) e intervalo de confiança de 95%.

		TIMP2		***TIMP3***		***TIMP4***	
		***OR* (95%IC)**	***P***	***OR* (95%IC)**	***P***	***OR* (95%IC)**	***P***
Idade	1-9 anos (n:16)	***	1.00	***	0.71	***	1.00
	≥ 9 anos (n:13)	1.00(0.22-4.46)		1.50(0.34-6.53)		0.90(0.16-5.00)	
GB*[1]	<50.000/dL (n:15)	***	0.25	***	0.27	***	0.68
	>50.000/dL (n:14)	3.24(0.69-15.2)		0.37(0.08-1.66)		1.60(0.28-8.90)	
GB D7	>5.000/dl		0.22		0.10		1.00
	<5.000/dl	0.44(0.28-0.68)		0.42(0.27-0.66)		1.66(1.12-21.73)	
MOD14*[2]	M1 ou M2		0.45		0.18		1.00
	M3	0.43(0.27-0.69)		0.39(0.23-0.65)		0.78(0.63-0.97)	
MOD28*[3]	>5% blastos		-		0.46		1.00
	<5% blastos	-		0.44(0.29-0.67)		0.74(0.59-0.92)	
Risco de recaída	Baixo (n:8)	***	0.67	***	1.00	***	1.00
	Alto (n:21)	2.03(0.37-10.9)		0.90(0.17-4.63)		0.93(0.14-6.20)	
Imunofenotipagem	Linhagem B (n:15)	***	**0.02**	***	1.00	***	0.68
	LLA-T (n:14)	**9.16(1.63-51.4)**		1.14(0.26-4.91)		1.60(0.28-8.90)	
Citogenética	Favorável		1.00		0.46		1.00
	Desfavorável	0.50(0.33-0.74)		0.44(0.28-0.68)		0.76(0.61-0.94)	
Resposta* [4]	Boa(n:22)	***	0.09	***	**0.01**	***	1.00
	Ruim (n:5)	0.40(0.24-0.67)		0.36(0.20-0.63)		0.85(0.07-9.44)	
Infiltração SNC*[5]	<5blastos/mm^3 (n:28)	***	1.00	***	1.00	***	0.24
	≥5blastos/mm^3 (n:1)	0.48(0.32-0.71)		0.5(0.34-0.72)		0.21(0.10-0.43)	
Status*[6]	RC *[7](n:23)	***	1.00	***	0.65	***	0.61
	Recaída/obito (n:6)	1.63(0.22-11.7)		0.45(0.07-3.01)		1.80(0.25-12.8)	

Legenda: *1 - glóbulos brancos ao diagnóstico; *2 – medula óssea analisada morfologicamente no 14^0 dia de indução quimioterápica;*3 - medula óssea analisada morfologicamente no 28^0 dia de indução quimioterápica *4 - Resposta à quimioterapia de indução no 28^0 dia; *5 – sistema nervoso central; *6 – Situação clínica até setembro-2008; *7 – Remissão completa; *** com base no valor de referência (1.00).

Tabela 7 - Avaliação das variáveis clínicas com a expressão das MMPs e suas medianas, com valor mínimo e máximo. Utilizado teste de Mann-Whitney (*p).*

		MMP1		***MMP2***		***MMP14***	
		Mediana*	***P***	**Mediana**	***p***	**Mediana**	***P***
Idade	1-9 anos (n:16)	0.0(0.0-2.6)	0.19	0.0(0.0-19.81)	0.25	7.67(0.0-158.3)	0.29
	≥ 9 anos (n:13)	0.0(0.0-0.0)		0.0(0.0-26.57)		1.92(0.0-387.3)	
GB[1]	<50,000/dL (n:15)	0.0(0.0-2.6)	1.00	0.0(0.0-19.81)	0.95	6.98(0.0-158.3)	0.21
	>50,000/dL (n:14)	0.0(0.0-2.11)		0.0(0.0-26.57)		1.13(0.0-387.3)	
Risco de recaída	Baixo (n:8)	0.0(0.0-0.0)	0.37	0.0(0.0-19.81)	0.32	17(2.81-158.3)	0.06
	Alto (n:21)	0.0(0.0-2.6)		0.0(0.0-26.57)		1.92(0.0-387.3)	
Imunofenotipagem	Linhagem B (n:15)	0.0(0.0-2.6)	1.00	0.0(0.0-0.72)	0.21	25.8(0.0-387.3)	**0.01**
	LLA-T (n:14)	0.0(0.0-2.11)		0.0(0.0-26.5)		1.61(0.0-272.0)	
Resposta [2]	Boa(n:22)	0.0(0.0-0.0)	**0.03**	0.0(0.0-0.09)	0.12	2.98(0.0-387.3)	0.31
	Ruim (n:5)	0.0(0.0-2.6)		0.36(0.0-26.5)		4.07(1.03-272)	
Status	RC [3](n:23)	0.0(0.0-2.6)	0.32	0.0(0.0-26.5)	0.13	4.78(0.0-272.0)	0.28
	Recaída/obito (n:6)	0.0(0.0-2.11)		0.0(0.0-0.0)		1.61(0.0-387.3)	

Legenda: *Mediana referente às unidades arbitrárias do RQ-PCR; 1 – Glóbulos Brancos ao diagnóstico 2 – Resposta ao tra tamento quimioterápico da indução; 3 – Remissão completa;

Tabela 8 - Avaliação das variáveis clínicas com a expressão das TIMPs e suas medianas, com valor mínimo e máximo. Utilizado teste de Mann-Whitney (*p).*

		TIMP2		***TIMP3***		***TIMP4***	
		Mediana*	***P***	**Mediana**	***P***	**Mediana**	***P***
Idade	1-9 anos (n:16)	1.00(0.0-72.2)	0.48	1.2(0.0-338)	0.65	0.0(0.0-0.095)	0.61
	≥ 9 anos (n:13)	1.00(0.01-10.4)		2.45(0.0-223)		0.0(0.0-0.16)	
GB [1]	<50,000/dL (n:15)	0.65(0.0-2.1)	**0.02**	2.45(0.0-338)	0.43	0.0(0.0-0.095)	0.37
	>50,000/dL (n:14)	2.3(0.04-72.2)		0.76(0.0-223)		0.0(0.0-0.16)	
Risco de recaída	Baixo (n:8)	0.67(0.0-2.1)	0.26	2.54(0.0-338)	0.59	0.0(0.0-0.095)	0.85
	Alto (n:21)	1.21(0.0-72.2)		1.27(0.0-223)		0.0(0.0-0.16)	
Imunofenotipagem	Linhagem B (n:15)	0.35(0.0-2.63)	**0.001**	1.27(0.0-60.3)	0.56	0.0(0.0-0.095)	0.34
	LLA-T (n:14)	2.15(0.48-72.2)		1.64(0.0-338)		0.0(0.0-0.16)	
Resposta [2]	Boa(n:22)	0.68(0.0-72.2)	0.17	0.41(0.0-223)	0.10	0.0(0.0-0.16)	0.87
	Ruim (n:5)	1.36(0.48-6.30)		2.57(0.69-338)		0.0(0.0-0.11)	
Status	RC [3](n:23)	0.82(0.0-72.2)	0.41	2.26(0.0-338)	0.24	0.0(0.0-0.16)	0.73
	Recaída/obito (n:6)	2.15(0.45-2.84)		0.34(0.0-4.63)		0.0(0.0-0.11)	

Legenda: *Mediana referente às unidades arbitrárias do RQ-PCR; 1 – Glóbulos Brancos ao diagnóstico; 2 – Resposta ao tratamento quimioterápico da indução; 3 – Remissão completa;

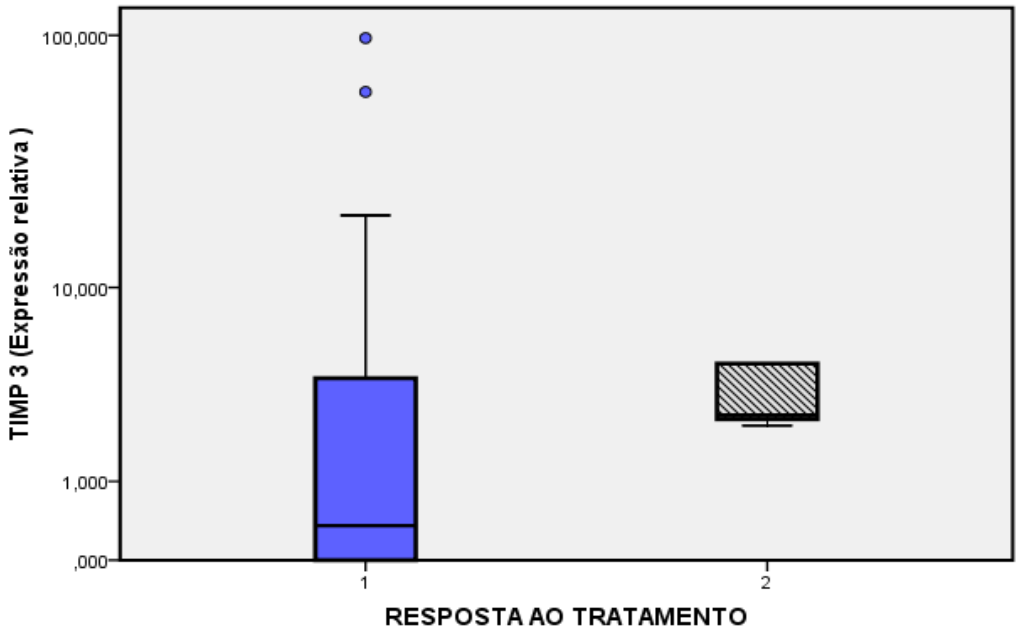

FIGURA 6 - RELAÇÃO TIMP3 ELEVADA COM MÁ RESPOSTA AO TRATAMENTO

Legenda: Resposta 1 - boa resposta ao tratamento quimioterápico; Resposta 2 - má resposta ao tratamento quimioterápico. Valores da expressão RNAm da TIMP3 foram transformados para escala logarítimica para melhor visualização dos dados .

A avaliação pelo teste de Mann- Whitney apontou para relação entre má resposta ao tratamento quimioterápico e expressão acima da mediana do gene MMP1 (Tabela 7). Entretanto, a incidência foi em dois dos 29 casos estudados.

Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a expressão dos genes estudados e suas razões (MMP2/MMP14, MMP2/TIMP2 e MMP14/TIMP2) (correlação de Spearman). Porém a expressão da MMP14/TIMP2 correlacionada com MMP2, sugeriu uma tendência à correlação inversa (correlação de Spearman = 0,06) destes dados.

As razões da expressão dos genes MMP2/MMP14, MMP2/TIMP2 e MMP14/TIMP2 estão apresentadas nas tabelas abaixo (Tabela 9 e 10). Nota-se que a maior expressão da MMP14/TIMP2 esteve associada com a LLA-B (95% IC: 0.02-0.68; *p*= 0.02) (Figura 7), e menor risco de recaída (95% IC: 0.009-0.9; *p*= 0.03), apesar da análise pelo teste não paramétrico não confirmar este dado (Tabela 9).

Encontramos associação entre MMP2/TIMP2 e idade superior a nove anos (95% IC: 0.76-32.5 *p*=0.04), glóbulos brancos acima de 50.000d/dl ao diagnóstico (95% IC: 0.98-96.5; *p*= 0.02), alto risco de recaída (95% IC: 1.11-2.12; *p*= 0.04) (Tabela 9 e 10) e situação clínica até setembro de 2008 - status (Figura 8) (por avaliação de teste não paramétrico).

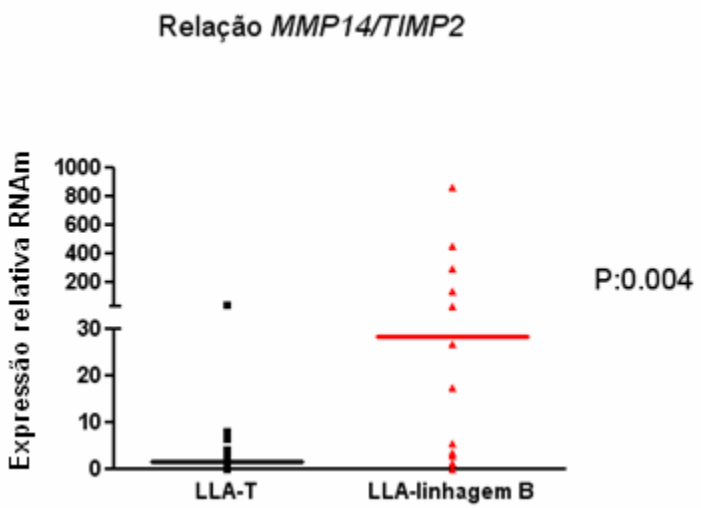

Figura 7 - Relação da expressão gênica MMP14/TIMP2 com LLA-B.
Legenda: Análise por teste de Mann-Whitney. Os pacientes com LLA-B apresentaram maior expressão gênica da relação MMP14/TIMP2 que os LLA-T.

Tabela 9 - Avaliação das variáveis clínicas com a expressão gênica das razões entre a MMP2/MMP14, MMP2/TIMP2 e MMP14/TIMP2 utilizando o teste de Fisher (valor de *p*), *odds ratio* (*OR*) e intervalo de confiança de 95%.

		MMP2/MMP14		***MMP2/TIMP2***		***MMP14/TIMP2***	
		***OR* (95%IC)**	***P***	***OR* (95%IC)**	***P***	***OR* (95%IC)**	***P***
Idade	1-9 anos (n:16)	***	1.00	***	0.13	***	0.25
	≥ 9 anos (n:13)	3.00(0.15-59.8)		5.0(0.76-32.5)		0.33(0.06-1.60)	
GB*[1]	<50.000/dL (n:15)	***	0.48	***	0.07	***	0.25
	>50.000/dL (n:14)	9.0(0.36-220)		9.7(0.98-96.5)		0.34(0.07-1.65)	
GB D7	>5.000/dl		1.00		1.00		0.59
	<5.000/dl	0.42(0.18-1.0)		1.58(0.12-20.68)		2.3(0.18-29.7)	
MOD14*[2]	M1 ou M2		1.00		1.00		1.00
	M3	0.40(0.13-1.17)		0.77(0.61-0.96)		0.50(0.32-0.75)	
MOD28*[3]	>5% blastos		-		1.00		-
	<5% blastos	-		0.73(0.57-0.92)		-	
Risco de recaída	Baixo (n:8)	***	1.00	***	0.07	***	**0.03**
	Alto (n:21)	2.33(0.99-5.48)		1.53(1.11-2.12)		**0.09(0.009-0.9)**	
Imunofenotipagem	Linhagem B (n:15)	***	1.00	***	0.19	***	**0.02**
	LLA-T (n:14)	3.00(0.15-59.8)		4.06(0.63-26.1)		**0.12(0.02-0.68)**	
Citogenética	Favorável		**-**		0.24		1.00
	Desfavorável	-		0.20(0.09-0.45)		0.52(0.35-0.77)	
Resposta *[4]	Boa(n:22)	***	1.00	***	1.00	***	
	Ruim (n:5)	0.66(0.02-18.0)		0.80(0.07-8.91)			
Infiltração SNC *[5]	<5blastos/mm^3 (n:28)		-	***	0.25	***	1.00
	≥5blastos/mm^3 (n:1)	-		0.22(0.11-0.45)		0.50(0.34-0.73)	
Status*[6]	RC [7](n:23)	**-**	-	***	**0.02**	***	0.32
	Recaída/obito (n:6)	-		12.6(1.56-102)		0.20(0.02-2.17)	

Legenda: *1 - glóbulos brancos ao diagnóstico; *2 – medula óssea analisada morfologicamente no 14^0 dia de indução quimioterápica;*3 - medula óssea analisada morfologicamente no 28^0 dia de indução quimioterápica *4 - Resposta à quimioterapia de indução no 28^0 dia; *5 – sistema nervoso central; *6 – Situação clínica até setembro-2008; *7 – Remissão completa; *** com base no valor de referência (1.00).

Tabela 10 - Avaliação das variáveis clínicas com a expressão gênica das razões entre a MMP2/MMP14, MMP2/TIMP2 e MMP14/TIMP2 e suas medianas. Utilizado teste de Mann-Whitney (*p).*

		MMP2/MMP14		***MMP2/TIMP2***		***MMP14/TIMP2***	
		Mediana*	***P***	**Mediana**	***P***	**Mediana**	***P***
Idade	1-9 anos (n:16)	0.0	0.88	0.0	**0.04**	6.29	0.24
	≥ 9 anos (n:13)	0.0		0.0		1.32	
GB [1]	<50,000/dL (n:15)	0.0	0.08	0.0	**0.02**	6.29	0.16
	>50,000/dL (n:14)	0.0		0.0		2.1	
Risco de recaída	Baixo (n:8)	0.0	0.27	0.0	**0.04**	26.8	0.07
	Alto (n:21)	0.0		0.0		2.8	
Imunofenotipagem	Linhagem B (n:15)	0.0	0.65	0.0	0.10	28.5	**0.005**
	LLA-T (n:14)	0.10		0.0		1.4	
Resposta [2]	Boa(n:22)	0.0	0.43	0.0	0.70	3.9	0.65
	Ruim (n:5)	0.49		0.25		16.5	
Status[3]	RC [4](n:23)	0.0	-[5]	0.0	**0.01**	5.9	0.26
	Recaída/obito (n:6)	0.0		0.0		1.4	

Legenda: *Mediana referente às unidades arbitrárias do RQ-PCR; 1 – Glóbulos Brancos ao diagnóstico; 2 – Resposta ao tratamento quimioterápico da indução; 3 – situação clínica até setembro/2008; 4 – Remissão completa; 5 – não houve valores para preencher o grupo com expressão acima da mediana.

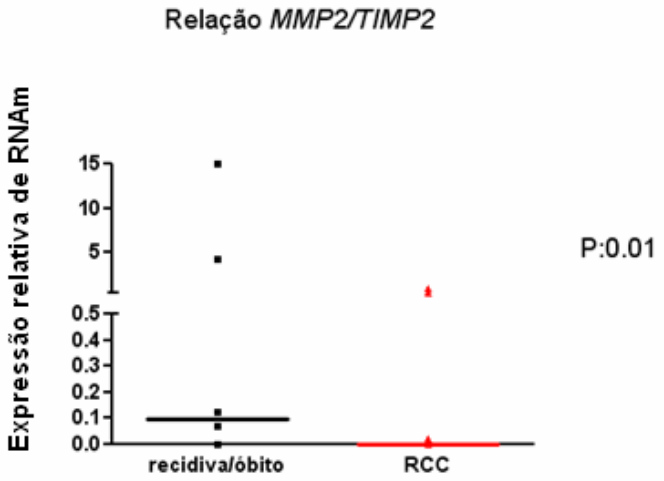

Figura 8 - Expressão gênica da relação MMP2/TIMP2 e recidiva/óbito ou remissão completa.
Legenda: RCC – remissão completa; valor de *p* por teste de Mann- Whitney

Para analisar a possível correlação da expressão dos genes MMP1, MMP2, MMP14, TIMP2, TIMP3, TIMP4 e a razão entre MMP2/MMP14, MMP2/TIMP2 e MMP14/TIMP2 com sobrevida livre de eventos em cinco anos (SLE), os pacientes foram divididos em dois grupos. Foi usado o valor da mediana da expressão dos respectivos genes, igual ou abaixo e acima dela como valor de corte. Para a razão MMP2/TIMP2 foi encontrado maior SLE naqueles com expressão gênica abaixo da

mediana (90.5 ± 4.1% *versus* 42.9 ± 10.05, *p* = 0.008) (Tabela 11 e Figura 9), e 12.6 vezes mais chances de evento desfavorável em crianças com expressão gênica acima da mediana (95% IC: 1.56-102; *p*= 0.02). Não foi observada diferença na sobrevida em relação às outras expressões gênicas estudadas.

Tabela 11 - Nível de expressão gênica das MMP1, MMP2, MMP14, TIMP2, TIMP3, TIMP4 e as relações MMP2/MMP14, MMP2/TIMP2 e MMP14/TIMP2 e suas associações com sobrevida livre de eventos em cinco anos.

Gene	***Nível da expressão*** *(número absoluto de eventos)*	***SLE ±DP (%)***	***Valor de p***
MMP1	< mediana (5)	81.5 ±4.3	0.18
	≥ mediana (1)	50 ± 20.8	
MMP2	< mediana (5)	75	0.135
	≥ mediana (0)	100	
MMP14	< mediana (5)	66.7 ± 7.0	0.09
	≥ mediana (1)	92.9 ± 4.2	
TIMP2	< mediana (2)	85.7 ± 5.8	0.656
	≥ mediana (3)	78.6 ± 6.2	
TIMP3	< mediana (4)	73.3 ± 6.8	0.38
	≥ mediana (2)	85.7 ± 5.5	
TIMP4	< mediana (4)	81.8 ± 4.7	0.55
	≥ mediana (2)	71.4 ± 10.5	
MMP2/MMP14	< mediana (0)	100	*
	≥ mediana (0)	100	
MMP2/TIMP2	< mediana (2)	90.5 ± 4.1	**0.008 ****
	≥ mediana (4)	42.9 ± 10.05	
MMP14/TIMP2	< mediana (4)	71.4 ± 6.9	0.17
	≥ mediana (1)	92.3 ± 4.5	

Legenda: DP – desvio padrão; SLE – sobrevida livre de eventos calculada pelo Kaplan – Meier e valor de *p* pelo teste de log rank; * pequeno número de pacientes, o que impossibilitou a análise estatística; ** estatisticamente significativo (*p* < 0.05)

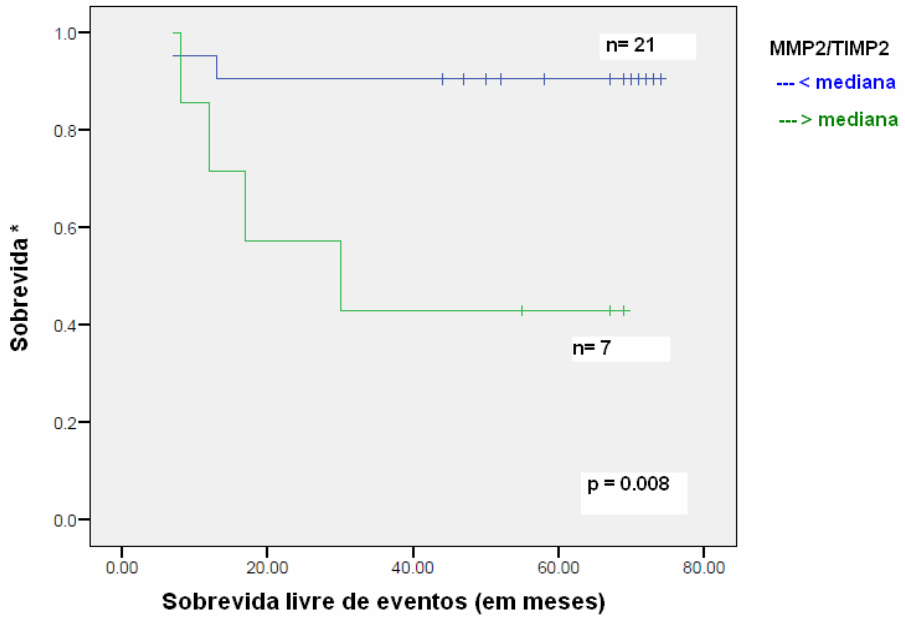

Figura 9 - Sobrevida livre de eventos em crianças com LLA de acordo com a expressão da razão dos genes MMP2/TIMP2 abaixo e acima da mediana.
Legenda: * sobrevida acumulada. Valor de p segundo avaliação teste de log rank.

4 DISCUSSÃO

As variáveis clínicas encontradas na amostra analisada são compatíveis com dados da literatura sobre LLA na infância (PUI et al., 2008). Os resultados encontrados mostram que as LLA-T apresentam-se com maior contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico (71,4% versus 26,7% das LLA-B), risco de recaída (85,7% versus 60% das LLA-B), e menor percentual de remissão completa (64,3% versus 93,3% nas de linhagem B) e sobrevida global em meses (40,28 versus 66,66 das LLA-B). Evidenciando uma amostra com características clínicas representativas da LLA em crianças e adolescentes (BRANDALISE et al., 1993).

A relação das metaloproteinases e seus inibidores tem sido muito estudada nos tumores sólidos (EGEBLAD; WERB, 2002), a fim de melhor compreender os mecanismos básicos do câncer, e poder facilitar o desenvolvimento de novas terapias. Porém, ainda temos poucos estudos sobre estes mecanismos em LLA da infância, que é uma leucemia com características biológicas distintas da LLA do adulto, com maior potencial de infiltração de órgãos extramedulares nas LLA-T, e necessidade de identificação de regimes terapêuticos que possam melhorar as taxas de cura no subgrupo de pacientes de alto risco (PUI et al., 2008). Este trabalho é o primeiro que analisa três das MMPs (MMP1, MMP3 e MMP14) envolvidas na ativação da MMP2 e seus inibidores endógenos (TIMP2, TIMP3 e TIMP4) em LLA de crianças.

O papel da MMP2 na leucemia aguda parece estar provavelmente mais relacionado a capacidade de degradação da MEC, interferindo na angiogênese e facilitando migração de células endoteliais in vitro, com maior risco de invasão e potencial metástatico (KLEIN et al., 2004).

Foi demonstrada uma correlação negativa entre MMPs e prognóstico em alguns cânceres, e mais recentemente em LLA (KUITTINEN et al., 2001; SCHNEIDER et al., 2009; SCRIDELI et al., 2009). Porém, existem controvérsias em relação à proteção ou ao risco quando há aumento de algumas MMPs ou TIMPs, como demonstrado num estudo com 54 pacientes com leucemia, em que houve boa resposta em três anos ao tratamento convencional de LMA em 82% dos que

expressaram MMP2 versus 100% de óbito em 13 meses daqueles que não expressaram (KUITTINEN et al., 1999).

As MMPs e TIMPs podem potencialmente afetar a hematopoiese, modificando a estrutura da matriz extracelular da medula óssea e regulando diversas funções celulares incluindo proliferação, diferenciação, adesão, migração e sobrevida (BAKER et al., 1999; MARQUEZ-CURTIS et al., 2001).

Em 2001, um estudo finlandês com imunocitoquímica em esfregaço de medula óssea de 55 crianças com LLA apresentou baixa expressão de MMP2 em crianças e sugeriu não haver relação entre expressão de MMP2 e 9 e comportamento mais agressivo da doença (KUITTINEN et al., 2001). No presente estudo, tivemos expressão da MMP2 em oito dos 29 casos estudados (28.5%) e também não foi observada relação entre as variáveis clínicas de mau prognóstico e a MMP2 isoladamente.

A associação entre LLA-T e expressão aumentada da MMP2 foi demosntrada num estudo com 134 crianças e adolescentes com LLA (SCRIDELI et al.,2009). O papel da MMP2 na LLA em nossa amostragem deve ser analisado com cautela, devido ao reduzido número de casos que estudamos.

A MMP14 foi a metaloproteinase mais expressa em nosso estudo (82,75%). Esta constitui um receptor funcional para a ativação da MMP2 em linfoblastos, com trabalho recente evidenciando elevada expressão da MMP14 em linfoblastos - B de pacientes com LLA recidivada, que também se caracterizavam pela alta porcentagem da MMP2 e TIMP2, apesar do grupo analisado ser pequeno (SCHNEIDER et al., 2009). No nosso estudo a expressão da MMP14 apresentou correlação positiva com a LLA do tipo B, onde os pacientes tendem a se comportar com melhor prognóstico que nas LLA-T, e sugere haver menor risco de recaída nestes pacientes (teste de Mann-Whitney com p= 0,06), sem correlação direta com a MMP2.

Nossos dados sugerem correlação inversa entre a relação MMP14/TIMP2 e MMP2 (correlação de Spearman = 0,06), que pode ser explicada através das vias de auto-regulação das MMPs, pois a região inibitória da MMP14 ligada a TIMP2, forma um complexo covalente, que permite a TIMP2 atuar clivando a proMMP2 e a ativando. No entanto, quando esta relação se encontra em desbalanço (por excesso de MMP2 estimulando a liberação da TIMP2 e sua atividade inibitória sobre a primeira, por exemplo) pode levar a inibição da expressão da MMP2 (BERNARDO;

FRIDMAN, 2003), sugerindo que não só a expressão de cada gene separadamente pode estar associada com a disseminação e invasão extramedular da LLA da infância.

Já a colagenase intertiscial (MMP1) é responsável por iniciar a degradação do colágeno tipo 1, que é a principal proteína estrutural do osso, sendo importante para o início da reabsorção óssea, e atua como substrato também para a MMP2 e 9 na degradação do colágeno IV, que está envolvida no processo de invasão tumoral e metástases (ZDZISINSKA et al., 2008). Até o momento não se tinha descrição da MMP1 em LLA, apenas em tumores sólidos (PENG et al., 2010; BHUVARAHAMURTHY et al., 2006). A MMP1 foi detectada em 02 pacientes analisados e estes apresentavam resposta ruim ao tratamento quimioterápico de indução. Por ser uma amostra muito pequena, não podem ser inferidas maiores análises, necessitando ampliar o número de casos.

A expressão da MMP3 esteve associada ao potencial metastático de diferentes tipos de tumores, com alto grau de malignidade e crescimento de linfomas em ratos (THEMSCHE et al., 2004). Não havia dados sobre a expressão da MMP3 em células blásticas de LLA, porém não houve expressão na amostra analisada, nem mesmo nas linhagens de leucemia testadas, apenas na amostra de tumor de sistema nervoso central utilizada para calibração da reação de RQ-PCR, o que foi uma dado inesperado. Essa ausência de expressão parece ser resultado da não ativação desse gene, mostrando que o perfil de expressão das MMPs tem um comportamento diferente, dependendo do tipo de tecido, indicando que a expressão das diversas MMPs pode estar relacionada com uma complexa via de regulação de genes destas metaloproteinases nos tumores (CUEVA MATEO, 2005). Este resultado sugere não haver correlação entre LLA e MMP3. Interessante ressaltar que uma meta-análise recentemente publicada, que analisou 50 casos a respeito de risco de cânceres em geral e polimorfismos da MMP3 e MMP1 não evidenciou relação de risco com a MMP3 e seus polimorfismos, mesmo quando expressa (PENG et al., 2010).

A função da TIMP3 pode ser independente das outras TIMPs. Pode inibir qualquer MMP e atuar como supressor tumoral. Apresenta habilidade de se ligar a matriz extracelular, promover apoptose de algumas células *in vitro* e *in vivo,* e reduzir migração e invasão de células cancerígenas. Foi descrita relação entre mutações da TIMP3 e uma forma de distrofia macular do olho (Distrofia de Sorsby) (BAKER et al.,

2002; HUA QI et al., 2003). No estudo atual, foi identificada sua expressão gênica em 18 (62%) pacientes, e todos os cinco pacientes que tiveram mau resposta ao tratamento quimioterápico inicial hiperexpressaram este gene, porém não foi possível inferir associação com sobrevida. Obtivemos um dado interessante que pode ter relação de prognóstico com as LLA de pior evolução, visto que pouco se conhece sobre as funções da TIMP3, e não há relato de informação relacionada na literatura.

A especificidade da TIMP4 parecia inicialmente estar restrita aos tecidos cardíaco e cerebral, mas atualmente já se sabe que é encontrada nos rins, cólon, testículo, tecido adiposo e pâncreas. Apresenta 51% de semelhança com a TIMP2, e é regulada por modificações postranslacionais. Pode se ligar a MMP14 e depois a MMP2, mas este complexo parece não conseguir ativar a MMP2, entretanto por inibir a MMP14, com função reguladora indireta da inativação da MMP2. Foi descrito que apresenta expressão elevada em estágios iniciais de cânceres dos tecidos citados, que decrescem em estádios mais avançados, atuando contra a invasão tumoral, por inibir a MMP2 e 9. Contudo, existem resultados conflitantes sobre esta ação antitumoral, sendo necessários mais estudos para avaliação deste gene e sua expressão protéica (MELENDEZ-ZAJGLA et al., 2008).

Foram poucos os pacientes que expressaram a TIMP4 em nosso trabalho (27,5%), e mesmo os que o fizeram, tiveram expressão muito baixa, sem relação com variáveis clínicas, o que pode ser decorrente da baixa expressão deste gene nos blastos leucêmicos ou na própria linhagem linfocítica medular normal.

Altas expressões gênicas de TIMP2 e MMP2 estão significantemente associadas à LLA de células T, e a de TIMP2 com infiltração do SNC (SUMINOE et al., 2007). Neste estudo não tivemos um número de casos significativos com infiltração do SNC (3.4%), necessitando de novos estudos com maior casuística para melhor esclarecimento da relação entre TIMP2 e infiltração de SNC. Quanto à expressão gênica da TIMP2 em pacientes com LLA-T, observamos relação significativamente estatística (95% IC: 1.63-51.4; OR 9.16; p = 0.001), assim como com glóbulos brancos acima de 50.000/dl ao diagnóstico (p= 0,02), o que corrobora os dados da literatura sobre essa relação. Não foi possível correlacionar estes dados com a resposta ao tratamento e risco de recaída, o que não interferiu também na sobrevida livre de eventos (p = 0.65) (Figura 5 e Tabelas 7 e 9).

A inativação da TIMP2, com o desbalanço das MMPs, é um evento epigenético freqüente em linfoma não Hodgkin (LNH), podendo ser uma etapa crítica durante a progressão maligna e crescimento do linfoma extramedular (GALM et al., 2005), além de sua maior expressão ter sido relacionada à progressão e pior prognóstico de outros cânceres: câncer de mama (REMACLE et al., 2000), câncer de ovário (SAKATO et al., 2000), e a LMA (AREF et al., 2007). A TIMP2 pode também afetar diretamente o crescimento, diferenciação e sobrevivência da célula, tendo papel importante na hematopoiese humana (GUEDEZ et al., 2005), e sua hiperexpressão poderia estar associado ao desequilíbrio do ambiente medular, o que pode ser um evento favorecedor da proliferação de células blásticas.

No nosso estudo encontramos que na razão entre MMP2/TIMP2 há uma associação com maior idade ao diagnóstico, glóbulos brancos acima de 50.000/dl ao diagnóstico, grupo de risco de recaída e menor sobrevida livre de eventos, sugerindo relação entre mau prognóstico e MMP2/TIMP2 elevada, e reforçando que o equilíbrio da relação entre MMP e TIMPs pode desempenhar um papel importante na apresentação e prognóstico da leucemia em crianças, mais relevante que a análise isolada de um único gene.

Observamos que a razão MMP14/TIMP2 aumentada está relacionada com a LLA de células B, o que nos remete à relação com o desequilíbrio acima citado, e acrescenta mais um dado a hipótese da relação entre LLA-B e MMP14, apesar de não se relacionar com prognóstico da doença e outros dados já sugerirem relação de mau prognóstico entre a MMP-14 e outros cânceres, visto que esta participa da ativação da MMP-2 (SCHNEIDER et al., 2009).

É válido frisar que há outros inibidores envolvidos na inativação das MMPs, e que o equilíbrio do meio extracelular apresenta mecanismos mais complexos de regulação, além daqueles nos quais estão envolvidas as MMP e TIMPs (STETLER-STEVENSON et al., 1993), e que a regulação gênica é o comando celular inicial, faltando a estes dados confirmação da expressão enzimática.

5 CONCLUSÃO

A MMP1 e 3 parecem não estar associadas com a LLA.

A MMP2 foi pouco expressa, sem correlação isolada com as variáveis clínicas.

A TIMP2 mostrou relação com a LLA –T e glóbulos brancos acima de 50.000/dl ao diagnóstico, sugerindo maior agressividade quando presente.

A TIMP3 parece estar associada a indivíduos com má resposta à quimioterapia de indução.

O presente estudo demonstrou que a alta razão entre mRNA de MMP2/TIMP2 em células de leucemia esteve significativamente associada a menor sobrevida livre de eventos, sugerindo que o equilíbrio da MMP/TIMP, mas não a quantidade de mRNA de um único gene, pode desempenhar um papel importante na apresentação e prognóstico da leucemia em crianças.

A MMP14 e a razão MMP14/TIMP2 parecem estar relacionadas com a LLA-B.

São necessários mais estudos abordando as MMPs e TIMPs, com número maior de pacientes, e avaliação da expressão protéica destes genes para confirmação destes dados.

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Foram consideradas limitações do estudo:

1 – Amostragem pequena.

2 - Não foi realizada a correlação com a expressão protéica, pois o material estava armazenado há mais de cinco anos com trizol, sem inibidor de proteases, o que inviabilizou o uso da amostra para estudo com zimografia ou western blot.

7 REFERÊNCIAS

ABSHIRE, T.C. et al. Morphologic, immunologic and cytogenetic studies in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and relapse: a Pediatric Oncology Group study. **Leukemia**, London, v. 6 (5), p. 357-362, May. 1992.

AHLBOM, A. et al. A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. **Br J Cancer**, London, v. 83, p. 692-98, Sep. 2000.

AREF, S. et al. Prognostic relevance of circulating matrix metalloproteinase-2 in acute leukaemia patients. **Hematological Oncology**, Chichester, v. 25 (3), p.121-126, Sep. 2007.

ARMSTRONG, S.A., LOOK, A.T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, Alexandria, v. 23 (26), p. 6306-15, Sep. 2005.

BAKER, A.H. et al. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. **Bri J Cancer**, London, v. 79, p. 1347-1355, Mar. 1999.

BAKER, A.H., EDWARDS, D.R., MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **J Cell Sci**, Cambridge, v. 115, p.3719-27, Oct. 2002.

BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D., WOESSNER, J.F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Academic Press, London. 1998.

BENNETT, J.M. et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) cooperative group. **Br J Haematol**, Oxford, v. 33 (4), p. 451-458,Aug. 1976.

BENNETT, J.M. et al. French-American British (FAB) Cooperative Group: the morphological classification of acute leukemias – concordance among observes and clinical correlation. **Br J Haematol**, Oxford, v. 47, p. 553-561. 1981.

BERNARDO, M.M., FRIDMAN, R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. **Biochem J**, London, v. 374, p. 739-745. Sep. 2003.

BHOJWANI, D. et al. Potential of gene expression profiling in the management of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Paediatr Drugs**, New Zealand, v. 9 (3), p. 149-156, Feb. 2007.

BHUVARAHAMURTHY, V. et al. In situ gene expression and localization of metalloproteinases MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, and their inhibitors TIMP1 and TIMP2 in human renal cell carcinoma. **Oncol Rep**, Greece, v. 15(5), p. 1379-84, May. 2006.

BODEY, B. et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase expression in colorectal carcinomas. **In Vivo**, Greece, v.14 (5), p. 659-666, Oct. 2000.

BRANDALISE S. et al. Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. ALL Brazilian Group. **Leukemia**, London, v. 7, S. 2, p. 142-5, Aug. 1993.

BRONDUM, J. et al. Parental cigarette smoking and the risk of acute leukemia in children. **Cancer**, New York, v. 85(6), p.1380-1388, Mar. 1999.

BUFFLER, P.A. et al. Environmental and genetic risk factors of childhood leukemia: appraising the evidence. **Cancer Invest**, New York, v. 23 (1), p. 60-75. 2005.

CANALLE, R. et al. Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Environ Mol Mutagen**, New York, v. 43(2), p.100-9. 2004.

CARROLL, W.L. et al. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology**, London, v. 1, p. 102-132. 2003.

CAUWELIER, B. et al. Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCR beta locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes. **Leukemia**, London, v. 20, p. 1238–1244. 2006.

CLAPPIER, E., et al. The C-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children. **Blood**, New York, v. 110, p. 1251–1261, Apr. 2007.

CUEVA MATEO, E. **Estudo da expressão protéica da matriz metaloproteinase (MMP-1, -2, -3, -9 e -14) em tumores da família Ewing e meduloblastoma de crianças e adolescentes**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005. 75p.

CURRAN, S., MURRAY, G.I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis. **Eur J Cancer**, Oxford, v. 36, p.1621-30, Aug. 2000.

DAVIDSON B. et al. High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 m RNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma. **Clin Exp Metastasis**, London, v. 17, p. 799-808. 1999.

D'ERRICO A. et al. Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric, and breast carcinoma progression. **Mod Pathol**, Baltimore, v. 4, p. 239-246, Mar. 1991.

DOWELL B.L. et al. Immunologic and clinicopathologic features of common acute lumphoblastic leukemia antigen-positive childhood T-cell leukemia. A Pediatric Oncology Group study. **Cancer**, New York, v. 59, p. 2020-2026, Jun. 1987.

DUFFY, M.J., MCGOWAN, P.M., GALLAGHER, W.M. Cancer invasion and metastasis**:** changing views. **J Pathol**, London, v. 214, p. 283-293, Feb. 2008.

EGEBLAD, M., WERB, Z. New functions for the Matrix Metalloproteinases in cancer progression. **Nature Rev**, London, v. 2, p. 161-174, Mar. 2002.

FOON K.A, TODD, R.F. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. **Blood**, New York, v. 68, p.1-31, Jul. 1986.

GALM O. et al. Inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase -2 gene by promoter hypermethylation in lymphoid malignances. **Oncogene**, Basingstoke, v. 24, p.4799-4855. 2005.

GAST, A. et al. Folate metabolic gene polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. **Leukemia**, London, v. 21, p. 320-325. 2007.

GIAVASSI, R., TARABOLETTI, G. Preclinical development of metalloproteasis inhibitors in cancer therapy. **Crit Rev Oncol Hematol**, Amsterdam, v. 37, p.53-60. 2001.

GRAY, S.T., WILKINS, R.J., YUN, K. Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma. **Am J Pathol,** Philadelphia, v.14, v. 301-306, Aug. 1992.

GREAVES, M. Infection, immune responses and the etiology of childhood leukemia. **Nat Rev Cancer**, London, v. 6, p. 193-203, Mar. 2006.

GREAVES, M.F., WIEMELS, J. Origins of chromossome translocations in childhood leukemia. **Nat Rev Cancer**, London, v. 3, p. 639-649, Sep. 2003.

GROFT, L.L. et al. Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas. **Br J Cancer**, London, v. 85, p. 55-63. 2001.

GUEDEZ, L. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) promotes plasmablastic differentiation of a Burkitt lymphoma cell line: implications in the pathogenesis of plasmacytic/plasmablastic tumors. **Blood**, New York, v. 105(4), p. 1660- 1668, Feb. 2005.

HAGEMANN, T. et al. mRNA expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas. **Eur J Cancer**, Oxford, v. 37(15), p.1839-1846, Oct. 2001.

HEALY, J. et al. Promoter SNPs in G1/S checkpoint regulators and their impact on the susceptibility to childhood leukemia. **Blood**, New York, v. 109, p. 683-692., Jan. 2007.

HEISSIG, B. et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. **Cell**, Cambridge, v. 109, p.625-637, May. 2002.

HENDRIX, M.I. et al. Expression of type IV collagenase correlates with the invasion of human lymphoblastoid cell lines and pathogenesis in SCID mice. **Mol Cell Probes**, London, v.;6, p. 59-65, Feb. 1992.

HOCK, H. et al. Tel/Etv6 is na essencial and selectve regulator of adult hematopoietic stem cell survival. **Genes Dev**, New York, v. 18, p.2336-41, Oct. 2004.

HOFMANN, U.B. et al. Expression and activation of matrix metalloproteinase -2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. **J Pathol**, London, v,191, p.245-256, Jul. 2000.

HONG, D. et al. Initiating and câncer-propagating cells in TEL-AML1 associated childhood leukemia. **Science,** Washington, v.319, p.336-39, Jan. 2008.

HU, Y.H. et al. The regulating role of mutant IκBα in expression of TIMP-2 and MMP-9 in human glioblastoma multiform. **Chin Med Jour**, Peking, v. 122(2), p.205-211, Jan. 2009.

HUA, Q. et al. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. **Nature**, Basingstoke, v.9(4), p.407-415, Apr. 2003.

INFANTE-RIVARD, C. et al. Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polimorphisms. **Epidemiology**, Cambridge, v.10, p.481-487, Sep. 1999.

ITO, H. et al. Comparison of the expression profile of metastasis-associated genes between primary and circulating cancer cells in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res**, Athens, v.23, p.1425-32.2003.

ITOH, T. et al. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A deficient mice. **Cancer Res**, Chicago, v. 58, p. 1048-51.1998.

ITOH, Y. et al. Homophilic complex formation of MT-1MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. **EMBO J**, Oxford, v.20, p. 4782-4793. 2001.

KINLEN, L. Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology. **Oncogene**, Basingtoske, v. 23, p.6341-48. 2004.

KLEIN, G. et al. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP-2) and MMP-9 in câncer, e.g. acute leukemia. **Critical Rev Onc Hematol**, Amsterdam, v. 50, p.87-100, 2004.

KRAJINOVIC, M., LABUDA, D., SINNETT, D. Glutathione S-transferase P1 genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pharmacogenetics**, London, v. 12, p.655-58, Nov. 2002.

KUITTINEN, O. et al. Gelatinase A and B (MMP-2, MMP-9) in Leukaemia MMP-2 may indicate a good prognosis in AML. **Anticancer Res**, Athens, v. 19, p.4395-4400. 1999.

KUITTINEN O. et al. MMP-2 and MMP-9 expression in adult and childhood acute lymphatic leukemia (ALL). **Leuk Res**, London, v. 25, p.125-31,2001.

LANCIOTTI, M. et al. Genetic polymosphism of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase is associated with a increased risk of infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements. **Leukemia**, London, v. 19, p. 214-16, 2005.

LEVI, E. et al. matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v.93, p.7069-74, 1996.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. **Methods**, San Diego, v.25(4), p.402-8, Dec. 2001.

LIZARRAGA, F. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 is expressed in cervical cancer patients. **Anticancer Res**, Athens, v.;25(IB), v.623-627, Feb. 2005.

MARQUEZ-CURTIZ, L.A. et al. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of pmetalloproteinase secretion by haematopoietic and stromal precursors and their production in normal and leukaemic long-term marrow cultures. **Bri J Haematology**, Oxford, v.115,p.595-604,Dec. 2001.

MAQUOI, E. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase maturation and HT1080 invasiveness by a synthetic furin inhibitor. **FEBS Lett**, Amsterdam, v.424:, p.262-266, Mar.1998.

MARTH, C. et al. Circulating tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with ovarian carcinoma do not predict prognosis. **Cancer**, London, v. 94(3):707-12, Feb. 2002.

MATRISIAN, L.M. The matrix metalloproteinases. **BioEssays**, Cambridge, v.14(7), p.455-63, 1992.

MELENDEZ-ZAJGLA, J. et al. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-4. The road less traveled. **Molecular Cancer**, London, v.7, p.85, Nov. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DO CÂNCER. "**O Problema do Câncer no Brasil"**, quarta edição revisada e atualizada. Rio de Janeiro, 1997.

MORGUNOVA, E. et al. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. **Science**, Washington, v. 284, p.1667-70,1999.

MULLER, D., et al. Expression of collagenase-related metalloproteinase genes in human lung or head and neck tumours. **Int J Cancer**, New York, v.48, p.550-556, Jun. 1991.

MYLONA, E. et al. The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast cancer. **Histopathology**, Oxford, v.50, v.338-47, 2007.

NAKAMURA, H. et al. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. **Cancer Res**, Chicago, v. 59, p.467-473, 1999.

NAGASE, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biol Chem**, Berlin, v. 378, p.151-160, 1997.

NAGASE, H., VISSE, R., MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, Oxford, v.69, p.562-73, Feb. 2006.

NAKANO, A. et al. Expression of matrilysin and stromelusin in human glioma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, San Diego, v.192, p.999-1003, 1993.

NELSON A.R et al. Matrix metalloproteinases: biologic ativity and clinical implications. **J Clin Oncol**, Alexandria, v.18, p.1135-49, 2000.

OKADA, Y., MORODOMI, T., ENGHILD, J.J. Matrix metalloproteinase 2 from human synovial fibroblast: purification and activation of the precursor and enzymatic properties. **Eur J Biochem**, Oxford, v. 194, p. 721-730, Dec. 1990.

OKUDA T. et al. AML1, the target of multiple chromosomal translocation in human leukemia, is essencial for normal fetal liver hematopoiesis. **Cell**, Cambridge, v.84, p.321-30, Jan. 1996.

OHTANI, H. et al. Dual over-expression pattern of membrane-type metalloproteinase-1 in cancer and stromal cells in human gastrointestinal carcinoma revealed by in situ hybridisation and immunoelectron microscopy. **Int J Cancer**, Géneve, v. 68p.565-570,1996.

OVERALL, C.M. et al. Identication of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding site on the hemopexin carboxyl domain of human gelatinase A by site-directed mutagenesis. **J Biol Chem**, Berlin, v.274, p.4421-9, Feb. 1999.

OVERALL, C.M. et al. Domain interactions in the gelatinase A TIMP-2 MT-1MMP activation complex. **J Biol Chem**, Berlin, v.275, p.39497-506, 2000.

PAUPERT, J. et al. Cell-surface MMP-9 regulates the invasive capacity of Leukemia Blast Cells with monocytic features. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 7(8), p.1047-53, Apr. 2008.

PEGAHI, R. et al. Spontaneous and cytokine-evoked production of matrix metalloproteinases by bone marrow and peripheral blood pre-B cells in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Eur Cytokine Netw**, Montrouge, v.16, p. 223–232, Sep. 2005.

PENDÁS, A.M. et al. Identification and characterization of novel human matrix letalloproteinase with unique structural characteristicas, cromossomal location, and tissue distribution. **The Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v.272(7)p. 4281-4286, Feb. 1997.

PENG, B. et al. Polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases 1 and 3 and cancer risk: a meta-analysis of 50 case–control studies. **Mutagenesis**, Oxford, v. 25(1)p. 41-48, Jan. 2010.

PICCARD, H., VAN DEN STEEN, P.E., OPDENAKKER, G. Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. **J Leuk Biol**, New York, v. 81, p.870-892, 2007.

PIZZO, P.A., POPLACK, D.G. Principles and practice of pediatric oncology. In: Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG. **Acute Lymphoblastic Leukemia**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; p. 489-544, 2002.

POLETTE, M. et al. Detection of mRNAs encoding collagenase I and stomelysin 2 in carcinomas of the head and neck by in situ hibridization. **Invasion Metastasis**, New York**,** v.11, p.76-83, 1991.

POWE, D.G. et al. TiIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma. **Br J Cancer**, London, v. 75, p. 1678-1683, 1997.

PRESTON, D. et al. Câncer Incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, Lymphoma and multiple myeloma. **Radiat Res**, Charloteville, v.137, p.S68, Feb. 1994.

PROTOCOLO GBTLI LLA-99. **Grupo brasileiro de tratamento da Leucemia da infância, Instituto Boldrini,** Campinas-SP.

PUI, C.H. Acute lymphoblastic leukemia. In: Pui CH. **Childhood Leukemias**. 2ª edição. New York: Cambridge University Press; 2006. p. 439-72.

PUI, C.H. et al. Heterogenity of presenting features and their relation to treatment outcome in 120 children with T-cell acute lymphoblastic Leukemia. **Blood**, New York, v.75, p.174-179, 1990.

PUI, C.H. et al. Acute lymphoblastic Leukaemia. **N Engl J Med**, London, v.350, p.1535-48, 2004.

PUI, C.H. et al. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, London, v. 371, p. 1030-43, Marc. 2008.

RA, H.J., PARKS, W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol**, Amsterdan, v. 26, p.587-96, Oct. 2007.

REMACLE, A. et al. High levels of TIMP-2 correlate with adverse prognosis in breast cancer. **Int J Cancer**, Mew York, v. 89, p. 118-121, 2000.

RIES, C., PETRIDES, P.E. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. **Biol Chem**, Berlin, v.376, p. 345-355, Jun. 1995.

RUBNITZ, J.E., LOOK, A.T. Molecular genetics of childhood leukemias. **J Pediatr Hematol Oncol**, New York, v. 20, p.1–11, 1998.

SABATINI, F. et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Lab. Invest**, New York, v. 85(8), p.962-971, Aug. 2005.

SAKATA, K. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. **Int J Oncol**, Athens, v.17, p. 673-681, Oct. 2000.

SCHNEIDER, P. et al. In vitro secretion of matrix metalloprotease 9 is a prognostic marker in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, Oxford, v. 34(1), p. 24-31, Jan. 2009.

SCRIDELI, C.A. et al. Expression profile of genes related to cellular migration and adhesion (TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 and MMP-9) in childhood acute lymphoblastic leukemia. In Congress of the International Society of Paediatric Oncology, n^0 40, Berlim, 2008. Berlim: **SIOP abstract Book**, 2008. p. 81-82.

SCRIDELI, C.A. et al. mRNA expression of matrix metalloproteinase (MMPs) 2 and 9 ant tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) 1 and 2 in childhood acute Lymphoblastic Leukemia: Potencial role of TIMP1 as an adverse prognostic factor. **Leukemia Research**, Oxford, v. 34(1), p. 32-37, 2009.

SHIM, K.N. et al. Clinical significance of tissue levels of tissue metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer. **J Gastroenterol**, Tokyo, v. 42, p. 120-8, 2007.

SHIRVAIKAR, N. et al. MMP-14 Mediates Migration of Acute Myelogenous Leukemia Cells. In ASH Annual Meeting and exposition, n° 50, San Francisco, 2008. San Francisco: American Society of Hematology, 2008. **Resumos**, San Francisco: SF, 2008.

SINNETT, D. et al. Childhood leukemia: A genetic disease!. **Med Sci**, Philadephia, v.23(11), p. 968-74, 2007.

SPECTOR, L.G. et al . Epidemiology and etiology. In Pui CH. **Childhood leukemias**. 2ª edição. New York: Cambridge University Press; 2006. p. 48-66.

STETLER-STEVENSON, W.G., AZNAVOORIAN, S., LIOTTA, L.A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. **Annu Rev Cell Biol**, Palo Alto, v. 9, p. 541-73, 1993.

SUMINOE, A. et al. Expression of matrixx metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of MMP (TIMP) genes in blast of infant acute lymphoblastic leukemia with organ involvement. **Leuk Res**, Oxford, v. 31, p. 1437-40, 2007.

TALVENSAARI-MATTILA, A. et al. Matrix metalloproteinase-2 immunorective protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. **Cancer**, New York, v. 83, p. 1153-1162, 1998.

THEMSCHE, C.V., POTWOROWSKI, E.F., ST-PIERRE, Y. Stromelysin-1 (MMP-3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. **Biochem and Bioph Res Com**, San Diego, v. 315, p. 884-891, 2004.

TOKURAKU, M. et al. Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. **Int J Cancer** , Genéve, v. 64, p. 355-359, 1995.

TSUKIFUJI, R. et al. Gene expression of matrix metalloproteinase-1 (interstitial collagenase) and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) in basal cell carcinoma by in situ hybridization using chondroitin ABC lyase. **Histochem J**, London, v. 29, p. 401-407, 1997.

URIA, J.A. et al. Structure and expression in breast tumors of human TIMP-3, a new member of the metalloproteinase inhibitor family. **Cancer Res**, Chicago, v. 54, p. 2091-2094. 1994.

VISSE, R., NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. **Circulation Research**, Baltimore, v. 92, p. 827-839, May 2003.

VROOMAN, L.M., SILVERMAN, L.B. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. **Curr Opinion in Pediatrics**, Philadelphia, v. 21, p. 1-8, Feb. 2009.

WANG, J.C., DICK, J.E. Cancer stem cells: lessons from leukemia. **Trends cell boil**, Cambridge, v. 15, v. 494-501, Sep. 2005.

WENG, A.P. et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. **Science**, Washington, v. 306, p. 269–271, 2004.

WESTERMARCK, J., KÄHÄRI, V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion**. FASEB J**, Bethesda, v. 13(8), p. 781-92,1999.

WOESSNER, J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J**, Bethesda, v. 5, p. 2145-2154, 1991.

YABKOWITZ, R. et al. Inflamatory cytocines and vascular endothelial growth factor stimulate the release of soluble tie receptor from human endothelial cells via metatalloprotease activation. **Blood,** London, v. 93, p. 1969-79, 1999.

YAMAMOTO, M. et al. Differential expression of membrane-type metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro. **Cancer Res**, Chicago, v. 56, p. 384-392. 1996.

YU, X.F., HAN, Z.C. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. **Histol Histopathology**, Murcia, v. 21, p. 519-531, 2006.

ZDZISINSKA, B. et al. Matrix metalloproteinases-1 and -2, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 production is abnormal in bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients. **Leukemia Res**, Oxford, v. 32, p. 1763-1769, Nov. 2008.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1164/2002

Registro CONEP = 3736 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP = 8681/2001 **Processo nº 25000. 021533/2002-26**
Projeto de Pesquisa : *"Padrão de expressão gênica da leucemia linfoblástica aguda de criança associada a resistência a quimioterapia"*.
Pesquisador Responsável : Dr. Luiz Gonzaga Tone
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP
Área Temática Especial : Genética humana

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 663/2002, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

a) foram atendidas as solicitações do referido parecer;

b) o projeto preenche, de modo geral, os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa -CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado

Brasília, 01 de agosto de 2002

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO B - Protocolo de extração de RNA

- Descongelar no gelo os tubos contendo o *pellet* de granulócitos e blastos e Trizol LS®;
- Adicionar 200 µl de clorofórmio aos tubos;
- Adicionar 20 µl de glicogênio (20 mg/ml) e misturar por inversão durante 15 segundos, deixando descansar em temperatura ambiente por 10 minutos;
- Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C;
- O resultado será a separação em 3 fases:

a. Fase superior (incolor): RNA
b. Fase intermédiária (branca): DNA
c. Fase inferior (vermelha): proteínas

- Com o auxílio de uma pipeta, transferir cuidadosamente a fase superior (sobrenadante) contendo RNA para outros tubos Eppendorf® previamente identificados;
- Armazenar as fases restantes para posterior extração de DNA e proteínas em freezer a -70 °C;
- Adicionar ao sobrenadante transferido 500 µl de isopropanol a 100% gelado;
- Agitar manualmente por inversão e incubar *overnight* a -70 °C;
- No dia seguinte, descongelar as amostras em gelo;
- Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C;
- Verter o tubo, desprezando o sobrenadante (isopropanol), com cuidado para não desprezar o pequeno *pellet* branco (RNA);
- Adicionar 1000 µl de etanol a 75% gelado;
- Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C;
- Verter o tubo, desprezando o sobrenadante (etanol), com cuidado para não desprezar o pequeno *pellet* branco (RNA);
- Deixar secar o *pellet* lentamente, deixando o tubo meio invertido sobre papel toalha, em temperatura ambiente, até que o pellet fique quase invisível (transparente);
- Ressuspender o *pellet* em 15 µl de água contendo DEPC;
- Incubar por 10 minutos a 60 °C e armazenar a - 70°C.

ANEXO C – Protocolo de avaliação da qualidade do RNA por eletroforese

- Diluir 1 µl de cada amostra contendo RNA em 5 µl de água contendo DEPC e adicionar 1 µl de corante Dye;
- Pipetar as amostras nos interior dos poços do gel de agarose a 1,2% cuidadosamente;
- Submeter a eletroforese com 70 volts por 45 minutos;
- Fotografar a placa em câmara escura com câmera digital (Kodak EDAS 290, Kodak Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Company, New Jersey, USA) e software apropriado (Kodak 1D Software v.3.6.2, Eastman Kodak Company, New Jersey, USA).
- Os resultados contendo duas bandas de RNA foram considerados satisfatórios. Quando houve contaminação com DNA, a amostra foi submetida a tratamento com DNAse. Quando houve degradação do RNA, a amostra foi submetida a nova extração.

Preparação do gel de agarose a 1,2%

1. Misturar 1,2 g de agarose com 100 ml de tampão TBE (ver anexo **Erro! Fonte de referência não encontrada.**);
2. Aquecer no microondas por 1 minuto e 40 segundos;
3. Quando cessar a fervura, adicionar 2 µl de brometo de etídio;
4. Colocar sobre a placa de eletroforese preparada com o marcador de poços e deixar esfriar em temperatura ambiente.

Tampão TBE (Tris, Borato, EDTA)

- Tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) 107,81 g/l (0,89 M)
- EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético) 5,8 g/l (0,02 M)
- Ácido bórico 55 g/l (0,89 M)

ANEXO D – Protocolo de síntese de DNA complementar

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com a utilização de kit comercialmente disponível (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada reação foram utilizados 2 µl de cada RNA extraído nos passos anteriores, adicionando-se:

- Buffer, 2,5 µl
- dNTP, 1 µl
- Random Primers, 2,5 µl
- Multiscribe, 1,25 µl
- RNAse OUT, 0,63 µl
- Água com DEPC, 15,12 µl

O volume final da reação foi de 25 µl. A seguir, as amostras foram submetidas ao termociclador, com ciclos de PCR a 25 °C por 10 minutos, e a 37 °C por 120 minutos. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer a -20 °C até a realização do RQ-PCR.

ANEXO E - Protocolo do RQ-PCR (PCR quantitativo em tempo real)

- Diluir o cDNA 1:50 (1 µl de cDNA + 49 µl de água DEPC);
- Em uma placa de PCR, adicionar em cada poço:

6,0 µl de Mastermix (Taqman® Universal PCR Master Mix);

0,6 µl da sonda específica (MMP-1, MMP-3, MT1-MMP, TIMP-3, TIMP-4 ou Gus-beta);

5 µl de cDNA diluído a 1:50 ou 5 µl de água DEPC (para o controle branco), completando cada poço para o volume final de 12 µl

- Centrifugar a 2000 rpm por 2 minutos a 4 °C;
- Inserir no aparelho de PCR (7500 Realtime PCR System, Applied Biosystems®):
- Modo “Standard 7500” com 40 ciclos;

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo