

LILYANE DE AMORIM XABREGAS

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DOS TLRs EM PACIENTES
DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)**

MANAUS – AMAZONAS

2020

LILYANE DE AMORIM XABREGAS

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DOS TLRs EM PACIENTES
DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia.

Orientador: Prof^o Dr^o. Allyson Guimarães da Costa

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Adriana Malheiro Alle Marie

MANAUS – AMAZONAS

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

- | | |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| X1 | Xabregas, Lilyane de Amorim

ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DOS TLRs EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA) / Lilyane de Amorim Xabregas. Manaus: [s.n], 2020.
118 f.: color.; 3 cm.


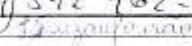

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em ciências Aplicadas à Hematologia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020.
Inclui bibliografia
Orientador: Costa, Allyson Guimarães da
Coorientador: Marie, Adriana Malheiro Alle

1. Leucemia Linfoide Aguda. 2. Imunidade Inata.
3. Receptores do tipo Toll-Like. I. Costa, Allyson Guimarães da (Orient.). II. Marie, Adriana Malheiro Alle (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas.
IV. ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DOS TLRs EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA) |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 06/2020


1
2
3 Ao vigésimo nono dia do mês de junho do ano de 2020, às 9h00, realizou-se no auditório da
4 Fundação Hemoam, Bloco A, 2º andar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do
5 Amazonas – HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada, a Defesa de Dissertação de
6 Mestrado da discente **Lilyane de Amorim Xabregas** sob o título “**Estudo dos Polimorfismos nos**
7 **Genes dos TLRs em Pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA)**”, tendo
8 como orientador o Prof. Dr. **Allyson Guimarães da Costa** e coorientadora Profa. Dra. **Adriana**
9 **Malheiro Alle Marie** segundo encaminhamento do Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji, Coordenador
10 do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia e de acordo com os registros
11 constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi
12 composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido
13 atribuído ao aluno o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Profa. Dra. Leny Nascimento da Mota Passos – Presidente	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) ()	Assinatura:  CPF: 034 342 462-0
Profa. Dra. Lucivana Prata de Souza Mourão - UEA	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) ()	Assinatura:  CPF: 600 103 822-15
Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy - FMT-HVD	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) ()	Assinatura:  CPF: 230 600 55809

15
16 O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

17
18 Aprovado

19 Não Aprovado

20
21
22
23
24 
Presidente da Banca Examinadora

FICHA DE JULGAMENTO

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DOS TLRs EM PACIENTES
DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)**

LILYANE DE AMORIM XABREGAS

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas”.

Banca Julgadora:

Dra. Leny Nascimento da Motta Passos

Presidente

Dra. Lucivana Prata de Souza Mourão

Membro Externo

Dr. Rajendranath Ramasawmy

Membro Externo

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a **DEUS**, por me guiar e permitir chegar até aqui. Obrigada pelo
seu amor e graça constante em minha vida.

Aos meus amados pais, **Ezalina e Nelson**, meu porto seguro, pelo constante amor,
carinho, orações, exemplo de vida e me incentivarem sempre a buscar conhecimento.
Sou eternamente grata à Deus pela vida de vocês, são meus heróis, dedico a vocês a
minha gratidão e o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Sempre imaginei que chegar nessa parte da dissertação de agradecer sobre pessoas que fizeram parte dessa minha trajetória, seria complicado, talvez porque a vida não se coloca em análise de regressão e não é pelo valor p que descobrimos o significado das pessoas que passaram por nossa vida, então colocar em palavras ou números é difícil, mas tentarei expressar um pouco do meu agradecimento em algumas palavras.

Primeiramente, aos meus **irmãos**, pelas orações, apoio e incentivo direto ou indiretamente, em especial para a minha irmã **Lidyane Xabregas** que me recebeu e me acolheu em sua casa e sempre cuidou de mim com muito carinho, amor e dedicação. Eternamente grata!

Ao **Dr. Allyson Guimarães**, que resumi-lo apenas a meu orientador seria muito pouco frente a importância que tem na minha vida. Agradeço pelo exemplo de pesquisador e pessoa, pela dedicação, confiança, compreensão e pela oportunidade em poder ter sido sua aluna, foram duas iniciações científicas e o Mestrado com sua excelente orientação. Agradeço pelos seus valiosos ensinamentos e críticas construtivas, pois continuam sendo de grande contribuição para meu crescimento profissional e pessoal. Também agradeço pela compreensão que teve diante dos meus momentos de dificuldade (às vezes sendo como um pai, não apenas um orientador). Levo na minha vida como um grande amigo, que vou cultivar com muito amor, admiração e gratidão. Meu muito obrigada!

A **Dra. Adriana Malheiro**, minha coorientadora, pelo exemplo de pesquisadora e por me acolher em seu laboratório e grupo de pesquisa. Meu muito obrigada!

À maravilhosa **Andrea Tarragô**, pelos conselhos e paciência, que nos meus momentos de dúvidas e diversas aflições sempre se dispunha a me ouvir e me oferecer abraços e conselhos valiosos. Digo sempre que ela é um canal de benção na vida de muitos, e sou muito grata a Deus por tê-la colocado em minha vida, alguém que compartilha da mesma fé e me ajudou muito, principalmente, espiritualmente durante a minha iniciação científica e o mestrado, alguém para quem eu podia correr, pedir conselhos e restaurar a minha fé. Que tem um abraço de mãe, com aquela sensação de paz interior! Sou muito grata pela tua vida, pela pessoa que você é além do teu profissional. Muito Obrigada!

Ao pessoal do LABGEN **Nadja, Rechfy, Luciana, Victória, Gustavo e Dayana** que durante meu período de procedimentos laboratoriais foram essenciais para conclusão desse trabalho.

À **Dra. Miriam** do laboratório de HLA pela disponibilização das amostras de DNA, que foi de vital importância para o desenvolvimento do estudo, sou muito grata pela paciência e disponibilidade. Obrigada!

À **Dra. Aya** que foi muito acolhedora no período de estágio em docência. Obrigada pela oportunidade de nesse pequeno período tê-la tido como minha orientadora, poder aprender um pouco mais com uma professora e pesquisadora que ama e se dedica ao que faz. Seus ensinamentos são e serão muito importantes para mim e para a minha vida profissional. Muito Obrigada!

A minha amiga e parceira de mestrado **Fabíola Alves**, uma amizade maravilhosa da iniciação científica, que durante esses dois anos de mestrado passamos por muitos momentos juntas, por disciplinas, procedimentos laboratoriais, além de, momentos engraçados e outros desesperadores (kkkk). Sou muito grata pela sua parceria, por trilhar esse caminho com você, tornando-o mais leve e com muitas histórias para recordar. Grata a Deus por tê-la colocado em meu caminho!

Aos meus queridos **Maria Gabriela e Firmino** que durante sua iniciação científica fizeram parte do meu projeto e foram pessoas essenciais para o desenvolvimento desse estudo. Estiveram comigo na obtenção das amostras, coleta de dados, procedimentos laboratoriais, mas que também compartilhamos momentos de risos e conquistas. Sou muito grata por terem participado dessa minha trajetória, deixo o meu muito obrigada a vocês.

Ao meu amigo/irmão **Hiochelson Najibe**, o qual tenho a graça de ter amizade desde a iniciação científica, e desde então, compartilhando conhecimentos, aflições e muitas alegrias. Muito obrigada pela sua grande amizade, parceria, pelo ombro nos meus momentos que eu já não sabia o que fazer, obrigada pelos muitos abraços reconfortantes (cheios de amor e carinho) e por sempre torcer por mim. Te guardo e cultivo por toda a vida!

Aos amigos que conquistei ao longo desses anos: **Geyse, Alexander, Thainá Cardoso, Gláucia, Letícia**. Muito agradecida pela amizade, carinho, bate-papos e parceria constante de vocês. Muito Obrigada!

Aos amigos do grupo **“TRUPE-ALLYSON”**, pela amizade e espírito de equipe.

Aos amigos do Departamento de Ensino e Pesquisa (DEP), **Alessandra, Anny, Rafaela e Luan** que contribuíram de forma direta e indireta para o desenvolvimento desse trabalho, em especial a **Alessandra** com seu exemplo de profissional dedicada mostrando que nada é impossível ou muito difícil que não possa ser feito. Sou muito grata por cuidar tão bem de todos a tua volta, e por ter cuidado de mim durante esse mestrado. Muito Obrigada!

As queridas **Ivaldete e Myuki**, exemplos de profissionais que lutam pela pesquisa no Amazonas. Meu muito obrigada pelo constante incentivo e apoio!

A maravilhosa dona **Socorro** do COREME, pelos momentos de descontração e conselhos, mais uma mãezona. Meu muito obrigada pela sua amizade e carinho, te guardo pra vida. Grata!

Aos queridos **Alexandre** (SAME) e **Socorro** (Rosa Blaya), pela enorme disponibilidade em ajudar na coleta de dados e por me receber tão bem em seus setores durante esse período. Meu muito obrigada!

Aos **funcionários do HEMOAM**, que fazem com que tudo funcione da melhor maneira possível, em especial à maravilhosa dona **Sandra** (serviços gerais) que sempre me socorreu quando eu necessitava no laboratório, muito atenciosa e carinhosa e; aos **funcionários do restaurante** que também foram grandes incentivadores e me proporcionavam momentos de descontração e por vezes cuidando de mim nas enxaquecas (kkk). Meu muito obrigada a todos!

A todos da **Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)**, que autorizaram a realização dos meus experimentos no Laboratório de Genômica, muito grata pelo acolhimento, e por dispor de condições para que a minha pesquisa pudesse ser executada de forma adequada. Meu muito obrigada!

A **Universidade do Estado do Amazonas (UEA)** pela oportunidade de ser aluna do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH)**.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** pela Bolsa de Mestrado e auxílio financeiro. A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e o **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo auxílio financeiro.

EPÍGRAFE

A ciência é um grande quebra-cabeça com peças infinitas. É uma sucessão interminável de perguntas e respostas, que a cada peça que encaixamos, abrimos espaços que dão a oportunidade para construir novos caminhos a serem compreendidos.

- Lilyane Xabregas

DECLARAÇÃO AS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)**, responsável pelo pagamento da bolsa que colaborou para a realização deste estudo e auxílio financeiro via Programa Pró-Estado (Resolução nº 002/2008, 007/2018 e 005/2019). A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e o **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** que financiaram indiretamente essa pesquisa.

RESUMO

Introdução: As Leucemias Agudas são neoplasias malignas graves, que acometem crianças e adultos e tem grande incidência no Amazonas. Sua etiologia e patogênese ainda permanecem incertas, sendo considerada uma doença multifatorial. Frente, a essa necessidade de informações, autores como, Leo Kinlen e Mel Greaves, tem sugerido, por meio de pontos de vista diferentes, que o modo como o sistema imunológico de alguns indivíduos reconhece antígenos e responde aos mesmos representa um fator de risco para a leucogênese. Polimorfismos nos genes dos receptores TLRs, presentes na imunidade inata, podem conter grande influência na alteração do padrão de resposta do indivíduo, contribuindo para a resistência ou suscetibilidade de doenças infecciosas. **Objetivo:** Assim, nosso objetivo foi de avaliar a influência dos polimorfismos nos genes dos receptores TLRs no prognóstico clínico de pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA). **Material e Métodos:** Um estudo de caso-controle foi realizado com 152 amostras de DNA de pacientes com LLA e 187 amostras de indivíduos sem a doença (grupo controle). A discriminação genotípica e alélica foi realizada pelo método PCR-RFLP dos SNPs *rs5743618* (*TLR1 S602I*), *rs4986790* e *rs4986791* (*TLR4 A299G* e *I399T*), *rs5744105* (*TLR5 R392S*), *rs5743810* (*TLR6 S249P*), *rs5743836* e *rs187084* (*TLR9 -1237C/T* e *-1486C/T*) e molécula *rs2569191* (*CD14 -159*). A análise descritiva e estatística foi realizada com os softwares Microsoft Excel 2013 e GraphPadPrism v.5.0. **Resultados:** O genótipo C/C do polimorfismo *-1486 C/T (TLR9)* foi associado com o risco de desenvolvimento de leucemia linfóide aguda (*TLR9: T/T+C/T vs. C/C OR = 2,0 [95% CI: 1,1-3,5, p = 0,014]; C/T vs. C/C OR = 2,2, [IC 95%: 1,2–4,1, p = 0,006]*). Além disso, o genótipo TT do *SNP -1486 C/T (TLR9)* foi associado com a presença de comorbidades ao diagnóstico (*TLR9: T/T + C/T vs. C/C OR = 2,1 [95% CI: 1,1-4,3, p=0,04]; T/T vs. C/T OR = 2,2 [95% CI: 1,0-4,7, p=0,04]*). **Conclusão:** Nossos achados sugerem um papel significativo do *SNP -1486C/T (TLR9)* no desenvolvimento e presença de comorbidades infecciosas na leucemia linfóide aguda.

Palavras-chave: Leucemia Linfóide Aguda, Imunidade Inata, SNPs, TLRs.

ABSTRACT

Introduction: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common hematological neoplasm and the main cause of childhood mortality. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in key molecules of the immune system, such as Toll-Like receptors, are associated with the development of various diseases, however, their role in ALL is unknown. **Objective:** In this study, we described the frequency of Toll-Like receptor polymorphisms in patients with acute lymphoblastic leukemia and their association with clinical prognosis. **Material and Methods:** A case-control study was carried out with 152 DNA samples from patients with ALL and 187 samples from individuals without the disease (control group). Genotypic and allelic discrimination was performed using the Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism method (PCR-RFLP) for the *TLR1 S602I* (*rs5743618*), *TLR4 A299G* and *I399T* (*rs4986790* and *rs4986791*), *TLR5 R392S* (*rs5744105*), *TLR6 S249P* (*rs5743810*), *TLR9 -1237C/T* and *-1486C/T* (*rs5743836* and *rs187084*) and *CD14 -159* (*rs2569191*) polymorphisms. Descriptive and statistical analysis was performed using Microsoft Excel 2013 and GraphPad Prism v.5.0 software. **Results:** The C/C genotype from *-1486C/T* polymorphism (*TLR9*) was associated with the risk of development acute lymphoblastic leukemia (*TLR9*: T/T + C/T vs. C/C OR = 2.0 [95% CI: 1.1 -3.5, $p=0.01$]; C/T vs. C/C OR = 2.2 [95% CI: 1.2–4.1, $p=0.00$]). In addition, the T/T genotype from *-1486 C/T* (*TLR9*) was associated with the presence of comorbidities on diagnosis (*TLR9*: T/T C/T vs. C/C OR = 2.1 [95% CI: 1.1- 4.3, $p=0.04$]; T/T vs. C/T OR = 2.2 [95% CI: 1.0-4.7, $p=0.04$]). **Conclusion:** Our findings suggested a significant role for SNP *-1486 C/T* (*TLR9*) without the development and presence of infectious comorbidities in acute lymphoblastic leukemia.

Keywords: Acute Lymphoid Leukemia, Innate Immunity, SNPs, TLRs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação das leucemias.....	20
Figura 2: Classificação da FAB para a Leucemia Linfoide Aguda.....	24
Figura 3: Hipóteses sobre a etiologia da LLA baseada em infecções.....	28
Figura 4: Sinalização dos receptores do Tipo Toll-Like.	33
Figura 5: Análise dos Polimorfismo TLRs e CD14 em Pacientes com LLA por PCR-RFLP. Eletroforese em Gel de Agarose corados com brometo de etídio.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da OMS para a LLA.	25
Tabela 2: Descrição das sequências dos primers, ciclagens e enzimas de restrição dos polimorfismos em estudo, seguindo o protocolo descrito por COSTA et al., 2017	40
Tabela 3: Tamanho dos fragmentos e concentração dos géis de agarose dos polimorfismos, já descritos na literatura.	41

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

A:	Adenina (do inglês “ <i>Adenine</i> ”)
APCs:	Células Apresentadoras de Antígeno (do inglês “ <i>Antigen Presenting Cells</i> ”)
AR:	Alto Risco
Asp:	Ácido Aspártico (do inglês “ <i>Aspartic acid</i> ”)
BFM:	Berlim-Frankfurt-Münster
BR:	Baixo Risco
C:	Citosina (do inglês “ <i>Cytosine</i> ”)
CAAE:	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CTH:	Células Tronco Hematopoiéticas
CD14:	Cluster de diferenciação (do inglês “ <i>Cluster of Differentiation 14</i> ”)
CEP:	Comitê de Ética em Pesquisa
CFM:	Citometria de Fluxo Multiparamétrica
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês “ <i>Desoxiribonucleic Acid</i> ”)
CpG DNA:	5'—C—phosphate—G—3' DNA
DAMPs:	Padrões Moleculares Associados a Danos (do inglês “ <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> ”)
DCs:	Células Dendríticas (do inglês “ <i>Dendritic Cells</i> ”)
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos Trifosfato (do inglês “ <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> ”)
DRM	Doença Residual Mínima
DsRNA:	RNA de fita dupla (do inglês “ <i>Double-strand RNA</i> ”)
EBV:	Epstein-Barr virus
EDTA:	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (do inglês “ <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> ”)
FAB:	Franco-Americano-Britânico
G:	Guanina (do inglês “ <i>Guanine</i> ”)
GBTLI:	Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Infantil
g/dl:	Grama por decilitro
Gly:	Glicina (do inglês “ <i>Glycine</i> ”)
VHB:	Vírus da hepatite B
VHC:	Vírus da hepatite C
HLA:	Antígeno Leucocitário Humano (do inglês “ <i>Human Leukocyte Antigen</i> ”)
HTLV-I:	Vírus Linfotrófico T humano 1 (do inglês “ <i>Human T-lymphotropic virus 1</i> ”)

HEMOAM:	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
IC:	Intervalo de Confiança
IQR:	Intervalo Interquantil
IRF:	Fator Regulador de Interferon (do inglês " <i>Interferon Regulatory Factor</i> ")
IRAK:	Quinase Associada ao Receptor de Interleucina-1 (do inglês " <i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase</i> ")
IKK:	Inibidor da Kappa-B Quinase (do inglês " <i>Inhibitor of Kappa-B kinase</i> ")
LA:	Leucemias Agudas
LLA:	Leucemia Linfoide Aguda
LLA-B:	Leucemia Linfoide Aguda fenótipo tipo B
LLA-T:	Leucemia Linfoide Aguda fenótipo tipo T
LTB:	Leucemia Bifenotípica Aguda
LLC:	Leucemia Linfoide Crônica
LMA:	Leucemia Mieloide Aguda
LMC:	Leucemia Mieloide Crônica
LPS:	Lipopolissacarídeos
MAL:	Adaptador MyD88 (do inglês " <i>MyD88 adaptor-like</i> ")
MAPK:	Proteínas cinases ativadas por mitogênio (do inglês " <i>Mitogen-activated protein kinases</i> ")
MEC:	Matriz extracelular
MO:	Medula óssea
MyD88:	Fator de diferenciação mielóide 88 (do inglês " <i>Myeloid Differentiation Factor 88</i> ")
MPK:	Proteínas quinases ativadas por mitogênio (do inglês " <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> ")
NF-Kb:	Fator nuclear Kappa-B (do inglês " <i>Nuclear Factor Kappa-B</i> ")
NK:	Células Natural Killer
OMS:	Organização Mundial da Saúde
OR:	Odds Ratio
PAMPs:	Padrões Moleculares Associados à Patógenos (do inglês " <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> ")
Pb:	Pares de Base
PRRs:	Receptores de Reconhecimento Padrão (do inglês " <i>Pattern Recognition Receivers</i> ")
PCR:	Reação em cadeia da Polimerase (do inglês " <i>Polimerase Chain Reaction</i> ")
q:	Braço longo (do francês " <i>queue</i> ")

RFLP:	Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (do inglês " <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ")
RC:	Remissão Completa
RNA:	Ácido ribonucleico (do inglês " <i>Ribonucleic Acid</i> ")
RS:	Sequência de Referência (do inglês " <i>Reference string</i> ")
SAME:	Sistema de Atendimento Médico e Estatístico
SNC:	Sistema Nervoso Central
SNP:	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês " <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ")
ssRNA:	RNA de fita simples (do inglês " <i>single-stranded RNA</i> ")
T:	Timina (do inglês " <i>Thymine</i> ")
TBE:	Tris/Borato/EDTA
Thr:	Treonina (do inglês " <i>Threonine</i> ")
TIR:	Toll/Receptor Interleucina-1
TLRs:	Toll-like receptor
TLR-1:	Toll-like receptor 1
TLR-4:	Toll-like receptor 4
TLR-5:	Toll-like receptor 5
TLR-6:	Toll-like receptor 6
TLR-9:	Toll-like receptor 9
TRAF 3 e 6:	Fator associado ao receptor de fator de necrose tumoral 3 (do inglês " <i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i> ")
TRAM:	Molécula adaptadora relacionada ao TRIF (do inglês " <i>TRIF-related adapter molecule</i> ")
TRIF:	Interferon- β indutor de adaptador que contém o domínio TIR (do inglês " <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i> ")
UEA:	Universidade do Estado do Amazonas
UV:	Ultravioleta
μL:	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Leucemias Agudas.....	20
1.2	Epidemiologia.....	21
1.3	Manifestações Clínicas da LLA.....	22
1.4	Diagnóstico e Classificação	23
1.5	Tratamento.....	25
1.6	Etiopatogenia	27
1.7	Imunidade Inata.....	30
1.8	Receptores do Tipo Toll-Like (TLRs).....	31
1.9	Polimorfismos nos receptores TLR-1, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-9 e CD14.....	33
1.9.1	SNPs no TLR1 e TLR6	34
1.9.2	SNPs no TLR4 e CD14.....	34
1.9.3	SNPs no TLR5.....	35
1.9.4	SNPs no TLR9	35
2	OBJETIVO.....	35
2.1	Objetivo Geral.....	35
2.2	Objetivos Específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Tipo de Estudo	36
3.2	Comitê de Ética	36
3.3	Amostragem	37
3.4	Critérios de Elegibilidade	37
3.4.1	Critérios de Inclusão	37
3.4.1	Critérios de Não Inclusão	38

3.5	Crêterios de Exclusão.....	38
3.6	Coleta de Dados	38
3.7	Coleta de Amostras.....	38
3.8	Extra�o e Quantifica�o do DNA	39
3.9	Genotipagem dos Polimorfismos nos genes dos Receptores Toll-Like (PCR-RFLP)	39
3.9.1	Rea�o em Cadeia da Polimerase (PCR-RFLP)	40
3.10	Eletroforese:	41
3.11	Análise Descritiva e Estatística:	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Manuscrito 1 (Anexo 8.1).....	44
5	CONCLUSÃO.....	65
6	REFERÊNCIAS	65
7	APÊNDICES.....	74
7.1	Apêndice 01: Equipe do projeto.....	74
7.2	Apêndice 02: Financiamento do projeto.	74
7.3	Apêndice 03: Protocolos da PCR-RFLP	75
7.3.1	CD14 (-159).....	75
7.3.2	TLR1 (I602S).....	76
7.3.3	TLR4 (A299G).....	77
7.3.4	TLR4 (T399I)	78
7.3.5	TLR5 (R392S)	79
7.3.6	TLR6 (S249P).....	80
7.3.7	TLR9 (-1237C/T)	81
7.3.8	TLR9 (-1486C/T)	82

7.4	Apêndice 04: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa -cep-hemoam (CAAE:49652815.8.0000.0009) – Amostra Controle.....	83
7.5	Apêndice 05: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-HEMOAM (CAAE:0024.0.112.000-10) – Amostra Controle.....	86
7.6	Apêndice 06: Documento de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-HEMOAM – Amostra Caso.	88
8	ANEXOS.....	89
8.1	Manuscrito Submetido como primeiro Autor.	89
8.2	Artigos completos publicados em periódicos como colaborador. 113	
8.2.1	Artigo 1	113
8.2.2	Artigo 2	114
8.2.3	Artigo 3	115
8.3	Resumos em Anais de Eventos Científicos.....	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEUCEMIAS AGUDAS

As Leucemias consistem em um câncer hematológico heterogêneo, sendo descritas como uma proliferação clonal descontrolada de células progenitoras hematopoiéticas de origem mieloide ou linfoide. Sendo resultante de uma herança multifatorial, ocasionando um acúmulo de clones com mutações no órgão formador de células sanguíneas, denominado de medula óssea (1).

Várias linhagens celulares derivam desse órgão através de um processo chamado hematopoese, que consiste na produção de dois grupos de células, mieloide e linfoide, como ilustrado na figura 1. Podem ser classificadas como aguda ou crônica dependendo do ritmo de progressão e diferenciação das células, quando progredirem de forma rápida e com acúmulo excessivo de células imaturas (Blastos) na medula óssea e no sistema circulatório são classificadas como Leucemias Aguda e; Crônica quando apresentam uma progressão lenta com aumento de células maduras anormais (Figura 1) (1–3).

Figura 1: Classificação das leucemias.



Fonte: Autoria própria.

Entre os dois grupos de leucemia (aguda e crônica), destaca-se o grupo de Leucemias Agudas (LA) constituído por Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e Leucemia Linfóide Aguda (LLA). A LMA acomete tanto adultos quanto crianças, com maior número de casos em adultos acima de 50 anos. Caracteriza-se pela proliferação de células mielóides jovens, da linhagem granulocítica e não granulocítica, que impedem a função normal da medula óssea (4,5).

A LLA acomete outro grupo de células, os precursores das células linfóides que são essenciais para o sistema imunológico humano contra diversas infecções. É o tipo de câncer mais frequente na faixa etária infantil de 0 a 15 anos, constituindo uma das principais causas de mortalidade infantil (6). Essa neoplasia é caracterizada pelo acúmulo de células linfóides imaturas de linhagem B (LLA-B) e T (LLA-T), anormais na medula óssea, disseminando-se também para a corrente sanguínea e conseqüentemente para órgãos extramedulares, como o fígado, baço, linfonodos, testículos e sistema nervoso central (SNC) (7,8).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

As leucemias são uma das principais causas de morte por câncer no mundo, com aumento significativo do número de casos entre os anos de 1990 a 2018 (variando de 297.000 para 437.033 casos)(9). Representam 30% dos casos de câncer infantil, e nas últimas décadas vem sendo uma das principais causas de morte nas regiões das Américas, Ásia, Noroeste da África e Oriente Médio (2,10). Registros da OMS sobre mortalidade do câncer de 2008 a 2012 mostraram que as leucemias, tanto infantis quanto adultas, foram responsáveis por mais de 350 mil óbitos por ano, representando 3,3% de todas as mortes por câncer. Durante os anos de 1990 a 2012 houve aumento do número de novos casos de leucemia de 250 mil para 352 mil, respectivamente(11).

Entre crianças e adolescentes, grande parte são diagnosticados na forma aguda. A LLA corresponde por mais de 75% dos casos em crianças e adolescentes, com idade inferior a 15 anos e 80% dos casos na faixa etária inferior a 10 anos(12). Recentemente FILHO et al., (2018), demonstrou que em

países com índice de desenvolvimento humano crescente, localizados na América Central e do Sul, a taxa de leucemia linfóide aguda foi maior, principalmente no sexo masculino, apresentando assim, altas taxas no Equador (2,8 por 100.000), Costa Rica (2 por 100.000) e Colômbia (2 por 100 por 100.000) (13).

No Brasil, é esperado para o triênio 2020-2022 aproximadamente 10.810 mil casos de leucemia, desses 5.920 casos em homens e 4.890 em mulheres. Correspondendo a taxa de risco de aproximadamente 5,67 casos a cada 100 mil homens e 4,56 a cada 100 mil mulheres (14).

Na região Norte, especificamente no Estado do Amazonas, foram registrados 843 casos de LAs, sendo 577 casos de LLA e 266 casos referentes a LMA na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). A maior proporção de casos foi de Leucemia Linfóide Aguda (68,4%), durante os anos de 2005 a 2015(15).

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LLA

A LLA pode apresentar sintomas inespecíficos que porventura assemelham-se ao quadro clínico de outras patologias e podem variar dependendo do estado imunológico do paciente (16). O déficit na produção de células hematopoiéticas devido ao acúmulo de infiltrados de clones leucêmicos na medula óssea resultam no surgimento de sinais clínicos significativos como anemia, infecções, hemorragias e hematomas, provenientes da eritrocitopenia, leucopenia, neutropenia e trombocitopenia, respectivamente (17,18).

Pesquisas recentes descreveram que a febre e/ou infecção, fadiga e palidez (referentes a anemia), dores ósseas, artralgia ou marcha anormal são as apresentações clínicas mais comuns em pacientes com LLA. Além dos sintomas relacionados a infiltração em órgãos extramedulares como: hepatomegalia (fígado), esplenomegalia (baço), linfadenopatia (linfonodos), aumento testicular e infiltração do sistema nervoso central (SNC) também se apresentam como manifestações mais frequentes. Contudo, essas manifestações clínicas são inespecíficas e podem ser atribuídas a outras

doenças, capazes apenas de sugerir que a medula óssea esteja funcionando de forma inadequada (16–18).

1.4 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO

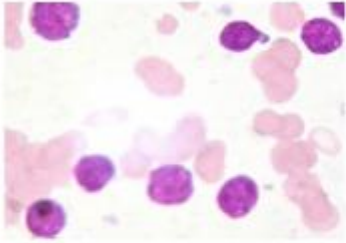
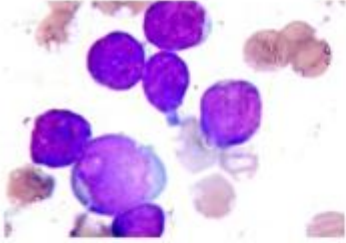
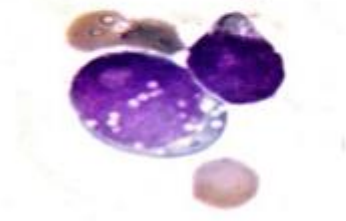
O diagnóstico é feito de forma gradativa, sendo realizado primeiramente a discriminação de uma LA de outras patologias hematológicas semelhantes. Posteriormente, é feita a distinção entre LLA e LMA, conseguinte a classificação, definindo os grupos de tratamento e prognóstico(19,20).

A morfologia celular de esfregaço de sangue de medula óssea é uma das primeiras técnicas realizadas para discriminação e distinção da LLA e LMA, porém pouco específica. Assim, é necessário, a inclusão de outros métodos adicionais, como a Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo Multiparamétrica (CFM). A CFM é o padrão ouro, capaz de determinar o perfil imunológico de uma célula, isto é, da sua linhagem, do seu estágio de diferenciação e de maturação, a partir da caracterização dos seus antígenos de superfície, citoplasma ou núcleo com anticorpos monoclonais marcados, possibilitando a diferenciação de casos diferenciados de LLA, além da caracterização de certos subgrupos de LMA e Leucemia Bifenotípica Aguda (LBA). Além do mais, essa técnica pode ser útil também como ferramenta para a detecção e monitoramento da doença residual mínima (DRM) durante o seguimento clínico dos pacientes (3,19,21).

Outras análises como a citogenética e análise molecular também são realizados para definição do diagnóstico, viabilizando informações sobre anormalidades na citogênese clonal e identificação de translocações cromossômicas que geram genes de fusão, que são importantes no prognóstico e o tratamento, respectivamente (22,23).

A separação dos subgrupos da LLA é realizada com o auxílio de sistemas de classificação. O primeiro a ser descrito foi o Franco-Americano-Britânico (FAB), que se baseia na morfologia e citoquímica da célula. Subdivide a LLA em três subgrupos do L1 ao L3, como ilustrado na figura 2 (24–26).

Figura 2: Classificação da FAB para a Leucemia Linfóide Aguda(26).

CLASSIFICAÇÃO FAB DA LEUCEMIA LINFOIDE														
	<p>L1 Leucemia Linfóide com Estrutura Homogênea</p> <p>Frequência: Entre 25% a 30% dos casos são em adultos, e 85% em crianças.</p> <p>Morfologia: Blastos são homogêneos, núcleo regular, cromatina homogênea, nucléolos pequenos ou inexistentes, citoplasma escasso e basofilia leve a moderada</p>	<p>Imunofenótipo:</p> <table border="0"> <tr> <td>B:</td> <td>T:</td> </tr> <tr> <td>CD19</td> <td>CD3</td> </tr> <tr> <td>CD22</td> <td>CD7</td> </tr> <tr> <td>CD79a</td> <td>CD5</td> </tr> <tr> <td>CD10</td> <td>CD2</td> </tr> <tr> <td>CD20</td> <td>CD4</td> </tr> </table> <p>Imunoglobulina citoplásmica ou superficial</p>	B:	T:	CD19	CD3	CD22	CD7	CD79a	CD5	CD10	CD2	CD20	CD4
B:	T:													
CD19	CD3													
CD22	CD7													
CD79a	CD5													
CD10	CD2													
CD20	CD4													
	<p>L2 Leucemia Linfóide com Estrutura Variada</p> <p>Frequência: 70% dos casos são em adultos, e 14% em crianças.</p> <p>Morfologia: Núcleo irregular, estrutura de cromatina homogênea pontilhada, nucléolos grandes</p>	<p>Imunofenótipo:</p> <table border="0"> <tr> <td>B:</td> <td>T:</td> </tr> <tr> <td>CD19</td> <td>CD3</td> </tr> <tr> <td>CD22</td> <td>CD7</td> </tr> <tr> <td>CD79a</td> <td>CD5</td> </tr> <tr> <td>CD10</td> <td>CD2</td> </tr> <tr> <td>CD20</td> <td>CD4</td> </tr> </table> <p>Imunoglobulina citoplásmica ou superficial</p>	B:	T:	CD19	CD3	CD22	CD7	CD79a	CD5	CD10	CD2	CD20	CD4
B:	T:													
CD19	CD3													
CD22	CD7													
CD79a	CD5													
CD10	CD2													
CD20	CD4													
	<p>L3 Linfoma de Burkitt</p> <p>Frequência: Subtipo raro, representando menos de 1% a 2% dos casos.</p> <p>Morfologia: Blastos grandes, nucléolos proeminentes, estrutura de cromatina homogênea pontilhada, citoplasma abundante, vacuolação abundante no citoplasma (tipo bolha) cobrindo o núcleo.</p>	<p>Imunofenótipo:</p> <table border="0"> <tr> <td>B:</td> <td>T:</td> </tr> <tr> <td>CD19</td> <td>CD3</td> </tr> <tr> <td>CD22</td> <td>CD7</td> </tr> <tr> <td>CD79a</td> <td>CD5</td> </tr> <tr> <td>CD10</td> <td>CD2</td> </tr> <tr> <td>CD20</td> <td>CD4</td> </tr> </table> <p>Imunoglobulina citoplásmica ou superficial</p>	B:	T:	CD19	CD3	CD22	CD7	CD79a	CD5	CD10	CD2	CD20	CD4
B:	T:													
CD19	CD3													
CD22	CD7													
CD79a	CD5													
CD10	CD2													
CD20	CD4													

Fonte: LADINES-CASTRO et al., 2016. Adaptado por Xabregas, 2020.

O segundo e atualmente mais utilizado sistema de classificação foi elaborado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2008, já com a exclusão da leucemia de células Burkitt, não sendo mais dita como uma entidade separada do linfoma de Burkitt. A classificação da OMS reflete o princípio de que essas neoplasias devem ser classificadas com base em suas características biológicas e moleculares, independentemente dos locais de envolvimento. Assim, categoriza a leucemia linfóide de linhagem de células B (LLA-B) em dois subtipos: LLA-B com anormalidades genéticas recorrentes (posteriormente delineada com base no rearranjo cromossômico específico presente) e LLA-B não especificada. Em 2016, uma nova atualização trouxe duas novas entidades provisórias que foram adicionadas à lista de

anormalidades genéticas recorrentes e a hipodiploidia foi redefinida como baixa hipodiploidia ou hipodiploidia com mutações de TP53, como demonstrado na Tabela 1 (25,27,28).

Tabela 1: Classificação da OMS para a LLA (12,27).

CLASSIFICAÇÃO DA OMS
Leucemia / linfoma linfóide de células B, não especificado de outra forma
<i>Leucemia / linfoma linfóide de células B, com anormalidades genéticas recorrentes</i>
Leucemia / linfoma linfóide de células B com hipodiploidia
Leucemia / linfoma linfóide de células B com hiperdiploidia
Leucemia / linfoma linfóide de células B com t (9; 22) (q34; q11.2) [<i>BCR-ABL1</i>]
Leucemia / linfoma linfóide de células B com t (v; 11q23) [<i>MLL</i> reorganizado]
Leucemia / linfoma linfóide de células B com t (12; 21) (p13; q22) [<i>ETV6-RUNX1</i>]
Leucemia / linfoma linfóide de células B com t (1; 19) (q23; p13.3) [<i>TCF3-PBX1</i>]
Leucemia / linfoma linfóide de células B com t (5; 14) (q31; q32) [<i>IL3-IGH</i>]
Leucemia / linfoma linfóide de células B com amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (iAMP21) ^a
Leucemia / linfoma linfóide de células B com translocações envolvendo tirosina-quinases ou receptores de citocinas (' <i>BCR-ABL1</i> ') ^a
<i>Leucemia / linfomas linfóide de células T</i>
Leucemia linfóide precursora de células T precoces ^a

Abreviaturas: LLA, leucemia linfóide aguda; OMS, Organização Mundial de Saúde.^aEntidade provisória.

Fonte: TERWILLIGER et. al., 2017. Adaptado por Xabregas, 2020.

1.5 TRATAMENTO

De modo geral o tratamento da LLA é fundamentado no regime de vários quimioterápicos utilizados de forma simultânea. As diversas fases do tratamento são denominadas de sistema poliquimoterápico e tem como finalidade levar a destruição das células leucêmicas, ou seja, a remissão completa (RC) para que a medula óssea retorne a sua hematopoese normal (24,29).

O tratamento da LLA é baseado na estratificação por grupos de risco, que são classificados de acordo com o risco de falha no tratamento, em Baixo Risco (BR) ou Alto Risco (AR). Algumas características relacionadas ao paciente podem influenciar no prognóstico, tais como idade, contagem inicial de leucócitos, infiltração do SNC ou do testículo, características genéticas e imunofenotípicas da explosão leucêmica e a resposta individual à terapêutica (30–32).

Algumas anormalidades citogenéticas, permitem uma classificação molecular de risco, favoráveis ou desfavoráveis. As alterações ditas como favoráveis (ou baixo risco) mais bem estudadas incluem a alta hiperdiploidia e a translocação ETV6/RUNX1. Quanto as associadas ao grupo de desfecho desfavorável (ou alto risco), incluem a fusão BCR-ABL, uma translocação no cromossomo 9, locus 22, conhecida como o cromossomo Filadélfia, rearranjos no do gene *MLL* no cromossomo 11q23 e, mais recentemente, a amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (30,32,33).

Entre os diversos protocolos de tratamento para LLA infantil no Brasil, o mais utilizado é o criado pelo Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda na Infância (GBTLI) em 1980, que oferece menor risco de toxicidade, sendo atualmente utilizada a sua sexta versão (GBTLI-2009). O mesmo é composto por fases de indução, consolidação e manutenção onde são usadas doses de quimioterápicos de acordo com a estratificação dos grupos de risco (34,35).

A fase de indução tem uma duração de 35 dias com finalidade de remissão completa das células leucêmicas, através do uso de antineoplásicos como corticóides, vincristine, L-asparaginase e daunoblastina, até alcançar cerca de 80% da taxa de cura, seguindo assim para as fases de consolidação e manutenção (34).

Apesar do objetivo da quimioterapia ser aumentar a sobrevida do paciente, a mesma também tem um alto risco de ocasionar enorme fragilidade ao sistema imunológico do mesmo, visto que as leucemias e linfomas apresentam maior debilidade imunológica por impedirem o funcionamento

normal da medula óssea, devido ao impacto na produção das células do sistema imunológico, deixando o paciente mais suscetível a infecções (35).

1.6 ETIOPATOGENIA

A hematopoiese normalmente produz uma população de células-tronco hematopoiéticas (CTH) pluripotentes e autorrenováveis capazes de dar origem as células sanguíneas. O processo autônomo de diferenciação dessas células ao longo da hematopoese é controlado por fatores de transcrição que regulam a expressão gênica, resultantes das interações celulares, expressão de citocinas ou de receptores e moléculas de adesão. Segundo a literatura, alterações em genes que regulam esse processo (diferenciação, proliferação, reparo e morte celular) culminam na produção de fenótipos malignos que alteram a função normal das células, resultando na leucogênese (3,7,36).

A etiologia das leucemias agudas ainda permanece idiopática, porém já foram descritos alguns fatores possivelmente implicados no desenvolvimento do processo leucêmico, como exemplo a exposição prolongada ao benzeno e produtos petrolíferos que são associados à danos cromossômicos ao longo dos anos (37). Além disso, a exposição a pesticidas, radiação não iônica, corantes capilares, dieta, tabagismo, distúrbios genéticos, imunodeficiências e infecções por vírus como o HTLV-I (Human T-lymphotropic virus 1), EBV (Epstein-Barr virus) e bactérias como *Helicobacter pylori* também estão relacionados a esse processo (2,3,37).

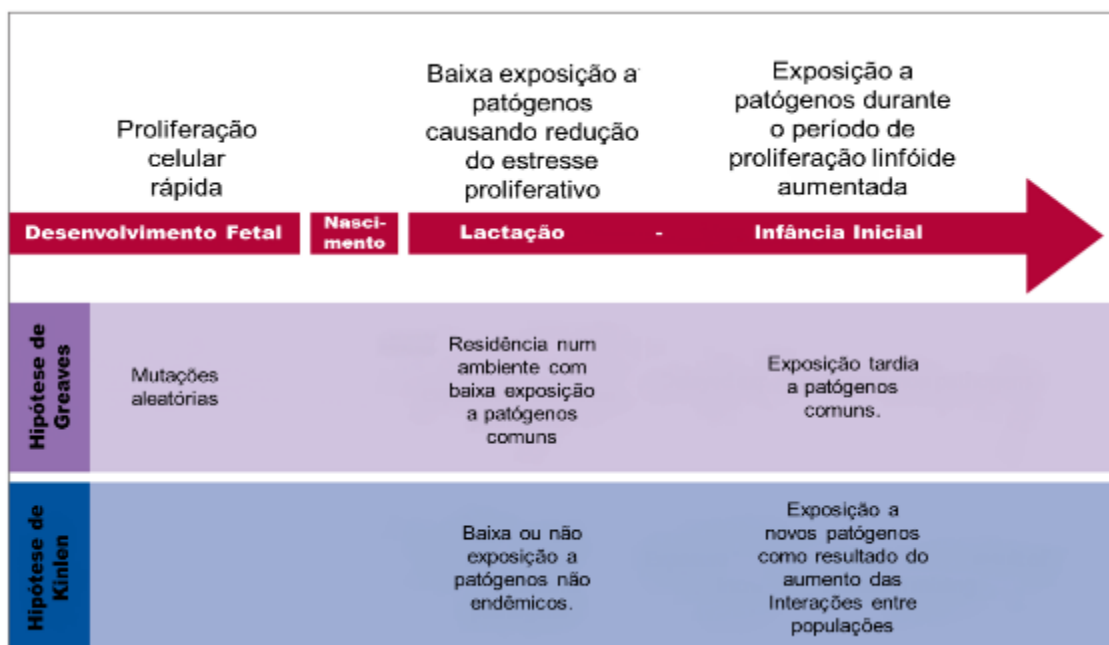
Alguns estudos também sugerem que o modo como o sistema imunológico de algumas pessoas reconhece antígenos e responde aos mesmos é visto como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da leucemia, levando ao estudo de polimorfismos genéticos presentes em moléculas do sistema imunológico (37).

A teoria de que a leucemia seja causada por influência de alguma infecção já vem sendo discutida há décadas, porém poucos avanços foram observados quando demonstrou-se que não se tratava de uma doença contagiosa. No entanto, pesquisas recentes retornaram a essa hipótese, em

virtude de muitos casos de leucemias pediátricas surgirem como consequência de uma resposta anormal frente a uma infecção comum. Além de relatos de leucemias espontâneas em animais domésticos, principalmente gatos (conhecido como vírus da leucemia felina) terem em parte a influência de infecções virais (37–39).

A interação do sistema imunológico com as leucemias agudas tem produzido discussões com base em duas teorias principais, criadas a partir da observação de pesquisadores como Leo Kinlen e Mel Greaves. Esses, descrevem a partir de pontos de visão diferentes, teorias que a leucemia infantil pode ser proveniente de uma resposta imune anormal a infecções comuns, como resumido na figura 3 (40–45).

Figura 3: Hipóteses sobre a etiologia da LLA baseada em infecções(45).



Fonte: PUI, CHING-HON et. al., 2008. Adaptado por Xabregas, 2020.

Segundo Kinlen, devido a ocorrência de um grande influxo de pessoas da cidade de Londres para uma área rural da Escócia no final da década de 80, como consequência da Segunda Guerra Mundial, notou-se um aumento transitório de leucemias agudas em crianças. Em vista disso, após a elaboração de 8 estudos independentes com foco epidemiológico, Kinlen

sugeriu que a leucemia aguda na infância entre crianças de faixa etária de 5 a 14 anos, seria resultado de uma infecção comum e com baixa patogenicidade em crianças não imunizadas que entraram em contato com indivíduos infectados por determinado vírus, trazendo então a hipótese oriunda das “Interações entre populações” (41,43).

Essa hipótese foi questionada por outros autores trazendo resultados prós e contra. Langford em seu estudo demonstrou resultados estatisticamente significativos de mortalidade (RR=1,41, IC 95%=1,13-1,76) em crianças de faixa etária similar que entravam em conformidade com a hipótese de Kinlen. No entanto, outras pesquisas não demonstraram associação do influxo de pessoas com aumento da LLA. Em resumo, especula-se atualmente que os picos de incidência de leucemia aguda infantil, principalmente o subtipo LLA B comum, são mais frequentes em comunidades isoladas, quando comparado a grandes centros urbanos que de forma diferente, apesar da grande mistura populacional, demonstram uma redução de casos de leucemias agudas (41,43,44).

Em relação a hipótese elaborada por Greaves, conhecida como "Hipótese da infecção tardia", essa traz uma concepção mais biológica da suposta causa da LLA. O pesquisador propõe a partir da observação de análises epidemiológicas publicadas por diversos pesquisadores ingleses e principalmente com os estudos de Kinlen, uma nova porta de visão com foco para os mecanismos reguladores da resposta imune, tanto inata como adaptativa, na qual aborda duas teorias (38,41).

A primeira traz a ideia da evolução do sistema imunológico, tanto inato como adaptativo, de forma a antecipar e exigir uma exposição a infecções durante o período perinatal e os primeiros anos de vida, uma vez que a exposição precoce a infecções é essencial para o equilíbrio e regulação do sistema imunológico, com impactos duradouros na função imunológica no decorrer da vida. Entretanto, déficits dessa experiência microbiana natural, em especial nas sociedades desenvolvidas (ou modernas) acaba gerando um sistema imunológico pouco preparado para resposta a infecções, ocasionando uma resposta desregulada a infecções comuns podendo promover ou

desencadear o risco da LLA. Considerando assim o paradoxo do progresso de uma sociedade versus infecções, sugeriu-se que o fator de risco esteja na baixa exposição das pessoas a infecções durante o período perinatal e infantil (40–42,46,47).

A segunda proposição se refere a dois prováveis eventos, com relação a história natural da doença. Especula-se que a LLA se desenvolve por dois eventos críticos, o primeiro no útero e o segundo com eventos mutacionais pós-natal que induzem o estado de leucogênese. Supondo então que uma resposta anormal a infecções estaria indiretamente associada ao desenvolvimento de eventos mutacionais secundários necessários para o desenvolvimento da leucemia (41).

O estudo de mecanismos relacionados a influência microbiana no câncer ainda são pouco conhecidos, no entanto, estão começando a ser mais explorados com base principalmente ação do metabolismo alterado e as funções do sistema imunológico serem cruciais para o melhor esclarecimento da relação entre inflamação e o aumento da suscetibilidade ao câncer (41).

Portanto, baseado nesse contexto, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) presentes em vias relevantes para resposta na exposição pré-natal (vias das respostas imunes e nos genes das citocinas) podem proporcionar informações valiosas e propor hipóteses de que as infecções são vistas cada vez mais como a possível e mais plausível causa da LLA. No entanto, essa afirmativa necessita de mais evidências biológicas e genéticas para esclarecer o impacto das infecções sobre o risco de leucemias. Quanto as hipóteses anteriormente descritas, há uma forte evidência de que a leucemia infantil assim como algumas doenças autoimunes, podem ser evitadas se o sistema imunológico da criança for estimulado durante os primeiros anos de vida (40,41).

1.7 IMUNIDADE INATA

A imunidade inata está estritamente envolvida nos processos infecciosos, representando a primeira resposta imune do organismo contra diversos microrganismos e tumores (48,49).

O processo de resposta ocorre a partir do reconhecimento de substâncias provenientes de microrganismo denominados de PAMPs (Padrões Moleculares Associados à Patógenos) que são essenciais para a sobrevivência do patógeno, como: açúcares, ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, peptídeos e entre outros(50). Tanto PAMPs como DAMPs (Padrões Moleculares Associados à Danos) são reconhecidos pelos chamados PRRs (Receptores de Reconhecimento Padrão) também denominados de Receptores de Reconhecimento Padrão, presentes nas APCs (Células Apresentadoras de Antígenos) independente da memória imunológica (53–55). Os PRRs possuem padrões de expressão distintos, ativam vias de sinalização específicas e conduzem a respostas a patógenos de forma distinta (50).

O principal grupo de receptores envolvidos nesse processo, são da família dos TLRs (Receptores do tipo Toll-Like), que reconhecem peptidoglicanos, ácidos nucleicos e lipopolissacarídeos (LPS), iniciando a cascata de sinalização e ativando vários sistemas efetores a jusantes, incluindo a MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) e IRFs (*Interferon Regulatory Factor*), que são capazes de modular a apoptose, proliferação e migração celular, além da inflamação (51–53).

Pesquisas recentes sugerem que o processo de ativação autócrina e parácrina dos mediadores das vias de sinalização do sistema imunológico, para expressão de genes associados a fatores de crescimento e inflamatórios, é capaz de amplificar a inflamação e promover o estado neoplásico (54–56).

1.8 RECEPTORES DO TIPO TOLL-LIKE (TLRs)

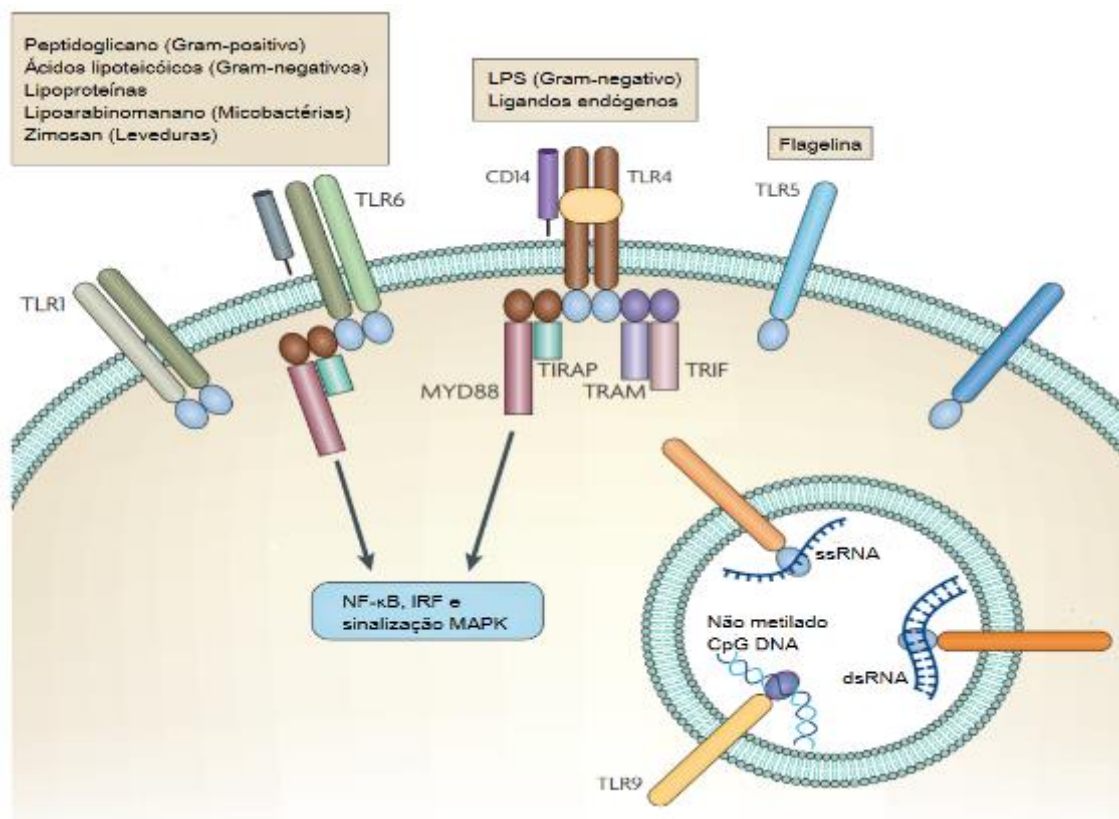
Os TLRs foram descritos no final do século XX e compreendem uma família de receptores composta por 13 membros, altamente conservados evolutivamente, com apenas 10 receptores funcionais em humanos. Esses TLRs diferenciam-se nas suas cadeias de aminoácidos, as quais constituem a proteína que os formam, proporcionado assim uma maior diversidade e capacidade de reconhecer diferentes classes de moléculas biológicas presentes em diversos microrganismos (PAMPs). São vitais para o sistema imune inato e a regulação da ativação da imunidade adquirida (55,57–59).

Esses receptores são constituídos estruturalmente por repetições ricas em leucina (LRR), uma glicoproteína com cauda N-terminal e sítio de ligação da molécula ligante reconhecida e um domínio intracelular homólogo ao domínio, denominado de TIR (Receptor Toll de Interleucina I). Possui ainda uma cauda C-Terminal com sítios responsáveis pelas cascatas de sinalização intracelular e recrutamento de moléculas adaptadoras específicas que também possuem um domínio do tipo TIR (60). As proteínas adaptadoras MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88), TRIF (Ticam), MAL (Tirap) e TRAM são essenciais para a transdução do sinal na cascata de sinalização desses receptores (61–63).

Os 10 TLRs funcionais em humanos estão presentes em diversas células do organismo, especialmente em células do sistema imune inato como as APCs (Antigen Presenting Cells), células B e também em células epiteliais e fibroblastos. Esses receptores estão localizados tanto na membrana citoplasmática como no endossoma, sendo que os TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 e TLR-11 encontram-se na extremidade superficial da célula reconhecendo principalmente peptídeos exógenos e os TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9 em compartimentos intracelular como no endossoma reconhecendo moléculas endógenas (Figura 4)(64,65). Além disso, esses receptores podem atuar no reconhecimento de PAMPs formando estruturas diméricas com moléculas co-receptoras como o CD14 (cluster of differentiation 14). Essa molécula é expressa na superfície de algumas células fagocíticas, participando no reconhecimento de Lipopolissacarídeos (LPS) no complexo TLR-4/CD14, ativando a produção de citocinas via NF- κ B, como ilustrado na figura 4 (66).

Em geral esses receptores ativam uma cascata de sinalização através da via dependente da molécula adaptadora MyD88, com exceção para o TLR-3 que é ativado pela via TRIF, molécula independente de MyD88. Após o reconhecimento dos ligantes, ocorre a ativação de uma gama de proteínas incluindo IRAK, TRAF3 e TRAF6, juntamente com a indução de fosforilação e a formação de complexos IKK que levam a ativação de fatores de transcrição de genes como NF- κ B e IRF3 e IRF7 resultando na produção de citocinas inflamatórias, regulação da resposta imune e proliferação celular (59,65,67,68)

Figura 4: Sinalização dos receptores do Tipo Toll-Like.



Fonte: RAKOFF-NAHOUM, SETH et. al., 2009(69). Adaptado por Lilyane Xabregas (2020).

1.9 POLIMORFISMOS NOS RECEPTORES TLR-1, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-9 E CD14.

As doenças neoplásicas, especificamente as LAs, possuem alto risco de complicações infecciosas graves, principalmente associado a quimioterapia e ao uso de alguns corticosteroides que prejudicam a função fagocítica de células do sistema imune como neutrófilos, monócitos e macrófagos (55,70–74).

Polimorfismos nos TLRs têm sido associados a suscetibilidade a infecções por microrganismos e pela constante neutropenia em pacientes com leucemia aguda. Alterações genéticas no grupo de genes do TLR1-TLR6-TLR10 foram descritos como fatores de risco para o câncer de próstata e colorretal, além da leucemia linfocítica crônica (LLC) (75,76).

Estudos no gene *TLR3* sugerem que polimorfismos nesse receptor podem induzir a suscetibilidade para o câncer de nasofaringe, enquanto que polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) no gene *TLR4/CD14* e *TLR9* têm sido descritos como fatores de risco para complicações infecciosas na LMA e na LLA (66,77,78). SNPs no *TLR5* podem estar relacionados ao aumento do risco do câncer gástrico e alto de infecções por *H. pylori* (79). Já alterações nos aminoácidos do gene que compõe a proteína TLR-7 e TLR-8 são associados ao risco de Linfoma de Hodgkin (55,56,76).

1.9.1 SNPs no TLR1 e TLR6

O gene que codifica as proteínas do receptor TLR-1 e TLR-6 foram mapeados no braço curto do Cromossomo 4, locus 4p14. Esses receptores estão localizados na superfície da membrana citoplasmática podendo reconhecer lipoproteínas/ lipopeptídeos, peptideoglicanos, ácido lipoteicóico e lipoarabinomano de bactérias (gram-negativas e gram-positivas), âncoras de GPI (protozoários) e zimozan e glicolipídeos (fungo). Foram descritos dois polimorfismos, sendo um no *TLR1*, éxon 4, posição 12765 do gene, gerando a substituição de uma isoleucina para uma serina e resultando no *SNP Ile602Ser* (*rs5743618*). O outro no *TLR6*, éxon 2, posição 33089, com a substituição de uma serina por uma prolina e resultando no *SNP Ser249Pro* (*rs5743810*)(50).

1.9.2 SNPs no TLR4 e CD14

O gene que codifica a proteína do TLR-4, receptor de superfície celular, foi mapeado no braço longo do cromossomo 9, locus 9q32-q33. TLR-4 reconhece LPS microbiano (Lipopolissacarídeo), proteínas de choque térmico 70 (Hsp70), âncoras GPI e o DNA de *Trypanosoma cruzi* e âncoras de GPI de *Plasmodium*. Enquanto que a molécula CD14, co-receptor do TLR-4, foi mapeado no braço longo do cromossomo 5, locus 5q23-q31. A partir desse mapeamento genético, foram descritas duas alterações polimórficas no gene do *TLR4*, do tipo SNP, o primeiro com a modificação de uma adenina par uma guanina, gerando a formação de um ácido aspártico por uma glicina na região 299 (*Asp299Gly* [*rs4986790*]) e outra uma transição de uma citosina para uma

timina, substituindo uma treonina por uma isoleucina no resíduo 399 (*Thr399Ile* [rs4986791]). Além de, um SNP (-159) na região promotora do gene do *CD14* (77,78,80).

1.9.3 SNPs no TLR5

O gene que codifica a proteína do TLR-5, receptor de superfície celular, foi mapeado no braço longo do cromossomo 1, lócus 9q41-q42. Esse receptor reconhece flagelina de algumas bactérias gram-positivas e negativas. Estudos descrevem um SNP, referente a substituição de uma citosina por uma timina, resultando em um *Stopcodon* na posição 392 (*R392S* [rs5744105]) no gene do *TLR5*(81–83).

1.9.4 SNPs no TLR9

O gene que codifica a proteína do TLR-9, presente em compartimentos intracelular, está localizado no braço curto do cromossomo 3, *locus* 3q21.3. Reconhece componentes internos como os ácidos nucleicos (DNA e RNA) de vírus, bactérias e protozoários. Estudos descreveram a presença de alguns polimorfismos nesse gene, como a substituição de uma citosina por uma timina nas regiões promotoras -1237 e -1487 resultando nos *SNPs* -1237C/T (*rs187084*) e -1486C/T (*rs5743836*) (50).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar a influência dos polimorfismos nos genes dos receptores TLRs no prognóstico clínico de pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Estimar a frequência dos polimorfismos nos genes dos receptores *TLR1*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR6*, *TLR9* e *CD14* em indivíduos diagnosticados com LLA;
- ✓ Investigar a associação dos polimorfismos nos genes dos receptores *TLR1*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR6*, *TLR9* e *CD14* com a presença de comorbidades infecciosas, recaída e óbito em indivíduos diagnosticados com LLA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

O desenho do estudo abrangeu duas abordagens epidemiológicas. A primeira foi um estudo do tipo transversal, onde avaliou-se a associação dos SNPs com a LLA, utilizando assim, dois grupos: o grupo caso (pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda) e um grupo controle (indivíduos que não possuem diagnóstico de doenças hematológicas). Enquanto a segunda analisou a influência dos SNPs com as variáveis sociodemográficas, clínicas e laboratoriais com o estudo do tipo caso-controle.

3.2 COMITÊ DE ÉTICA

As amostras controles utilizadas nesse projeto foram obtidas de projetos aprovados pelos Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) intitulados *“Identificação e Seleção de Peptídeos Miméticos Reativos aos soros de pacientes HCV+ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática in vitro”* e *“Avaliação do perfil Celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na Cidade de Manaus”*, coordenados pela Dra. Adriana Malheiro Alle Marie e Dra. Laura Patrícia Viana Chaves, respectivamente. Ambos os projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética em

Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas sob os respectivos números de CAAE: 49652815.8.0000.0009 e CAAE 0024.112.000-10 (Apêndice 04 e 05).

Quanto ao grupo de caso, as amostras foram disponibilizadas pela DNAteca do laboratório de tipagem de HLA da Fundação HEMOAM com CEP-HEMOAM, projeto intitulado “*Estudo dos Polimorfismos nos Genes dos Receptores e Citocinas da Imunidade Inata em Pacientes Diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA)*”, tendo como coordenador o Dr. Allyson Guimarães da Costa, com número do parecer 3.393.207 (Apêndice 06).

3.3 AMOSTRAGEM

Neste estudo foram utilizadas um total de 339 amostras, segregadas em dois grupos: Grupo caso, com 152 amostras biológicas de pacientes com LLA, diagnosticados por avaliação do mielograma e imunofenotipagem celular, estando criopreservadas na biblioteca de DNA do laboratório de tipagem de compatibilidade, coletadas no período de 2010 a 2017 e; Grupo controle, com 187 amostras de candidatos a doação de sangue com sorologia negativa para os patógenos pesquisados na doação de sangue (HBV, HCV, HIV, HTLV, Sífilis, Malária e Doença de Chagas), coletadas no período de janeiro a dezembro de 2015.

Todas as amostras biológicas utilizadas no estudo são procedentes do Estado do Amazonas, localizado na região Norte do Brasil, armazenadas na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). O HEMOAM está localizado na capital do estado, Manaus, sendo responsável por todas as atividades relacionadas a hematologia e hemoterapia no estado do Amazonas, além de atender pacientes oriundos de outras regiões da Amazônia brasileira.

3.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

3.4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para o grupo de caso foram considerados como critérios de inclusão pacientes de faixa etária geral, ambos os sexos, não aparentados, que apresentarem o diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda por meio da técnica de imunofenotipagem e possuírem amostras criopreservadas na DNAteca do laboratório de tipagem de HLA da Fundação HEMOAM. Quanto ao grupo controle, foram inclusos indivíduos que não apresentarem diagnóstico de doenças hematológicas e que forem candidatos à doação de sangue na Fundação HEMOAM e testes sorológicos e moleculares padrão negativos.

3.4.1 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Foram cessados do estudo portadores de qualquer outra doença hematológica.

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas amostras de DNA insuficientes ou com baixa concentração sendo inviável para análise, pacientes que apresentarem histórico de transplante medular, infecções clínicas antes da quimioterapia e portadoras de imunodeficiência adquirida.

3.6 COLETA DE DADOS

A coleta de dados clínicos e demográficos foi realizada com o apoio da equipe do Sistema de Atendimento Médico e Estatístico (SAME) do HEMOAM. Os dados foram extraídos a partir de prontuários físicos e eletrônicos. As informações como gênero, idade, hemograma, presença de comorbidades Doenças infecciosas (ex. Citomegalovírus, toxoplasmose, rubéola, varicela, doenças parasitárias, dentre outros), recaída e óbito.

3.7 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de DNA dos pacientes foram obtidas da DNAteca do laboratório de tipagem de HLA da Fundação HEMOAM, coletadas no período de 2010 a 2017. A coleta foi realizada por punção venosa de aproximadamente 4mL de amostra de sangue em tubos com sistema a vácuo, contendo EDTA (*BD Vacutainer® EDTA K2*) com diagnóstico confirmado pela técnica de citometria de fluxo. Quanto as amostras do grupo controle foram coletados aproximadamente 12 mL de sangue periférico por punção venosa em tubos com sistema a vácuo, contendo EDTA (*BD Vacutainer® EDTA K2*), Citrato de Sódio (*BD Vacutainer® de Citrato de Sódio Tamponado*) e com Gel separador (*Gel BD SST® II Advance®*) para a realização do Hemograma, Testes Bioquímicos e Sorologias, respectivamente.

3.8 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A extração do DNA genômico das amostras de sangue (grupo de caso) da DNAteca do laboratório de tipagem de HLA da Fundação HEMOAM, foi realizada com o *illustra triplePrep Kit® Genomicprep DNA Extration* (GE Healthcare Life Sciences) e pelo BIOPUR Kit extração Mini Spin plus® (Möbius Life Science) seguindo as orientações descritas no protocolo do fabricante. Quanto as amostras do grupo de caso, foram extraídas utilizando o Kit *QIAmp DNA* (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA), seguindo as orientações descritas no protocolo do fabricante. Após a extração o material genético de ambos os grupos de estudo, foram quantificadas em equipamento *NanoDrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific Inc) para análise da concentração dos ácidos nucleicos e seu grau de pureza, sendo em seguida congeladas a temperatura de -20°C.

3.9 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DOS RECEPTORES TOLL-LIKE (PCR-RFLP)

Os polimorfismos em estudo foram genotipados pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) associada à discriminação alélica feita pela

análise de polimorfismos por Fragmentos de Restrição (RFLP) no Laboratório de Genômica 1 e 2 da Fundação HEMOAM.

3.9.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-RFLP)

A PCR foi realizada utilizando primers e ciclagens específicas (tabela 2). Em seguida, foi realizada a reação de restrição através da técnica de PCR-RFLP onde utilizou-se enzimas específicas para cada polimorfismo, com a amplificação realizada em Termociclador da Applied Biosystems (Veriti® 96 Well Thermal Cycler, Carlsbad, USA) de acordo com programa descrito para cada marcador, como demonstrado na tabela 2 (Apêndice 03).

Tabela 2: Descrição das sequências dos primers, ciclagens e enzimas de restrição dos polimorfismos em estudo, seguindo o protocolo descrito por COSTA et al., 2017(84).

SNPs	Sequência de Primers (5' - 3')	Protocolo de PCR	Enzima de Restrição
<i>rs5743618</i> (TLR1)	Forward: GGAAAGTTATAGAGGAACCCT	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 55°C por 30" e 72°C por 30", 1 ciclo de 72°C por 7'	<i>AluI</i>
	Reverse: CTTCACCCAGAAAGAATCGTGCC		
<i>rs4986790</i> (TLR4)	Forward: GATTAGCATACTTAGACTACCTCCATG	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 56°C por 30" e 72°C por 30", 1 ciclo de 72°C por 7'	<i>NcoI</i>
	Reverse: GATCAACTTCTGAAAAGCATTCCCAC		
<i>rs4986791</i> (TLR4)	Forward: GGTTGCTGTTCTCAAAGTTTTGGGAGAA	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 15", 60°C por 15" e 72°C por 30", 1 ciclo de 72°C por 7'	<i>Hinf-I</i>
	Reverse: ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT		
<i>rs5744105</i> (TLR5)	Forward: GGTAGCCTACATTGATTTGC	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 62°C por 30" e 72°C por 30", 1 ciclo de 72°C por 7'	<i>Ddel</i>
	Reverse: GAGAATCTGGAGATGAGGTACCCG		
<i>rs5743810</i> (TLR6)	Forward: GCATTTCCAAGTCGTTTCTATGT	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 63°C por 30" e 72°C por 30", 1 ciclo de 72°C por 7'	<i>Avall</i>
	Reverse: GCAAAAACCCCTCACCTTGTT		
<i>rs187084</i> (TLR9)	Forward: CTGCTTGCAGTTGACTGTGT	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 59°C por 30" e 72°C for 45", 1 ciclo de 72°C por 7'	<i>BstNI</i>
	Reverse: ATGGGAGCAGAGACATAATGGA		
<i>rs5743836</i> (TLR9)	Forward: TATCGTCTTATCCCCTGCTGGAATGT	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 59°C por 30" e 72°C por 30", 72°C por 7'	<i>AfIII</i>
	Reverse: TGCCCAGAGCTGACTGCTGG		
<i>rs2569191</i> (CD14)	Forward: GTGCCAACAGATGAGGTTTAC	1 ciclo a 94°C por 5', 35 ciclos de 94°C por 30", 64°C por 30" e 72°C por 1', 1 ciclo 72°C por 10'	<i>Ava II</i>
	Reverse: GCCTCTGACAGTTTATGTAATC		

*rs: Sequência Referente; #F: Forward; #R: Reverse.

Após a amplificação do DNA, o amplicon foi submetido à técnica de RFLP, onde produto da PCR foi digerido com as enzimas de restrição *AluI*, *NcoI*, *HinfI*, *DdeI*, *Avall*, *BstNI*, *AfIII*, fabricadas pela *BioLabs®*, *New England*, *Ipswich*, *MA*, *USA*, referentes a cada polimorfismo em estudo, descritos na tabela 3. Onde retirou-se 10uL do produto da PCR e reposto com 5uL do mix de clivagem contendo a enzima de restrição da região referente ao SNP, em seguida as amostras foram submetidas a incubação em overnight no termobloco (ThermoStat plus, Eppendorf) às temperaturas correspondentes ao polimorfismo (Apêndice 03).

3.10 ELETROFORESE:

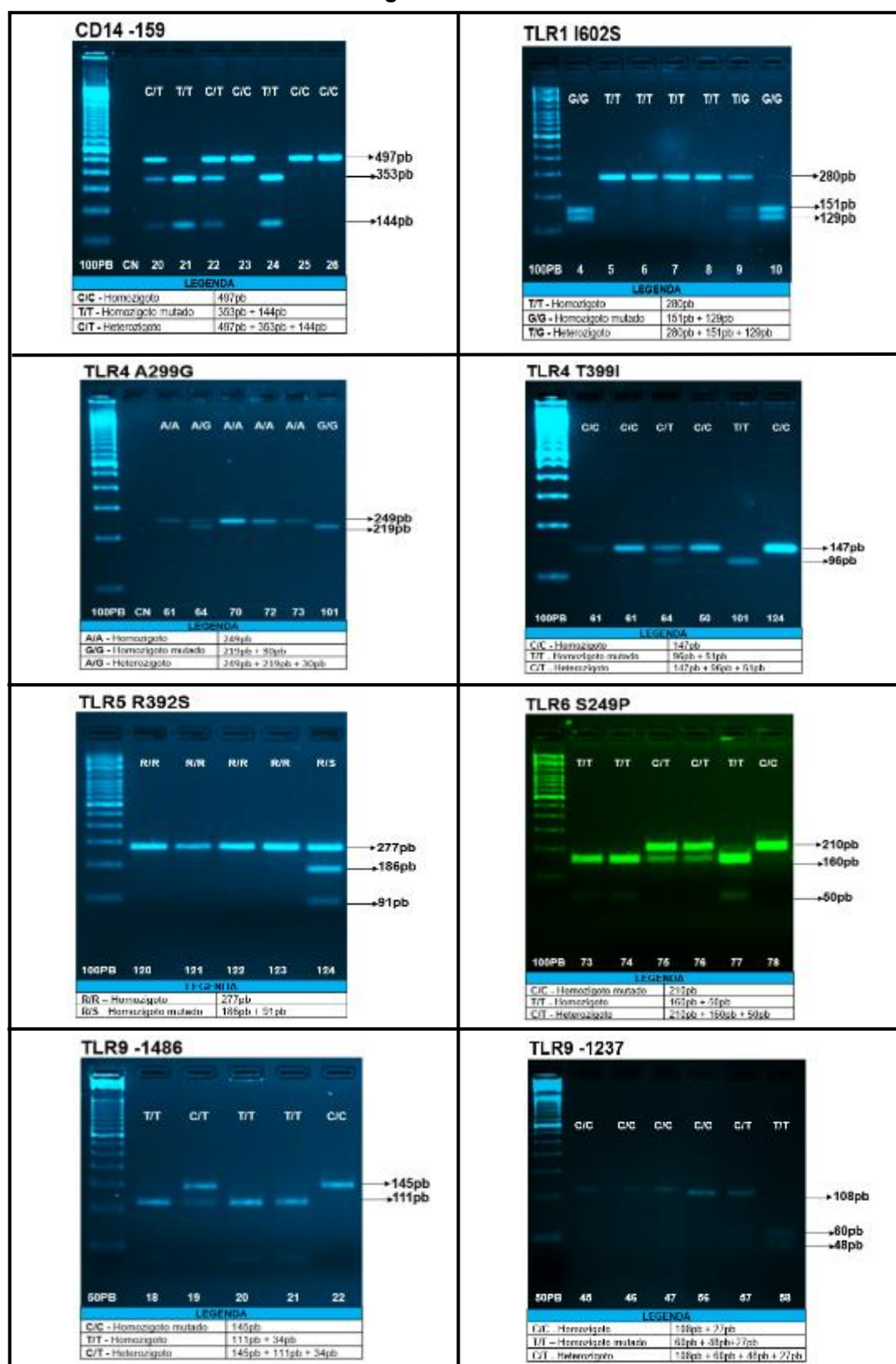
O produto da PCR-RFLP foi analisado por eletroforese em gel de agarose em Tampão TBE 1X (Tris-borato-EDTA), corado com Brometo de Etídeo e visualizados por fluorescência UV no Transluminador da *BIO-RAD* (*Molecular Imager® Gel Doc™ XR+*, *Imaging System*) utilizando o marcador de peso molecular de 50pb e 100pb, de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA obtido (tabela 3), sendo as imagens dos géis capturadas por sistema de fotodocumentação (figura 5), protocolo descrito no Apêndice 03.

Tabela 3: Tamanho dos fragmentos e concentração dos géis de agarose dos polimorfismos, já descritos na literatura.

Polimorfismos	Fragmentos	Agarose %	Marcador(pb)
<i>TLR1 I602S (rs5743618)</i>	T: 280 G: 151+129	3%	100pb
<i>TLR4 A299G (rs4986790)</i>	A: 259 G: 239+20	4%	100pb
<i>TLR4 T399I (rs4986791)</i>	C: 147 T: 96+51	4%	100pb
<i>TLR5 R392S (rs5744105)</i>	C: 277pb T: 186+91	3%	50pb
<i>TLR6 S249P (rs5743810)</i>	C: 210 T: 160+50	3%	50pb
<i>TLR9 -1237C/T (rs187084)</i>	C: 108+27 T: 60+48+27	4%	50pb
<i>TLR9 -1486C/T (rs5743836)</i>	C: 145 T: 111+34	4%	50pb
<i>CD14 -159 (rs2569191)</i>	C: 497 T: 353+144	2%	100pb

*rs: Sequência de Referência; #bp: Pares de bases.

Figura 5: Análise dos Polimorfismo TLRs e CD14 em Pacientes com LLA por PCR-RFLP. Eletroforese em Gel de Agarose corados com brometo de etídio.



Fonte: Acervo pessoa

3.11 ANÁLISE DESCRITIVA E ESTATÍSTICA:

As variáveis sociodemográficas foram tabuladas e armazenadas no banco de dados criado com o software Microsoft Excel® v.2013. A análise estatística e descritiva foi realizada utilizando o Stata v.13 (StataCorp LP, CollegeStation, TX, EUA) e GraphPadPrism v.5 (San Diego, CA, EA), com níveis de significância de 5%. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95% (IC95%). O modelo de regressão logística univariada foi utilizado para investigar a associação entre polimorfismos com a ocorrência de LLA e a presença de comorbidades infecciosas, recaída e óbito nos pacientes. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi determinado pela comparação das frequências observadas e esperadas dos genótipos e alelos estudados e foi aplicado nos dois grupos pelo site <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

MANUSCRITO 1 – SNPs nos genes do Toll-Like Receptores associados a Leucemia Linfoblástica Aguda e Comorbidades infecciosas em pacientes da Amazônia Brasileira. Lilyane Amorim Xabregas^{1,2}, Fabíola Silva Alves^{1,2}, Maria Gabriela Almeida Rodrigues³, Firmino Martins Santos-Neto², Gláucia Lima Souza^{1,2}, Fábio Magalhães Gama⁴, Marlon Wendell Athaydes Kerr^{1,2}, Andréa Monteiro Tarragô^{1,2}, Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago^{1,2}, Maria Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho^{1,2}, Adriana Malheiro^{1,2,3,4}, Allyson Guimarães Costa^{1,2,3,4,5*}.

Hematological Oncology (Submetido).

4.1 MANUSCRITO 1 (ANEXO 8.1)

SNPs nos genes do Toll-Like Receptores associados a Leucemia Linfoblástica Aguda e Comorbidades infecciosas em pacientes da Amazônia Brasileira

Lilyane Amorim Xabregas^{1,2}, Fabíola Silva Alves^{1,2}, Maria Gabriela Almeida Rodrigues³, Firmino Martins Santos-Neto², Gláucia Lima Souza^{1,2}, Fábio Magalhães Gama⁴, Marlon Wendell Athaydes Kerr^{1,2}, Andréa Monteiro Tarragô^{1,2}, Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago^{1,2}, Maria Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho^{1,2}, Adriana Malheiro^{1,2,3,4}, Allyson Guimarães Costa^{1,2,3,4,5*}

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;
2. Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil;
3. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;
4. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;
5. Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil;

***Corresponding author:** Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, Manaus, AM, CEP 69050-001, Brazil. Phone: +55 (92) 98153-5233. E-mail: allyson.gui.costa@gmail.com.

RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a neoplasia hematológica mais comum e a principal causa de mortalidade na infância. Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) em moléculas-chave do sistema imunológico, como os receptores Toll-Like, estão associados ao desenvolvimento de várias doenças, todavia, é desconhecido seu papel na LLA. Nesse estudo, descrevemos a frequência dos polimorfismos nos genes dos receptores Toll-Like em pacientes com leucemia linfoblástica aguda e sua associação com o prognóstico clínico. Um estudo caso-controle foi realizado com 152 amostras de DNA de pacientes com LLA e 187 amostras de indivíduos sem a doença (grupo controle). A discriminação genotípica e alélica foi realizada pelo método Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) dos SNPs *TLR1 S602I (rs5743618)*, *TLR4 A299G e I399T (rs4986790 e rs4986791)*, *TLR5 R392S (rs5744105)*, *TLR6 S249P (rs5743810)*, *TLR9 -1237C/T e -1486C/T (rs5743836 e rs187084)* e molécula *CD14 -159 (rs2569191)*. A análise descritiva e estatística foi realizada com os softwares Microsoft Excel 2013 e GraphPadPrism v.5.0. O *genótipo C/C* do polimorfismo *-1486 C/T (TLR9)* foi

associado com o risco de desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda (TLR9: T/T+C/T vs. C/C OR = 2.0 [95% CI: 1.1-3.5, $p = 0,014$]; C/T vs. C/C OR = 2.2, [IC 95%: 1.2–4.1, $p = 0,006$]). Além disso, o genótipo TT do SNP -1486 C/T (TLR9) foi associado com a presença de comorbidades ao diagnóstico (TLR9: T/T + C/T vs. C/C OR = 2.1 [95% CI: 1.1-4.3, $p=0,04$]; T/T vs. C/T OR = 2.2 [95% CI: 1.0-4.7, $p=0,04$]). Nossos achados sugerem um papel significativo do SNP -1486C/T (TLR9) no desenvolvimento e presença de comorbidades infecciosas na leucemia linfoblástica aguda.

Palavras-Chave: Leucemia infantil, Sistema Imunológico, Receptores do Tipo Toll-Like, Polimorfismo de Nucleotídeo Único.

1. INTRODUÇÃO

As leucemias são uma das principais causas de morte por câncer no mundo, com aumento significativo do número de casos entre os anos de 1990 a 2018 (variando de 297.000 para 437.033 casos)¹. No Brasil, é esperado para o triênio 2020-2022, aproximadamente 10.810 casos novos em ambos os sexos². Na região Norte do país, as leucemias são o quinto tipo de câncer mais frequente e o Estado do Amazonas registrou entre os anos de 2005 a 2015, 843 casos de pacientes com Leucemias Agudas, sendo 68% dos casos diagnosticados como Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) 2–4.

A LLA é o subtipo mais comum na infância sendo responsável pela maior taxa de mortalidade infantil na faixa etária de 0 a 15 anos^{3–5}. O processo neoplásico é decorrente de erros genéticos que contribuem para o bloqueio da maturação das células e conseqüente acúmulo de clones leucêmicos (blastos) no microambiente medular. Sua etiologia ainda é desconhecida, no entanto, alguns fatores de riscos são associados, dentre eles, fatores ambientais, genéticos e infecciosos^{6,7}.

Evidências de estudos anteriores sugerem que a LLA esteja relacionada a um déficit na regulação do sistema imunológico no início da infância^{8–13}. Além disso, sugere-se que polimorfismos ou variações genéticas nos genes de moléculas importantes no desenvolvimento e progressão de doenças, podem se mostrar fatores importantes no aumento de diferenças biológicas

intrínsecas, influenciando em resultados clinicamente distintos e conferindo suscetibilidade genética ao câncer^{14,15}.

O sistema imunológico compara-se à uma via com duas rotas prováveis, onde a regulação adequada proporciona longevidade e proteção contra doenças infecciosas e cancerígenas, enquanto que alterações em moléculas responsáveis pela expressão ou sinalização das células associadas ao sistema imunológico podem induzir processos autoimunes e carcinogênicos, dentre eles, as neoplasias hematopoéticas^{16–18}.

Os receptores Toll-Like compõem a principal família de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) do sistema imunológico inato, envolvido no combate a patógenos e inflamação, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e danos (DAMPs) e modulando a resposta imunológica com a ativação de células que medeiam a resposta imune. Além disso, os TLRs são moléculas vitais na regulação da ativação da imunidade adaptativa e essenciais na prevenção e cura do câncer ^{19–22}.

Pesquisas referentes a variações genéticas no grupo de genes dos TLRs, são vistos como fatores de risco para o câncer de próstata, colo retal, além de linfomas não-hodgkin de células B ^{14,23–26}. Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) nos genes dos TLRs podem levar a alterações no sistema imunológico e variações foram identificadas em diferentes tipos de tumores, tanto tumores sólidos como na transformação maligna hematológica^{18,20–23}. No entanto, o papel de genes imunogênicos que desempenham papel crucial na LLA, ainda são poucos elucidados.

Nesse estudo, os SNPs foram identificados nos genes do TLRs e no co-receptor CD14 em pacientes diagnosticados com LLA no Estado do Amazonas, com objetivo principal de descrever a frequência desses polimorfismos na doença e influência no prognóstico clínico. Esse é o primeiro estudo a relatar a associação de SNPs na via dos receptores Toll-Like em pacientes com leucemia linfoblástica aguda da Amazônia brasileira.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1Características das Amostras

O estudo caso-controle foi realizado no Estado do Amazonas, região Norte do Brasil, com amostras biológicas coletadas durante os anos de 2010 a 2017 na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). O HEMOAM está localizado na capital do estado, Manaus, sendo responsável por todas as atividades relacionadas a hematologia e hemoterapia no estado do Amazonas, além de atender pacientes oriundos de outras regiões da Amazônia brasileira.

Foram utilizadas um total de 339 amostras, segregadas em dois grupos: Grupo caso, com 152 amostras biológicas de pacientes com LLA, diagnosticados por avaliação do mielograma e imunofenotipagem celular, estando criopreservadas na biblioteca de DNA do laboratório de tipagem de compatibilidade e; Grupo controle, com 187 amostras de candidatos a doação de sangue com sorologia negativa para os patógenos pesquisados na doação de sangue (HBV, HCV, HIV, HTLV, Sífilis, Malária e Doença de Chagas).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM), sob o número de parecer 3.393.207/2019.

2.2Coleta de Dados dos Pacientes com LLA

A coleta de dados clínicos e demográficos foi realizada com o apoio da equipe do Sistema de Atendimento Médico e Estatístico (SAME) do HEMOAM. Os dados foram extraídos a partir de prontuários físicos e eletrônicos. As informações como gênero, idade, hemograma, presença de comorbidades (Doenças infecciosas e outros), recaída e óbito.

2.3Coleta de dados e amostras do grupo controle

Inicialmente foi aplicado questionário clínico-epidemiológico e posteriormente coletados aproximadamente 12mL de sangue periférico por punção venosa em tubos com sistema a vácuo contendo EDTA e com Gel

Separador (Gel BD SST® II Advance) para a realização de hemograma, testes bioquímicos e sorologia, respectivamente.

2.4 Genotipagem dos polimorfismos nos genes do TLR1, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9 e CD14

Os SNPs *TLR1* I602S (*rs5743618*), *TLR4* A299G (*rs4986790*), *TLR4* T399I (*rs4986791*), *TLR5* R392StopCodon (*rs5744105*), *TLR6* S249P (*rs5743810*), *TLR9* -1237C/T (*rs187084*), *TLR9* -1486 C/T (*rs5743836*) e *CD14* -159 (*rs2569191*), foram genotipados utilizando a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição por reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP) para a discriminação de genótipos e alelos descritos anteriormente(84). Para a PCR-RFLP, inicialmente foi feita a extração do DNA com o *illustra triplePrep Kit® Genomicprep DNA Extration* (GE Healthcare Life Sciences), *BIOPUR Kit extração Mini Spin plus®* (Möbius Life Science) e *QIAmp DNA kit* (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) para os grupos caso e controle, respectivamente. Em seguida, foi realizada a reação de PCR com 2µL de DNA genômico (20ng) adicionado a 23µL de mistura de amplificação contendo 0,1µL de polimerase taq de platina (2UI), 2,5µL de tampão 10x (continha 100 mmol/L Tris-HCl [pH 8,3] e 500mmol/L KCL), 2µL de MgCl₂ (1,5mmol/L), 1µL de dNTPs (40mmol/L), 0,25µL cada de iniciador Forward e reverso (0,25pmol/L) e 16,9µL de água ultrapura. Um total de 10µL de produto de PCR foi digerido com 5U da respectiva endonuclease de restrição (New England Biolabs) e 10x tampão enzimático de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores, condições de ciclo de PCR e endonucleases de restrição são mostrados na tabela suplementar 1. Os fragmentos gerados por PCR-RFLP foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3-4% corado com Coloração em Gel de Ácido Nucleico GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, EUA) e visualizados no transiluminador UV light Gel + DocXR System (Bio-Rad Corporation, Hercules, CA, EUA) com sistema de documentação fotográfica.

2.5 Análises de dados e Estatística

As variáveis sociodemográficas foram tabuladas e armazenadas no banco de dados criado com o software Microsoft Excel® v.2013. A análise

estatística e descritiva foi realizada utilizando o Stata v.13 (StataCorp LP, CollegeStation, TX, EUA) e GraphPadPrism v.5 (San Diego, CA, EA), com níveis de significância de 5%. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95% (IC95%). O modelo de regressão logística univariada foi utilizado para investigar a associação entre polimorfismos com a ocorrência de LLA e a presença de comorbidades infecciosas, recaída e óbito nos pacientes. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi determinado pela comparação das frequências observadas e esperadas dos genótipos e alelos estudados e foi aplicado nos dois grupos pelo site <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

3. RESULTADOS

3.1 Características gerais da população de estudo

Na Tabela 1, estão descritas as características epidemiológicas e clínicas da população em estudo. A idade mediana foi de 30 anos para o grupo controle e de 12 anos para o grupo de caso. Foi observado predomínio do sexo masculino em ambos os grupos (controle e caso), 133 (71%) e 95 (62%). Quanto a presença de comorbidades, 69 (45%) apresentaram comorbidade durante o diagnóstico, sendo 66 (96%) de etiologia infecciosa (ex. Citomegalovírus, toxoplasmose, rubéola, varicela, doenças parasitárias, dentre outros). Um total de 114 (75%) pacientes recaíram durante o período de tratamento e 67 (44%) foram a óbito (Tabela 1). Além disso, os pacientes apresentaram mediana da concentração de hemoglobina de 8.6 g/dL, hematócrito 25.1 g/dL, leucócitos 9.435/mm³ e plaquetas em 58.000/mm³.

Tabela 1: Características epidemiológicas e clínicas da população em estudo.

Variáveis	Grupo Controle (n = 187)	Casos LLA (n = 152)
Idade, ano (mediana [IQR*])	30 [23-39]	12 [4-18]
Gênero		
Masculino, n (%)	133 (71%)	95 (62%)
Feminino, n (%)	54 (29%)	57 (38%)
Comorbidades		
Sim n (%)	-	69 (45%)
Doenças Infecciosas, n (%)	-	66 (96%)
Outras, n (%)	-	3 (4%)
Não, n (%)	-	83 (55%)
Recaída		
Sim, n (%)	-	114 (75%)
Não, n (%)	-	38 (25%)
Óbito		
Sim, n (%)	-	67 (44%)
Não, n (%)	-	85 (56%)
Hemoglobina , g/dL (mediana [IQR])	-	8.6 [6.5-10.1]
Hematócrito , % (mediana [IQR])	-	25.1 [20.2-30.7]
Leucócitos , unid x 10 ³ /mm ³ (mediana [IQR])	-	9.435 [3.388-57.850]
Plaquetas , unid x 10 ⁶ /mm ³ (mediana [IQR])	-	58.000 [24.000-152.800]

*IQR: Intervalo Interquantil.

3.2 Associação do Polimorfismo TLR9 -1486C/T com Leucemia Linfóide Aguda

Na Tabela 2, estão descritas as distribuições genótípicas e alélicas dos SNPs em estudo. Foi observada uma diferença significativa na distribuição dessas frequências entre o grupo caso e controle no SNP TLR9 -1486 C/T. O genótipo homozigoto selvagem (C/C) referente ao SNP -1486 C/T sugeriu um risco aumentado em duas vezes para o desenvolvimento da LLA (TLR9: T/T+C/T vs. C/C OR = 2.0 [95% CI: 1.1-3.6, p=0,01]; C/T vs. C/C OR = 2.3 [IC 95%: 1.2–4.2, p=0,00]). Entretanto, não observamos associação com o alelo C referente ao SNP (OR: 1.2 [IC 95%: 0.9 – 1.6, p=0,27]).

Tabela 2: Associação dos polimorfismos TLRs e CD14 com pacientes com Leucemia Linfóide Aguda.

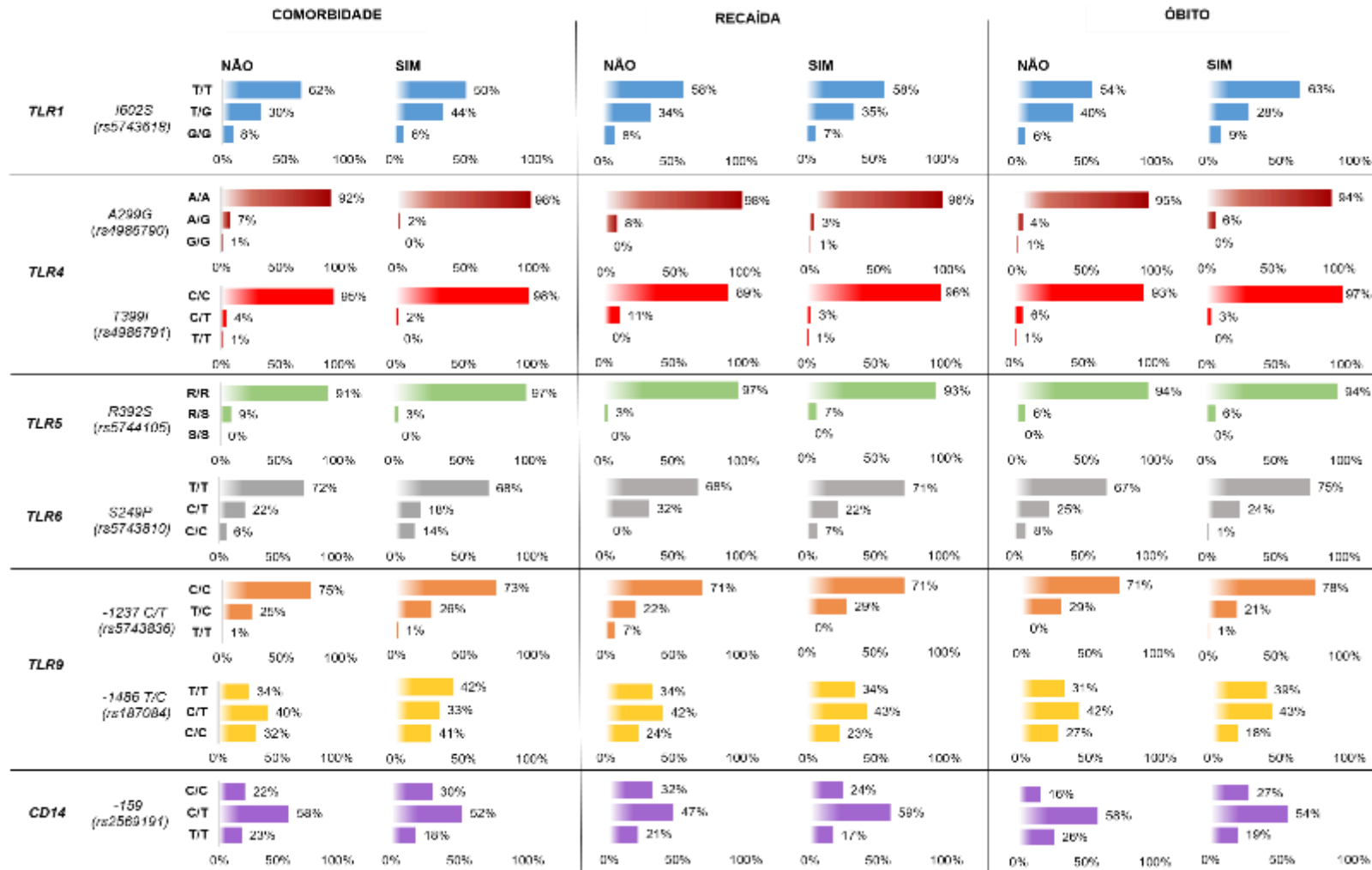
Polimorfismo, Genótipo / Alelo	Grupo Controle (n = 187)	Casos LLA (n = 152)	OR** (*IC 95%)	(p) valor*	
TLR1 I602S (rs5743618)					
T/T	100 (54%)	88 (58%)	1,2 (0,8-1,8)	0,45	T/T vs T/G + G/G
T/G	72 (39%)	53 (35%)	1,2 (0,8-1,9)	0,49	T/T vs T/G
G/G	15 (7%)	11 (7%)	1,2 (0,5-2,8)	0,68	T/T vs G/G
T	272 (73%)	229 (75%)			
G	102 (27%)	75 (25%)	1,1 (0,8-1,6)	0,49	
TLR4 A299G (rs4986790)					
A/A	177 (95%)	144 (95%)	1,0 (0,4-2,6)	0,97	A/A vs A/G + G/G
A/G	10 (5%)	7 (4%)	1,2 (0,4-3,1)	0,77	A/A vs A/G
G/G	-	1 (1%)	-	-	-
A	364 (97%)	295 (97%)			
G	10 (3%)	9 (3%)	1,1 (0,4-2,8)	0,82	
TLR4 T399I (rs4986791)					
C/C	180 (97%)	144 (95%)	1,4 (0,5-4,0)	0,60	C/C vs C/T + T/T
C/T	7 (3%)	7 (4%)	1,2 (0,4-3,6)	0,79	C/C vs C/T
T/T	-	1 (1%)	-	-	-
C	367 (98%)	295 (97%)			
T	7 (2%)	9 (3%)	1,6 (0,6-4,3)	0,45	
TLR5 R392S (rs5744105)					
R/R	177 (95%)	143 (94%)	1,1 (0,4-2,8)	0,82	R/R vs R/S
R/S	10 (5%)	9 (6%)	-	-	-
S/S	-	-	-	-	-
R	364 (97%)	295 (97%)			
S	10 (3%)	9 (3%)	1,1 (0,4-2,8)	0,82	
TLR6 S249P (rs5743810)					
T/T	125 (67%)	107 (70%)	1,2 (0,7-1,9)	0,56	T/T vs C/T + C/C
C/T	57 (30%)	37 (24%)	1,3 (0,8-2,1)	0,27	T/T vs C/T
C/C	5 (3%)	8 (6%)	0,5 (0,2-1,7)	0,39	T/T vs C/C
T	307 (82%)	251 (83%)			
C	67 (18%)	53 (17%)	1,0 (0,7-1,5)	0,92	
TLR9 -1237 C/T (rs5743836)					
C/C	121 (65%)	112 (74%)	1,5 (1,0-2,4)	0,08	C/C vs C/T + T/T
T/C	66 (35%)	39 (25%)	1,6 (1,0-2,5)	0,08	C/C vs C/T
T/T	-	1 (1%)	-	-	-
C	308 (82%)	263 (87%)			
T	66 (18%)	41 (13%)	1,4 (0,9-2,1)	0,17	
TLR9 -1486 T/C (rs187084)					
T/T	61 (33%)	52 (34%)	2,0 (1,1-3,6)	0,01	T/T+C/T vs C/C
C/T	102 (55%)	65 (43%)	1,7 (0,9-3,2)	0,11	T/T vs C/C
C/C	24 (12%)	35 (23%)	2,3 (1,2-4,2)	0,00	C/T vs C/C
T	224 (60%)	169 (56%)			
C	150 (40%)	135 (44%)	1,2 (0,9-1,6)	0,27	
CD14 -159 (rs2569191)					
C/C	55 (29%)	40 (26%)	1,2 (0,7-1,9)	0,55	C/C vs C/T + T/T
C/T	93 (50%)	85 (56%)	1,2 (0,8-2,1)	0,44	C/C vs C/T
T/T	39 (21%)	27 (18%)	1,0 (0,5-1,8)	1,00	C/T vs T/T
C	203 (54%)	165 (54%)			
T	171 (46%)	139 (46%)	1,0 (0,7-1,4)	1,00	

*IC: Intervalo de Confiança; **OR: Odds Ratio.

3.3 Associação dos Polimorfismos em TLR9 -1486C/T com Comorbidades Infecciosas em Pacientes com Leucemia Linfóide Aguda

Na Figura 1, observa-se a distribuição da frequência dos genótipos entre as variáveis clínicas estudadas (comorbidades infecciosas, recaída e óbito no grupo caso. Tabela 3 resume os dados de associação dos polimorfismos com as variáveis clínicas. Pacientes com LLA com o genótipo T/T do SNP -1486 C/T (TLR9) apresenta um risco de duas vezes mais chances de possuírem comorbidades infecciosas ao longo do acompanhamento clínico (TLR9: T/T + C/T vs. C/C OR = 2.1 [95% CI: 1.1-4.3, p=0,04]; T/T vs. C/T OR = 2.2 [95% CI: 1.0-4.7, p=0,04]). Ao analisar as variáveis recaída e óbito, não foi observada associação com os SNPs em estudo. Na Tabela 4, é possível observar que não foi encontrada associação dos alelos com as variáveis clínicas.

Figura 1: Distribuição das frequências dos genótipos TLRs e CD14 entre as variáveis clínicas em pacientes com Leucemia Linfóide Aguda.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 3: Associação dos genótipos TLRs e CD14 com comorbidades (doenças infecciosas), recaída e óbito em pacientes com Leucemia Linfóide Aguda.

Polimorfismo		Subgrupos LLA						
		Comorbidades		Recaída		Óbito		
		OR (IC 95%)	(p) valor	OR (IC 95%)	(p) valor	OR (IC 95%)	(p) valor	
TLR1	I602S (rs5743618)	1,6 (0,8-3,1)	0,19	1,0 (0,5-2,1)	1,00	1,4 (0,7-2,7)	0,32	T/T vs. T/G + G/G
		1,8 (0,9-3,6)	0,12	1,0 (0,5-2,3)	1,00	1,6 (0,8-3,3)	0,22	T/T vs. T/G
		0,9 (0,2-3,4)	1,00	1,1 (0,3-4,6)	1,00	1,3 (0,4-4,6)	0,76	T/T vs. G/G
TLR4	A299G (rs4986790)	5,8 (0,7-48,1)	0,14	1,9 (0,4-8,2)	0,41	1,3 (0,3-5,3)	0,73	A/A vs. A/G + G/G
		4,9 (0,6-42,1)	0,14	2,3 (0,5-10,9)	0,37	1,7 (0,4-7,9)	0,70	A/A vs. A/G
		-	-	-	-	-	-	-
TLR4	T399I (rs4986791)	1,7 (0,4-6,5)	0,50	3,2 (0,8-13,6)	0,11	2,5 (0,5-12,7)	0,47	C/C vs. C/T + T/T
		2,2 (0,5-9,7)	0,30	4,3 (0,9-20,2)	0,07	2,1 (0,4-11,0)	0,46	C/C vs. C/T
		-	-	-	-	-	-	-
TLR5	R392S (rs5744105)	3,3 (0,7-16,0)	0,19	2,8 (0,3-23,1)	0,45	1,0 (0,3-3,9)	1,00	R/R vs. R/S
		-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-
TLR6	S249P (rs5743810)	1,2 (0,6-2,4)	0,72	1,1 (0,5-2,5)	0,84	1,4 (0,7-2,9)	0,37	T/T vs. C/T + C/C
		1,1 (0,5-2,6)	0,84	1,5 (0,7-3,4)	0,39	1,2 (0,5-2,4)	0,85	T/T vs. C/T
		2,5 (0,8-7,9)	0,15	-	-	6,1 (0,7-51,7)	0,07	T/T vs. C/C
TLR9	-1237 C/T (rs5743836)	1,1 (0,5-2,3)	0,85	1,2 (0,5-2,7)	0,68	1,4 (0,7-3,0)	0,36	C/C vs. C/T + T/T
		1,0 (0,5-2,2)	1,00	1,2 (0,5-2,8)	0,67	1,5 (0,7-3,3)	0,27	C/C vs. T/C
		-	-	-	-	-	-	-
TLR9	-1486 T/C (rs187084)	2,1 (1,1-4,3)	0,04	1,0 (0,4-2,5)	1,00	1,4 (0,7-2,8)	0,31	T/T + C/T vs. C/C
		2,2 (1,0-4,7)	0,04	1,0 (0,4-2,4)	1,00	1,2 (0,6-2,6)	0,58	T/T vs. C/T
		2,1 (0,9-4,8)	0,10	1,0 (0,4-2,8)	1,00	1,9 (0,8-4,6)	0,19	T/T vs. C/C
CD14	-159 (rs2569191)	1,5 (0,7-3,2)	0,27	1,3 (0,6-2,8)	0,67	1,1 (0,5-2,2)	1,00	C/C vs. C/T + T/T
		1,6 (0,7-3,4)	0,25	1,6 (0,7-3,7)	0,37	1,1 (0,5-2,4)	0,85	C/C vs. C/T
		1,4 (0,5-3,7)	0,62	1,0 (0,3-3,0)	1,00	1,1 (0,4-3,0)	0,81	C/C vs. T/T

Tabela 4: Associação dos alelos TLRs e CD14 com comorbidades (doenças infecciosas), recaída e óbito em pacientes com Leucemia Linfóide Aguda.

Polimorfismo		PARÂMETROS CLÍNICOS												
		COMORBIDADES				RECAÍDA				ÓBITO				
		NÃO (N=83)	SIM (N=66)	OR (IC 95%)	(p) valor	NÃO (N=38)	SIM (N=114)	OR (IC 95%)	(p) valor	NÃO (N=85)	SIM (N=67)	OR (IC 95%)	(p) valor	
TLR1	I602S (rs5743618)	T	127 (77%)	95 (72%)	1,2	0,42	57 (75%)	172 (75%)	1,0	0,94	126 (74%)	103 (77%)	1,2	0,60
	G	39 (23%)	37 (28%)	(0,8-2,1)		19 (25%)	56 (25%)	(0,6-1,9)		44 (26%)	31 (23%)	(0,7-2,0)		
TLR4	A299G (rs4986790)	A	158 (95%)	131 (99%)	6,6	0,05	73 (96%)	222 (97%)	1,5	0,70	165 (97%)	130 (97%)	1,0	1,00
		G	8 (5%)	1 (1%)	(0,8-53,8)		3 (4%)	6 (3%)	(0,4-6,2)		5 (3%)	4 (3%)	(0,3-3,9)	
	T399I (rs4986791)	C	166 (97%)	127 (96%)	1,3	0,75	72 (95%)	223 (98%)	2,5	0,23	163 (96%)	132 (99%)	2,8	0,31
		T	5 (3%)	5 (4%)	(0,4-4,6)		4 (5%)	5 (2%)	(0,6-9,5)		7 (4%)	2 (1%)	(0,6-13,9)	
TLR5	R392S (rs5744105)	R	158 (95%)	130 (98%)	3,2	0,19	75 (99%)	220 (96%)	2,7	0,46	165 (97%)	130 (97%)	1,0	1,00
		S	8 (5%)	2 (2%)	(0,7-15,8)		1 (1%)	8 (4%)	(0,3-22,2)		5 (3%)	4 (3%)	(0,3-3,9)	
TLR6	S249P (rs5743810)	T	138 (83%)	102 (77%)	1,5	0,24	12 (16%)	41 (18%)	1,2	0,73	135 (79%)	116 (87%)	1,7	0,13
		C	28 (12%)	30 (23%)	(0,8-2,6)		64 (84%)	187 (82%)	(0,6-2,4)		35 (21%)	18 (13%)	(0,9-3,1)	
TLR9	-1237 C/T (rs5743836)	C	145 (87%)	114 (86%)	1,1	0,86	65 (86%)	198 (87%)	1,1	0,85	145 (85%)	118 (88%)	1,3	0,50
		T	21 (13%)	18 (14%)	(0,6-2,1)		11 (14%)	30 (13%)	(0,5-2,4)		25 (15%)	16 (12%)	(0,6-2,5)	
	-1486 T/C (rs187084)	T	77 (46%)	76 (58%)	1,6	0,06	42 (55%)	127 (56%)	1,0	1,00	88 (52%)	81 (60%)	1,4	0,13
C		89 (54%)	56 (42%)	(1,0-2,5)		34 (45%)	101 (44%)	(0,6-1,7)		82 (48%)	53 (40%)	(0,9-2,3)		
CD14	-159 (rs2569191)	C	86 (52%)	74 (56%)	1,2	0,48	42 (55%)	123 (54%)	1,1	0,89	93 (55%)	72 (54%)	1,0	0,91
		T	80 (48%)	58 (44%)	(0,7-1,9)		34 (45%)	105 (46%)	(0,6-1,8)		77 (45%)	62 (46%)	(0,7-1,6)	

4. DISCUSSÃO

O Estado do Amazonas, localizado na região Amazônica do Brasil, é conhecido por seu clima tropical e por uma população altamente heterogênea exposta a diversos patógenos. Além disso, possui diferentes áreas endêmicas para doenças infecciosas, o que poderia contribuir para a modulação da resposta imune e conseqüentemente o desencadeamento de alterações fisiológicas, genéticas e hematológicas²⁸. O perfil biológico da LLA ainda é pouco conhecido, possuindo padrões diferentes de acordo com as regiões geográficas e étnicas do mundo^{4,28–30}.

Estudos associando as características genéticas de moléculas do sistema imunológico em pacientes com cânceres hematológicos tem sido realizado. Polimorfismos ou variações genéticas nos genes de moléculas importantes na resposta imune envolvidas com a progressão de doenças, podem se mostrar fatores importantes na amplificação de diferenças biológicas intrínsecas, influenciando em resultados clinicamente distintos e conferindo suscetibilidade genética ao câncer^{14,15}. Diversos polimorfismos genéticos já foram descritos nos TLRs capazes de alterar o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, modulando o risco de infecção, inflamação crônica e câncer em diferentes populações, no entanto, sua relação com a LLA ainda não foi totalmente elucidada^{14,22,31–33}.

Em nosso estudo, a LLA foi predominante em pacientes com idade mediana de 12 anos e do sexo masculino, estando de acordo com a literatura^{4,29,34}. Quando analisamos a distribuição dos genótipos dos polimorfismos I602S (TLR1), A299G (TLR4), T399I (TLR4), R392S (TLR5), S249P (TLR6), -1237 C/T (TLR9), -159 C/T (CD14) com a LLA, não encontramos associação. Entretanto, as análises para o SNP -1486 C/T (TLR9) sugere que portadores do genótipo C/C possuem um risco duas vezes maior de desenvolver LLA (TLR9: T/T+C/T vs. C/C OR = 2.0 [95% CI: 1.1-3.6, p=0,01]; C/T vs. C/C OR = 2.3 [IC 95%: 1.2–4.2, p=0,00]), bem como, duas vezes mais chances de apresentar comorbidades ao diagnóstico (TLR9: T/T +

C/T vs. C/C OR = 2.1 [95% CI: 1.1-4.3, p=0,04]; T/T vs. C/T OR = 2.2 [95% CI: 1.0-4.7, p=0,04]).

Estudos demonstram que a troca dos nucleotídeos T/C nos SNPs -1237 e -1486 localizados no promotor do TLR9, é capaz de criar dois locais de ligação adicionais para fatores de transcrição, Sp-1 e NF-kappaB, que pode ser funcionalmente relevante³⁵. Alelos variantes desses polimorfismos podem alterar a capacidade funcional de TLR9 e modificar a resposta a patógenos bacterianos, variando assim a suscetibilidade da doença interindividual^{36–38}.

Pesquisas envolvendo polimorfismos nos genes TLRs na LLA são escassos, todavia, NIETERS e colaboradores demonstraram em 2006 que o SNP -1486 C/T e -1237 C/T (TLR9) podem ser considerados fatores de risco para o desenvolvimento de linfoma não-hodgkin³⁹. Além do mais, os genótipos C/T e C/C do polimorfismo TLR9 -1486 C/T, apresentaram associação com o aumento do risco de câncer do colo do útero no estado estágio inicial⁴⁰. Outras variantes do TLR9 também vêm sendo descritas como fatores de risco para doenças como Linfoma não-hodgkin, câncer endometrial e cervical^{41,42}.

Em contrapartida, um estudo realizado com linfoma de Hodgkin sugere que portadores do alelo C do SNP TLR9 -1237C/T possuem um risco de 2,5 vezes maior de desenvolver a doença⁴³. Uma pesquisa em pacientes diagnosticados com Leucemia Mielóide Aguda (LMA), demonstrou que o alelo C (TLR9 -1237C/T) e T (TLR9 -1486C/T) estavam associados à predisposição para a doença. Foi também observado, que o genótipo T/T do polimorfismo -1486 (TLR9), foi mais frequente em pacientes que apresentavam recaída da doença⁴⁴.

O genótipo T/T da variante TLR9 2848C/T, apresentou associação com o aumento do risco de câncer cervical avançado em uma população do norte da Índia⁴⁵. Entre europeus americanos, estudos sugerem o aumento do risco de asma associado ao alelo C do SNP TLR9 -1237C/T (OR 1.85, IC 95% 1.05 a 3.25)⁴⁶.

Em concordância com os nossos resultados, um estudo envolvendo polimorfismos do gene do TLR4 (A299G e T399I) e o risco de LLA, realizado na população da Turquia, também não observou associação com a doença⁴⁷. Todavia, um estudo com pacientes com câncer do colo do útero (CRC), relatou que o genótipo C/C da variante do TLR4 T399I e os alelos A e G do polimorfismo TLR4 A299G podem influenciar no aumento do risco para o desenvolvimento da doença⁴⁰. Além disso, foi mostrado maior frequência dos genótipos homozigotos G/G e T/T dos SNPs A299G e T399I em pacientes com câncer de colo retal, podendo estar associado como risco para essa doença⁴⁸. Em uma população da Índia ocidental, PANDEY et. al. ⁴⁰, sugeriram que o genótipo heterozigoto (A/G) do SNP A299G presente no gene do TLR4 estaria associado a infecção pelo HPV 16/18 e seria um fator risco para o câncer uterino.

Do mesmo modo, nosso estudo com LLA, ao comparar as frequências dos genótipos, o homozigoto selvagem também foi o mais frequente em todos os polimorfismos dos TLRs, exceto no -1486 (TLR9) e -159 (CD14), porém, não demonstrou diferenças significativas. Diferentemente, um estudo realizado no Egito, envolvendo o polimorfismo -1237C/T do gene do TLR9, observou uma frequência de 58% do genótipo heterozigoto (C/T) e apenas 1% do genótipo homozigoto (C/C), essa diferença foi significativa conferindo um risco aumentado de aproximadamente quatro vezes maior de desenvolver o linfoma não-Hodgkin de células B²⁶.

Ao analisarmos os SNPs TLRs e CD14 do grupo de pacientes com LLA em comparação com as variáveis recaída e óbito, não encontramos associação. Entretanto, o estudo apresenta algumas limitações. Devido a pequena quantidade de amostras, é necessária a validação com um tamanho de amostra maior para confirmar a importância do estudo dos polimorfismos nos genes TLRs em pacientes com LLA.

5. Conclusão

Em conclusão, nossos achados sugerem um papel significativo do *SNP - 1486C/T (TLR9)* no desenvolvimento e presença de comorbidades infecciosas na leucemia linfoblástica aguda. Para o nosso conhecimento, este estudo é o primeiro a relatar a associação dos polimorfismos nos genes do TLRs e CD14 com a LLA em indivíduos da Amazônia brasileira. Os TLRs são importantes para o reconhecimento de PAMPs e DAMPs, induzindo as células a produzirem moléculas inflamatórias e ativando a resposta imunológica. No entanto, estudos adicionais com maior tamanho amostral devem ser considerados para validar esses resultados.

Referências

1. Bawazir A, Al-Zamel N, Amen A, Akiel MA, Alhawiti NM, Alshehri A. The burden of leukemia in the Kingdom of Saudi Arabia: 15 years period (1999-2013). *BMC Cancer*. 2019;19(1):1-10. doi:10.1186/s12885-019-5897-5
2. INCA. ESTIMATIVA 2020/ Incidência de Câncer No Brasil.; 2020.
3. Alves S, Wendell M, Id ALS, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population : Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. *PLoS One*. 2019;14(e0221518):1-16. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221518
4. Reis RDS, Camargo B De, Santos MDO, et al. Childhood Leukemia Incidence in Brazil According to Different Geographical Regions. *Pediatr blood cancer*. 2011;56(2011):58-64. doi:10.1002/pbc
5. Abboud MR, Ghanem K, Muwakkit S. Acute lymphoblastic leukemia in low and middle-income countries. *Curr Opin Oncol*. 2014;26(6):650-655. doi:10.1097/CCO.000000000000125
6. Zuckerman T, Rowe J. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000Prime Rep*. 2014;6(July):3-7. doi:10.12703/P6-59
7. Ladines-Castro W, Barragán-Ibañez G, Luna-Pérez MA, et al. Morphology of leukaemias. *Rev Médica del Hosp Gen México*. 2016;79(2):107-113. doi:10.1016/j.hgmx.2015.06.007
8. Greaves MF. Differentiation-Linked Leukemogenesis Origins of Phenotypic Diversity in. *Science* (80-). 1986;234.
9. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet*. 1997;349(9048):344-349. doi:10.1016/S0140-6736(96)09412-3

10. Greaves M. The 'delayed infection' (aka 'hygiene') hypothesis for childhood leukaemia. In: *The Hygiene Hypothesis and Darwinian Medicine*. Basel: Birkhäuser Basel; 2009:239-255. doi:10.1007/978-3-7643-8903-1_13
11. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(8):471-484. doi:10.1038/s41568-018-0015-6
12. Kinlen L. Childhood leukaemia, nuclear sites, and population mixing. *Br J Cancer*. 2011;104(1):12-18. doi:10.1038/sj.bjc.6605982
13. Kinlen LJ. Childhood leukemia and population mixing. *Cancer Causes Control*. 2016;27(12):1499. doi:10.1007/s10552-016-0819-1
14. Monlish DA, Bhatt ST, Schuettpelez LG. The Role of Toll-Like Receptors in Hematopoietic Malignancies. *Front Immunol*. 2016;7(SEP):390. doi:10.3389/fimmu.2016.00390
15. Saborit-Villarroya I, Vaisitti T, Rossi D, et al. E2A is a transcriptional regulator of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2011;25:479-488. doi:10.1038/leu.2010.291
16. Jacqueline C, Tasiemski A, Sorci G, et al. Infections and cancer: The "fifty shades of immunity" hypothesis. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1-11. doi:10.1186/s12885-017-3234-4
17. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent*. 2019;43(1). doi:10.1186/s42269-019-0227-2
18. Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: A double-edged sword in cancer. *Inflamm Res*. 2013;62(9):823-834. doi:10.1007/s00011-013-0645-9
19. Porcelli SA. EFFECTOR MECHANISMS IN AUTOIMMUNITY AND INFLAMMATION CHAPTER 17 Innate Immunity. Tenth Edit. Elsevier Inc.; 2017. doi:10.1016/B978-0-323-31696-5.00017-6
20. Mcdonald DR, Levy O. 3 - Innate Immunity. Fifth Edit. Elsevier Ltd doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00003-X
21. Ishii KJ, Akira S. Cap 3 – Innate Immunity. Third Edit. Elsevier; 2008. doi:10.1016/B978-0-323-04404-2.10003-X
22. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(5):979-987. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.023
23. Harsini S, Beigy M, Akhavan-Sabbagh M, Rezaei N. Toll-like receptors in lymphoid malignancies: Double-edged sword. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;89(2):262-283. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.08.010

24. Messaritakis I, Stogiannitsi M, Koulouridi A, et al. Evaluation of the detection of Toll-like receptors (TLRs) in cancer development and progression in patients with colorectal cancer. *PLoS One*. 2018;13(6):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0197327
25. Zhao S, Zhang Y, Zhang Q, Wang F, Zhang D. Toll-Like Receptors and Prostate Cancer. *Front Immunol*. 2014;5(JUL):1-6. doi:10.3389/fimmu.2014.00352
26. Rahman HAA, Khorshied MM, Khorshid OMR, Mahgoub SM. Toll-like receptor 2 and 9 genetic polymorphisms and the susceptibility to B cell Non-Hodgkin Lymphoma in Egypt. *Ann Hematol*. 2014;93(11):1859-1865. doi:10.1007/s00277-014-2131-z
27. Costa AG, Ramasawmy R, Ibiapina HNS, et al. Association of TLR variants with susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria and parasitemia in the Amazon region of Brazil. *PLoS One*. 2017;12(8):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0183840
28. Azevedo-Silva F, De Camargo B, Pombo-de-Oliveira MS. Implications of infectious diseases and the adrenal hypothesis for the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Brazilian J Med Biol Res*. 2010;43(3):226-229. doi:10.1590/S0100-879X2010007500011
29. Chan LC, Lam TH, Li CK, et al. Is the timing of exposure to infection a major determinant of acute lymphoblastic leukaemia in Hong Kong? *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2002;16(2):154-165. doi:10.1046/j.1365-3016.2002.00406.x
30. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-1043. doi:10.1016/S0140-6736(08)60457-2
31. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17(1):1-14. doi:10.1093/intimm/dxh186
32. Wolska A, Lech-Marańda E, Robak T. Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cell Mol Biol Lett*. 2009;14(2). doi:10.2478/s11658-008-0048-z
33. Trejo-De La O A, Hernández-Sancén P, Maldonado-Bernal C. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun*. 2014;15(4):199-209. doi:10.1038/gene.2014.10
34. Redaelli A, Corporation P, Redaelli A, et al. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2004;13(10):279-287.
35. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR)-9 promotor polymorphisms and atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2006;364(1-2):303-307. doi:10.1016/j.cca.2005.07.017

36. Roszak A, Lianeri M, Sowińska A, Jagodziński PP. Involvement of toll-like receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. *Mol Biol Rep.* 2012;39(8):8425-8430. doi:10.1007/s11033-012-1695-8
37. Ng MTH, Van't Hof R, Crockett JC, et al. Increase in NF- κ B binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with *Helicobacter pylori*-induced gastric disease. *Infect Immun.* 2010;78(3):1345-1352. doi:10.1128/IAI.01226-09
38. Zhang L, Qin H, Guan X, Zhang K, Liu Z. The TLR9 gene polymorphisms and the risk of cancer: evidence from a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(8):e71785. doi:10.1371/journal.pone.0071785
39. Nieters A, Beckmann L, Deeg E, Becker N. Gene polymorphisms in Toll-like receptors , interleukin-10 , and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma risk. *Genes Immun.* 2006;7:615-624. doi:10.1038/sj.gene.6364337
40. Pandey N o., Chauhan A, Pandey N, et al. Association of TLR4 and TLR9 gene polymorphisms and haplotypes with cervicitis susceptibility. *PLoS One.* 2019;14(7):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0220330
41. Carvalho A, Cunha C, Almeida A, et al. The rs5743836 polymorphism in TLR9 confers a population- based increased risk of non-Hodgkin lymphoma. *Genes Immun.* 2012;13(2):1-9. doi:10.1038/gene.2011.59
42. Ashton KA, Proietto A, Otton G, et al. Toll-Like Receptor (TLR) and Nucleosome-binding Oligomerization Domain (NOD) gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *BMC Cancer.* 2010;10:1-7. doi:10.1186/1471-2407-10-382
43. Mollaki V, Georgiadis T, Tassidou A, et al. Polymorphisms and haplotypes in TLR9 and MYD88 are associated with the development of Hodgkin's lymphoma: A candidate-gene association study. *J Hum Genet.* 2009;54(11):655-659. doi:10.1038/jhg.2009.90
44. Rybka J, Gębura K, Wróbel T, et al. Variations in genes involved in regulation of the nuclear factor - κ B pathway and the risk of acute myeloid leukaemia. *Int J Immunogenet.* 2016;43(2):101-106. doi:10.1111/iji.12255
45. Pandey S, Mittal B, Srivastava M, et al. Evaluation of Toll-like receptors 3 (c.1377C/T) and 9 (G2848A) gene polymorphisms in cervical cancer susceptibility. *Mol Biol Rep.* 2011;38(7):4715-4721. doi:10.1007/s11033-010-0607-z
46. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies , pairwise linkage disequilibrium , and haplotypes in three U . S . ethnic groups and exploratory case – control disease association studies □. *Genomics.* 2003;81:85-91. doi:10.1016/S0888-7543(02)00022-8

47. Batar B, Mutlu T, Özdemir N, Celkan T, Güven M. TLR4 ve NOD2 Polimorfizmlerinin Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi ile İlişkisi/ Association of the TLR4 and NOD2 Polymorphisms with Childhood. *Bezmialem Sci.* 2018;6:119-125. doi:10.14235/bs.2018.1678

48. Sheng WY, Yong Z, Yun Z, Hong H, Hai LL. Systematic review / Meta-analysis Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer: a meta-analysis and review. *Arch Med Sci* 2015;. 2015;11(4):699–707. doi:10.5114/aoms.2015.53288

Tabela Suplementar 1. Descrição das sequências dos primers, ciclagens, enzimas de restrição e fragmentos dos polimorfismos do estudo.

SNPs	Sequência dos Primers (5'- 3')	Protocolo PCR	Enzima de Restrição	Fragmentos
rs5743618 (TLR1)	Forward: GGAAAGTTATAGAGGAACCCT Reverse: CTTCACCCAGAAAGAATCGTGCC	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 55°C por 30" e 72°C por 30", 1 ciclo de 72°C por 7'	AluI	T: 280 G: 151+129
rs4986790 (TLR4)	Forward: GATTAGCATACTTAGACTACCTCCATG Reverse: GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 56°C por 30" e 72°C por 30", 1 ciclo de 72°C por 7'	NcoI	A: 259 G: 239+20
rs4986791 (TLR4)	Forward: GGTTGCTGTTCTCAAAGTTTTGGGAGAA Reverse: ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 15", 60°C por 15" e 72°C por 30", 1 ciclo de 72°C por 7'	Hinf-I	C: 147 T: 96+51
rs5744105 (TLR5)	Forward: GGTAGCCTACATTGATTTGC Reverse: GAGAATCTGGAGATGAGGTACCCG	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 62°C por 30" e 72°C por 30", 1 ciclo de 72°C por 7'	DdeI	C: 277pb T: 186+91
rs5743810 (TLR6)	Forward: GCATTTCCAAGTCGTTTCTATGT Reverse: GCAAAAACCCTTCACCTTGTT	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 63°C por 30" e 72°C por 30", 1 ciclo de 72°C por 7'	Avall	C: 210 T: 160+50
rs187084 (TLR9)	Forward: CTGCTTGCAGTTGACTGTGT Reverse: ATGGGAGCAGAGACATAATGGA	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 59°C por 30" e 72°C for 45", 1 ciclo de 72°C por 7'	BstNI	C: 108+27 T: 60+48+27
rs5743836 (TLR9)	Forward: TATCGTCTTATTCCCCTGCTGGAATGT Reverse: TGCCCAGAGCTGACTGCTGG	1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos de 95°C por 30", 59°C por 30" e 72°C por 30", 72°C por 7'	AfIII	C: 145 T: 111+34
rs2569191 (CD14)	Forward: GTGCCAACAGATGAGGTTCCAC Reverse: GCCTCTGACAGTTTATGTAATC	1 ciclo a 94°C por 5', 35 ciclos de 94°C por 30", 64°C por 30" e 72°C por 1', 1 ciclo 72°C por 10'	Ava II	C: 497 T: 353+144

*rs: Referent String; *F: Forward; *R: Reverse.

5 CONCLUSÃO

A Leucemia Linfóide Aguda vem sendo muito estudada nos últimos anos, no entanto, a influência de polimorfismos em moléculas do sistema imunológico ainda é pouco compreendido nessa patologia. Frente aos resultados do presente estudo, podemos concluir que:

- O estudo demonstrou evidências de que SNPs nos receptores do tipo Toll-Like podem estar associados ao desenvolvimento da LLA;
- O SNP *TLR9* -1486 C/T demonstrou uma diferença na distribuição da frequência entre o grupo caso e controle;
- O genótipo homocigoto selvagem (C/C) referente ao SNP -1486 C/T sugeriu um risco aumentado em duas vezes para o desenvolvimento da LLA;
- Pacientes com o genótipo T/T do SNP -1486 C/T (*TLR9*) apresenta um risco de duas vezes mais chances de possuírem comorbidades infecciosas ao longo do acompanhamento clínico;
- Não foram observadas associações significativas dos alelos com as variáveis clínicas.

6 REFERÊNCIAS

1. Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. Rev Med (Puebla). 2010;89(1):21–31.
2. Silva FA. Introdução. Acta Cir Bras. 2002;17(supl 2):03–03.
3. Zuckerman T, Rowe J. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. F1000Prime Rep. 2014 Jul 8;6(July):3–7.
4. de Lima MC, da Silva DB, Freund APF, Dacoregio JS, Costa TEJB, Costa I, et al. Acute Myeloid Leukemia: analysis of epidemiological profile and survival rate. J Pediatr (Rio J). 2016 May;92(3):283–9.
5. O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, Appelbaum FR, Arber DA, Attar E, et al. Acute myeloid leukemia. J Natl Compr Canc Netw [Internet].

- 2012;10(8):984–1021.
6. Starý J, Hrušák O. Recent advances in the management of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *F1000Research*. 2016 Nov 4;5(9):2635.
 7. Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Aug;23(4):655–74.
 8. Grimwade D, Hills RK, Moorman a V, Walker H, Chatters S, Goldstone a H, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukaemia: Determination of prognostic significance of rarer recurring chromosomal abnormalities amongst 5,876 younger adult patients treated in the UK Medical Research Council trials. *Br J Haematol [Internet]*. 2010;Conference(3):17.
 9. Bawazir A, Al-Zamel N, Amen A, Akiel MA, Alhawiti NM, Alshehri A. The burden of leukemia in the Kingdom of Saudi Arabia: 15 years period (1999-2013). *BMC Cancer*. 2019;19(1):1–10.
 10. Harris RE. *Global Epidemiology of Cancer*. Jones & Ba. Harris RE, editor. 2015. 429 p.
 11. CÂNCER IN DO. ESTIMATIVA 2014: Incidência de Câncer no Brasil. COORDENAÇÃO. Vol. 1, INCA. 2012. 128 p.
 12. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017;7(6):e577.
 13. Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol*. 2018;5(1).
 14. INCA. ESTIMATIVA 2020/ Incidência de Câncer no Brasil. 2020.
 15. Alves S, Wendell M, Id ALS, Gabriela M, Kerr A, Xabregas LA, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. *PLoS One*. 2019;14(e0221518):1–16.

16. Shalal HH, Mahmood NS, Abdul M, Alchalabi Q. Clinical , hematological , and laboratory presentation of acute lymphoblastic leukemia of children in Diyala province / Eastern Iraq. *Int J Res Med Sci.* 2017;5(10):4227–33.
17. Clarke RT, Van den Bruel A, Bankhead C, Mitchell CD, Phillips B, Thompson MJ. Clinical presentation of childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child.* 2016 Oct 19;101(10):894–901.
18. LI S-Y, YE J-Y, MENG F-Y, LI C-F, YANG M. Clinical characteristics of acute lymphoblastic leukemia in male and female patients: A retrospective analysis of 705 patients. *Oncol Lett.* 2015 Jul;10(1):453–8.
19. Subashchandrabose P, Ramiah Madanagopaal L, Subba Rao TM. Diagnosis and Classification of Acute Leukemia in Bone Marrow Trepine Biopsies, Utility of a Selected Panel of Minimal Immunohistochemical Markers. *Int J Hematol stem cell Res.* 2016 Jul 1;10(3):138–46.
20. Döhner H, Estey EHE, Amadori S, Appelbaum FRFR, Büchner T, Burnett AK a. K, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood [Internet].* 2010;115(3):453–74.
21. Chatterjee T, Mallhi RS, Venkatesan S. Minimal residual disease detection using flow cytometry: Applications in acute leukemia. *Med J Armed Forces India [Internet].* 2016;72(2):152–6.
22. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* 2004;18(2):115–36.
23. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, Ilaria M, Principe D, Fraboni D, et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Survival (Lond).* 2010;116(13):2295–303.
24. Behm FG. Classification of Acute Leukemias. *Curr Clin Oncol Treat Acute Leuk New Dir Clin Res.* 2003;43–58.

25. Muniraj F. Classification of Acute Leukemias – Past, Present, and Future. *IJSS Case Reports Rev.* 2015;1(12):61–6.
26. Ladines-Castro W, Barragán-Ibañez G, Luna-Pérez MA, Santoyo-Sánchez A, Collazo-Jaloma J, Mendoza-García E, et al. Morphology of leukaemias. *Rev Médica del Hosp Gen México.* 2016 Apr;79(2):107–13.
27. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016 May 19;127(20):2391–405.
28. Vardiman JW, Thiele J ADEA. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood [Internet].* 2015;114(5):937–52.
29. Estey EH. Treatment of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2009;94(1):10–6.
30. Lee JW, Cho B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Korean J Pediatr.* 2017;60(5):129.
31. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol.* 2002;169(6):2956–63.
32. Yeoh A, Collins A, Fox K, Shields S, Ritchie P, Kirby M, et al. Treatment delay and the risk of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol [Internet].* 2017;34(1):38–42.
33. Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int.* 2018;60(1):4–12.
34. Lustosa de Sousa DW, de Almeida Ferreira FV, Cavalcante Felix FH, de Oliveira Lopes MV. Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2015 Jul;37(4):223–9.

35. Stacy L. Cooper, MDa and Patrick A. Brown M. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 2015;62(1):61–73.
36. Enciso J, Mendoza L, Pelayo R. Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology. *Front Genet.* 2015 Sep 11;6(SEP):1–5.
37. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet.* 1997;349(9048):344–9.
38. Greaves M. The ‘delayed infection’ (aka ‘hygiene’) hypothesis for childhood leukaemia. In: *The Hygiene Hypothesis and Darwinian Medicine.* Basel: Birkhäuser Basel; 2009. p. 239–55.
39. Greaves MF. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood.* 2003 Jun 5;102(7):2321–33.
40. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(3):193–203.
41. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(8):471–84.
42. Hwee J, Tait C, Sung L, Kwong JC, Sutradhar R, Pole JD. A systematic review and meta-analysis of the association between childhood infections and the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer.* 2018 Jan 24;118(1):127–37.
43. Kinlen LJ. Childhood leukemia and population mixing. *Cancer Causes Control.* 2016;27(12):1499.
44. Kinlen L. Childhood leukaemia, nuclear sites, and population mixing. *Br J Cancer [Internet].* 2011;104(1):12–8.
45. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2008 Mar;371(9617):1030–43.
46. Greaves M. Leukaemia “firsts” in cancer research and treatment. *Nat Rev*

- Cancer. 2016;16(3):163–72.
47. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2003 Sep;3(9):639–49.
 48. Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT. Introduction: Innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect*. 2002;4(9):883–6.
 49. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 2006;124(4):783–801.
 50. Leoratti FMS, Farias L, Alves FP, Suarez-Mútiis MC, Coura JR, Kalil J, et al. Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria. *J Infect Dis*. 2008;198(5):772–80.
 51. Harsini S, Beigy M, Akhavan-Sabbagh M, Rezaei N. Toll-like receptors in lymphoid malignancies: Double-edged sword. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;89(2):262–83.
 52. Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci*. 2008 Mar 1;114(5):347–60.
 53. Sanguri S. Papel de Toll like receptor (s) em Biologia Tumoral. 2017;1(1):1–7.
 54. Arthur JC, Jobin C. The struggle within: Microbial influences on colorectal cancer. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(1):396–409.
 55. Isaza-Correa JM, Liang Z, van den Berg A, Diepstra A, Visser L. Toll-like receptors in the pathogenesis of human B cell malignancies. *J Hematol Oncol*. 2014 Dec 12;7(1):57.
 56. Han S, Lan Q, Park AK, Lee K, Park SK, Seop H, et al. Polymorphisms in innate immunity genes and risk of childhood leukemia. *Hum Immunol*. 2010;71(7):727–30.
 57. Vogel SN. How discovery of Toll-mediated innate immunity in *Drosophila* impacted our understanding of TLR signaling (and vice versa). *J Immunol [Internet]*. 2012;188(11):5207–9.

58. Sanguri S, Gupta D. Role of Toll like Receptor (s) in Tumor Biology. 2017;1(1).
59. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. 2014;5(September):1–8.
60. Moresco EMY, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. *Curr Biol* [Internet]. 2011;21(13):R488–93.
61. Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, et al. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9577–82.
62. Jin MS, Lee JO. Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes. *Immunity*. 2008;29(2):182–91.
63. Chang ZL. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res*. 2010 Oct 1;59(10):791–808.
64. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002;270:81–92.
65. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(5):979–87.
66. Song PI, Abraham TA, Park Y, Zivony AS, Harten B, Edelhauser HF, et al. The Expression of Functional LPS Receptor Proteins CD14 And Toll-Like Receptor 4 in Human Corneal Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(12).
67. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17(1):1–14.
68. Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010:240365.
69. Rakoff-nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:57–63.
70. Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of

- age. Hematology Am Soc Hematol Educ Program [Internet]. 2012;2012(1):35–42.
71. Arvaniti E, Ntoufa S, Papakonstantinou N, Touloumenidou T, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, et al. Toll-like receptor signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: Distinct gene expression profiles of potential pathogenic significance in specific subsets of patients. *Haematologica*. 2011;96(11):1644–52.
 72. Akhter A, Masir N, Elyamany G, Phang K-C, Mahe E, Al-Zahrani AM, et al. Differential expression of Toll-like receptor (TLR) and B cell receptor (BCR) signaling molecules in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *J Neurooncol*. 2015 Jan 13;121(2):289–96.
 73. Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon DSB. Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *J Int Cancer Microenviron Soc*. 2009 Sep;205–14.
 74. Sverre Heim FM. *Cancer Cytogenetics*. Heim S, Mitelman F, editors. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. 648 p.
 75. Okazaki S, Loupakis F, Stintzing S, Cao S, Zhang W, Yang D, et al. Clinical Significance of TLR1 I602S Polymorphism for Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with FOLFIRI plus Bevacizumab. *Mol Cancer Ther*. 2016 Jul 1;15(7):1740–5.
 76. Kutikhin AG. Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk. *Hum Immunol*. 2011 Nov;72(11):1095–116.
 77. Schnetzke U, Spies-Weisshart B, Yomade O, Fischer M, Rachow T, Schrenk K, et al. Polymorphisms of Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) are associated with the risk of infectious complications in acute myeloid leukemia. *Genes Immun*. 2015;16(1):83–8.
 78. Miedema KGE, Tissing WJE, te Poele EM, Kamps W a, Alizadeh BZ, Kerkhof M, et al. Polymorphisms in the TLR6 gene associated with the

- inverse association between childhood acute lymphoblastic leukemia and atopic disease. *Leukemia*. 2012 Jun 2;26(6):1203–10.
79. Gomaz ANA. The polymorphisms in Toll-like receptor genes and cancer risk. 2012;114(4):461–9.
 80. Harsini S, Beigy M, Akhavan-Sabbagh M, Rezaei N. Toll-like receptors in lymphoid malignancies: Double-edged sword. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014 Feb;89(2):262–83.
 81. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein R a, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(2):588–93.
 82. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, et al. A Common Dominant TLR5 Stop Codon Polymorphism Abolishes Flagellin Signaling and Is Associated with Susceptibility to Legionnaires' Disease. *J Exp Med* [Internet]. 2003;198(10):1563–72.
 83. Grube M, Loeffler J, Mezger M, Kruger B, Echtenacher B, Hoffmann P, et al. TLR5 stop codon polymorphism is associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Med Mycol* [Internet]. 2013;51(8):818–25.
 84. Costa AG, Ramasawmy R, Ibiapina HNS, Sampaio VS, Xábregas LA, Brasil LW, et al. Association of TLR variants with susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria and parasitemia in the Amazon region of Brazil. *PLoS One*. 2017;12(8):1–14.

7 APÊNDICES

7.1 APÊNDICE 01: EQUIPE DO PROJETO.

Nome	Carga horária	Função	Instituição	Atividade no projeto
Lilyane de Amorim Xabregas	40h	Biomédica	UEA/HEMOAM	Mestranda
Allyson Guimarães da Costa	4h	Enfermeiro	HEMOAM/UEA	Orientador
Adriana Malheiro Alle Marie	4h	Bióloga	HEMOAM/UFAM	Coorientadora
Maria Gabriela de Almeida Rodrigues	4h	Biomédica	UEA/FMT-HVD	Colaboradora
Andrea Monteiro Tarragô	4h	Farmacêutica – Bioquímica	HEMOAM	Colaboradora
Firmino Martins dos Santos Neto	4h	Graduando em Biomedicina	FAMETRO	Colaborador
Alessandra Pontilho	4h	Bióloga	USP	Colaboradora
Fabiola Silva Alves	4h	Biomédica	UEA/HEMOAM	Colaboradora
João Paulo Diniz Pimentel	4h	Farmacêutico - Bioquímico	HEMOAM	Colaborador
Maria do Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho	4h	Médica	HEMOAM	Colaboradora
Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago	4h	Farmacêutica-Bioquímica	HEMOAM	Colaboradora
Nadja Pinto Garcia	4h	Farmacêutica-Bioquímica	UFAM/HEMOAM	Colaboradora

7.2 APÊNDICE 02: FINANCIAMENTO DO PROJETO.

Descrição	Unidade	Valor Unitário	Subtotal
Taq DNA Polimerase	10	R\$ 425,00	R\$ 4.250,00
Primes	22	R\$ 150,00	R\$ 3.300,00
Enzimas de Restrição	11	R\$ 1.000,00	R\$ 11.000,00
Agarose	3	R\$ 1.300,00	R\$ 3.900,00
Kit de Extração de DNA (250)	1	R\$ 2.893,00	R\$ 2.893,00
Luvas de Procedimento	5	R\$ 20,00	R\$ 100,00
dNTPs	5	R\$ 360,00	R\$ 1.800,00
Ponteiras com filtro 200uL	30	R\$ 70,00	R\$ 2.100,00
Ponteiras com filtro 10uL	50	R\$ 60,00	R\$ 3.000,00
Microtubos 0,2mL	10	R\$ 55,00	R\$ 550,00
TOTAL			R\$ R\$ 32.893,00

Este projeto foi desenvolvido com recursos provenientes de Projeto de Pesquisa aprovado no Âmbito do Programa de Apoio à

Consolidação das Instituições Estaduais de Ensino e/ou Pesquisa (PRÓ-ESTADO), Resolução N° 002/2008, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

7.3 APÊNDICE 03: PROTOCOLOS DA PCR-RFLP.

7.3.1 CD14 (-159):

1. POLIMORFISMO -159 CD14 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

- Para a amplificação do polimorfismo -159 do CD14, será utilizado a técnica de PCR descrita por Costa et al., (2017).

- 1.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica;
- 1.2- Preparar a mix da PCR;
- 1.3- Adicionar 2,0 µL de DNA colúico de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 1.4- Adicionar 23 µL da Mix de PCR nos tubos e homogeneizar;
- Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Enzima;
- 1.5- Levar os microtubos ao Termociclo e utilizar o programa descrito abaixo:

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	5:00'	1
95°C	0:30'	35
65°C	0:30'	
72°C	0:30'	1
72°C	7:00'	
4°C	"	1

1.6- Após amplificação, Correr as amostras em gel de Agarose a 2%.

Tabela 04: Descrição dos primers, temperaturas de pareamento (Tp) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).

CD14	LSR ¹ e ER ²	Primers	Sequências 5' → 3'	Tp ³ (°C)	PCR	RFLP
-159-	CD14F		GTCCCAACAGATGAGGTTGAC	88°C	497pb	353pb
CD14	AvsII	CD14R	GGCTCTGACAGTTTATGTAATC			

2. Localização do Sítio de Restrição; 2. Enzima de Restrição; 3. Temperatura de Pareamento.

Mix para Reação de PCR – Polimorfismo -159 CD14

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	17,4	
Buffer 10X PCR	1x	2,5	
dNTPs (200µM)	200 µM	1,0	
MgCl ₂	50 mM	1,5	
Primer F	0,1 µM	0,25	
Primer R	0,1 µM	0,25	
Taq DNA (1U)	10U/µL	0,1	
Amostra de DNA	200 ng	2,0	
Volume Final da Reação		25,0	
Volume por Mix		25,0	

3. REAÇÃO DE RESTRIÇÃO

- 3.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica;
- 3.2- Preparar a mix da Reação de Restrição;
- 3.3- Adicionar 15,0 µL de Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 3.4- Adicionar 5,0 µL da Mix da Reação de Restrição nos tubos e homogeneizar;
- Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Enzima;
- 3.5- Levar os microtubos ao Termociclo e deixar por 4 horas a 37°C.

4. GEL DE AGAROSE A 2%

- 4.1- Diluir o TBE 10X em TBE 1X;
- 4.2- Com uma proveta separar 100 mL de TBE 1X;
- 4.3- Pesar 2g Agarose;
- 4.4- Limpar a taca horizontal que será utilizada e separar os pontos;
- 4.5- Dissolver a Agarose em 100 mL de TBE 1X em um Erlenmeyer de 250 mL;
- 4.6- Aquecer a Solução em microondas até a solubilização completa da Agarose;
- 4.7- Adicionar 2,0 µL de Etnose a solução e homogeneizar;
- 4.8- Despejar a solução na taca e colocar cuidadosamente os pontos;
- 4.9- Esperar solidificar;
- Durante o processo de solidificação da agarose, preparar as amostras para aplicação no gel;
- 4.10- Colocar 2 µL de Blue Juice em uma placa de Petri;
- 4.11- Após, colocar 5 µL do produto de restrição;
- 4.12- Homogeneizar e Aplicar os 10 µL do conteúdo no Gel de Agarose;
- 4.13- O Ladder deve ser aplicado ao final no primeiro poço, no volume de 2,5 µL (quando for diluído no volume de 510 µL de Ladder original Blue Juice);
- 4.14- Ajustar a fonte (Volts= 100, Amperes= 100 e Tempo=130') de deixar o gel em corrida por 80 minutos;

Mix para Restrição – Polimorfismo -159 CD14

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	3,4	
Buffer ¹ ou CutSmart	10x	1,5	
Enzima AvsII (1U/µL)	1 U	0,1	
Produto da PCR	-	15,0	
Volume Final da Reação		20,0	
Volume por Mix		5,0	

Inserir no Termociclo ou Banho Maria para tubos de 0,2 µL a 37°C por 4 horas ou 6 horas

7.3.2 TLR1 (I602S):

1. POLIMORFISMO I602S TLR1 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

- Para a amplificação do polimorfismo I602S do TLR1, será utilizado a técnica de PCR descrita por Costa et al., (2017).

- 1.1 Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 ml, em pares específicos;
- 1.2 Preparar a mix de PCR, contendo:
- 1.3 Adicionar 2,0 µL de DNA extraído de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 1.4 Adicionar 25 µL de Taq nos tubos e homogeneizar:
 - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o conteúdo da Taq
- 1.5 Levar os microtubos ao Termociclador e utilizar o programa descrito abaixo:

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	5:00'	1
95°C	0:30'	40
55°C	0:30'	
72°C	0:30'	
72°C	7:00'	1
4°C	"	1

1.6 Após amplificação, Correr as amostras em gel de Agarose a 2%.

Tabela 31: Descrição das primers, temperaturas de parâmetro (T_p) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).

TLR1	LSR1 e ER?	Primers	Sequências 5' → 3'	T _p (°C)	PCR	RFLP
I602S		TLR1F	GGAGGTTATAGAGGACCCCT			200pb
TLR1	Avi	TLR1R	CTTCACCCAGAGAGATGATGCCC	56°C	230pb	160pb 129pb

1 Localização do Sítio de Restrição; 2 Enzima de Restrição; 3 Temperatura de Parâmetro.

Mix para Reação de PCR – Polimorfismo I602S TLR-1

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	16,9	
Buffer 10X PCR	1x	2,5	
dNTPs (200µM)	200 µM	1,0	
MgCl ₂	1,5 mM	2,0	
Primer F	1,5µM	0,25	
Primer R	0,1 µM	0,25	
Taq DNA (1U)	0,1 µM	0,1	
Amostra de DNA	250 ng	2,0	
Volume Final da Reação		25,0	
Volume por Mix		25,0	

2. REAÇÃO DE RESTRIÇÃO

- 2.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica;
- 2.2- Preparar a mix da Reação de Restrição;
- 2.3- Adicionar 15,0 µL de Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 2.4- Adicionar 5 µL de Mix da Reação de Restrição nos tubos e homogeneizar:
 - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o conteúdo da Enzima
- 2.5- Levar os microtubos ao Termociclador e deixar por 4 horas a 37°C.

3. GEL DE AGAROSE A 2%:

- 3.1- Diluir o TBE 10X em TBE 1X;
- 3.2- Com uma proveta separar 100ml de TBE 1X;
- 3.3- Pesar 2,5g Agarose;
- 3.4- Limpar a cuba horizontal que será utilizada e separar os dentes;
- 3.5- Dissolver a Agarose em 100 mL de TBE 1X em um Erlenmeyer de 250ml;
- 3.6- Aquecer a Solução em microondas até a solidificação completa da Agarose;
- 3.7- Adicionar 2µL de EtBr na solução e homogeneizar;
- 3.8- Despejar a solução na cuba e colocar cuidadosamente os perles;
- 3.9- Esperar solidificar;
 - Durante o processo de solidificação do agarose, preparar as amostras para aplicação no gel
- 3.10- Colocar 2 µL de Blue Juice em uma placa de Petri;
- 3.11- Após, colocar 3 µL do produto de restrição;
- 3.12- Homogeneizar e Aplicar os 10 µL do conteúdo no Gel de Agarose;
- 3.13- O Ladder deve ser aplicado ao final do primeiro poço, no volume de 2,5 µL quando for utilizado no volume de 50µL de Ladder original (Blue Juice);
- 3.14- Ajustar a fonte (Volts= 100, Amperes= 100 e Tempo=1hr) deixar o gel em corrida por 60 minutos;

Fonte: Invenção. 

Mix para Restrição – Polimorfismo I602S TLR-1

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	3,0	
Buffer4	1x	1,0	
Enzima Afa I 10U/µL	2 U	0,1	
Produto da PCR	-	15,0	
Volume Final da Reação		20,0	
Volume por Mix		5,0	

Inocular no Termociclador ou Banho Maria para tubos de 0,2 µL a 37°C por 4 horas

7.3.3 TLR4 (A299G):

1. POLIMORFISMO *Asp299Gly* TLR4 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR):

- Para a amplificação do polimorfismo *Asp299Gly* do TLR4, será utilizado a técnica de PCR descrita por Costa et al., (2017).

- 1.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específicos;
- 1.2- Preparar a mix da PCR, contendo:
- 1.3- Adicionar 2,0 μ L de DNA extraído de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 1.4- Adicionar 23 μ L da Mix de PCR nos tubos e homogeneizar
 - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Taq.
- 1.5- Levantar os microtubos ao Termobloco e utilizar o programa descrito abaixo:

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	5:00"	1
95°C	0:30"	
59°C	0:50"	40
72°C	0:50"	
72°C	7:00"	1
72°C	-	1

- 1.6- Após amplificação, Correr as amostras em gel de Agarose a 2%.

Tabela 01: Descrição dos primers, temperaturas de pareamento (Tp) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).

TLR4	LSR e ER ¹	Primer	Sequências 5' → 3'	Tp(°C)	PCR	RFLP
TLR4	- NotI	960F	AATCTGATCTATTAATTCGAGG	60°C	200bp	260bp 290bp
		960R	AAATGCAAGGCTTGGTGGATC			

1. Localização de Sítio de Restrição; 2. Direção da Restrição; 3. Tamanho do Produto.

Mix para Reação de PCR – Polimorfismo *Asp299Gly* TLR-4

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (μL)	Mix ____ Reações Vol (μL)
H ₂ O	-	16,9	
Buffer 10X PCR	1x	2,5	
dNTPs (200μM)	200 μM	1,0	
MgCl ₂	1,5 mM	1,0	
Primer TLR4299F	1,5 mM	0,25	
Primer TLR4299R	0,1 μM	0,25	
Taq DNA (IU)	0,1 μM	0,1	
Amostra de DNA	200 ng	2,0	
Volume Final da Reação		25,0	
Volume por Mix		25,0	

2. REAÇÃO DE RESTRIÇÃO

- 2.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específicos;
- 2.2- Preparar a mix da Reação de Restrição, contendo para cada reação;
- 2.3- Adicionar 15,0 μ L de Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 2.4- Adicionar 5,0 μ L da Mix da Reação de Restrição nos tubos e homogeneizar:
 - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Enzima.
- 2.5- Levantar os microtubos ao Termobloco e deixar por 4 horas a 37°C.

3. GEL DE AGAROSE A 2 %

- 3.1- Diluir o TBE 10x em TBE 1X;
- 3.2- Com uma proveta separar 100ml de TBE 1X;
- 3.3- Pesar 3g Agarose;
- 3.4- Limpar a cuba horizontal que será utilizada e separar os perfis;
- 3.5- Dissolver a Agarose em 100 mL de TBE 1X em um Erlenmeyer de 250mL;
- 3.6- Aquecer a Solução em microondas até a solidificação completa da Agarose;
- 3.7- Adicionar 2,5 μ L de Brometo de etídeo a solução e homogeneizar;
- 3.8- Deixar a solução no cuba e colocar cuidadosamente os perfis;
- 3.9- Esperar solidificar:
 - Durante o processo de solidificação da agarose, pressionar as amostras para aplicação no gel.
- 3.10- Colocar 2 μ L de Blue Juice em uma placa de Terasaki;
- 3.11- Após, colocar 8 μ L do produto de restrição;
- 3.12- Homogeneizar e Aplicar os 10 μ L do conteúdo no Gel de Agarose;
- 3.13- O Ladder deve ser aplicado ao final no primeiro poço, no volume de 2,5 μ L (quando for utilizado no volume de 5-10 μ L de Ladder original Blue Juice)
- 3.14- Ajustar a fonte (Volts= 100; Amperes= 100 e Tempo=1:30)te deixar o gel em corrida por 90 minutos;

Mix para Restrição – Polimorfismo *Asp299Gly* TLR-4

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (μL)	Mix ____ Reações Vol (μL)
H ₂ O	-	2,95	
Buffer3 ou CutSmart	1x	2,0	
Enzima NcoI 10U μ L	2 U	0,05	
Produto da PCR	-	15,0	
Volume Final da Reação		20,0	
Volume por Mix		5,0	

Incluir no Termobloco ou Banho Maria para tubos de 0,2 μ L a 37°C por 4 horas ou overnight

7.3.4 TLR4 (T3991):

1. POLIMORFISMO *Thr399Ile* TLR4 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR):

- Para a amplificação do polimorfismo *Thr399Ile* do TLR-4, será utilizado a técnica de PCR descrita por Costa et al., (2017).

- 1.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica;
- 1.2- Preparar o mix da PCR;
- 1.3- Adicionar 2,0 µL de DNA extraído de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 1.4- Adicionar 25 µL do Mix de PCR nos tubos e homogeneizar
 - *Evitar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Taq*
- 1.5- Levar os microtubos ao Termociclador e utilizar o programa descrito abaixo:

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	5:00"	1
95°C	0:30"	
63°C	0:30"	
72°C	0:15"	
72°C	5:00"	1
4°C	m	1

1.6- Após amplificação, Centrifugar os microtubos em gel de Agarose a 250.

Tabela 01: Descrição dos primers, temperatura de pranchamento (Tp) utilizada para a amplificação por PCR e tamanho das fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e etapa de restrição (RFLP).

TLR4	LRP ¹ e LRP ²	Primer	Sequência 5' - 3'	Tp ¹ (°C)	PCR	RFLP	Ref ²
TLR 4	LRP1	TLR4-69F	GCAGCTTTCAGAGTATTTGGGAGAA	63°C	1076	SspI	1
	LRP2	TLR4-39R	CAGTCATCTGTTTCAATTGGGATG				

1.1- Localização do sítio de Restrição 1. Exemplo de Restrição 2. Diagrama do Polimorfismo.

Mix para Reação de PCR - Polimorfismo *Thr399Ile* TLR-4

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix Reações Vol (µL)
H ₂ O		17,1	
Buffer 10X PCR	1x	2,5	
dNTPs (200µM)	200 µM	1,0	
MgCl ₂	1,5 mM	1,5	
Primer TLR4399F	1,5µM	0,25	
Primer TLR4399R	0,1 µM	0,25	
Taq DNA (1U)	0,1 µM	0,1	
Amostra de DNA	200 ng	2,0	
Volume Final da Reação		25,0	
Volume por Mix		19,0	

2. REACÃO DE RESTRIÇÃO

- 2.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica;
- 2.2- Preparar o mix da Reação de Restrição, conforme para cada amoça;
- 2.3- Adicionar 15,2 µL de Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 2.4- Adicionar 5,0 µL de Mix da Reação de Restrição nos tubos e homogeneizar.
 - *Evitar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial do Produto;*
- 2.5- Levar os microtubos ao Termociclador e deixar por 4 horas a 37°C.

3. GEL DE AGAROSE A 2%

- 3.1- Diluir o TBE 10X em TBE 1X;
- 3.2- Com uma proveta separar 100ml de TBE 1X;
- 3.3- Pesá 3g Agarose;
- 3.4- Limpar o tubo homogeneizador sem utilizar e separar as partes;
- 3.5- Dissolver a Agarose em 100 mL de TBE 1X em um Eletromotor de 250mL;
- 3.6- Aguardar a Solubilização mínima do sítio e solidificação completa da Agarose;
- 3.7- Adicionar 2,0µL de Brometo e solução e homogeneizar;
- 3.8- Deixar a solução no tubo e colocar cuidadosamente as partes;
- 3.9- Esperar solidificar.
 - *Durante o processo de solidificação da agarose, preparar as amostras para aplicação no gel.*
- 3.10- Colocar 2 µL de Sina Verde em uma placa de Versoiki;
- 3.11- Após, colocar 8 µL do produto de restrição;
- 3.12- Homogeneizar e Aplicar os 10 µL do conteúdo no Gel de Agarose;
- 3.13- O Ladador deve ser aplicado ao final no processo setup, no volume de 2,5 µL (quando for diluído no volume de 5,0µL de Ladador original 200x Juice)
- 3.14- Ajustar a fonte (Volts= 100; Amperes= 100 e Tempo=10) e deixar o gel em corrida por 60 minutos;

Mix para Restrição - Polimorfismo *Thr399Ile* TLR-4

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	3,65	
Buffer4	1x	1,25	
Enzima <i>Hinf-I</i> 100UµL	2 U	0,1	
Produto da PCR	-	15,0	
Volume Final da Reação		20,0	
Volume por Mix		19,0	

Inocular no Termociclador no Banho Maria para tubos de 0,2 µL a 37°C por 4 horas

7.3.5 TLR5 (R392S):

1. POLIMORFISMO *R392stopCodon TLR5* - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

- Para a amplificação do polimorfismo *R392stopCodon TLR5*, será utilizada a técnica de PCR descrita por Costa et al., (2017).

- 1.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rote especifíca;
- 1.2- Preparar a mix de PCR;
- 1.3- Adicionar 2,0 µL de DNA amostra de cada amostra em tubos previamente identificadas;
- 1.4- Adicionar 25 µL da Mix de PCR nos tubos e homogeneizar
 - **Laider de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Taq;**
- 1.5- Levam os microtubos ao Termociclador e utilizar o programa descrito abaixo

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	5:00'	1
55°C	0:30'	40
62°C	0:30'	
72°C	0:30'	
72°C	7:00'	1
4°C	-	1

- 1.6- Após amplificação, Correr as amostras em gel de Agarose a 2%

Tabela 10: Denominação das primers, temperaturas de programaro (T_p) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanho das fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).

TLR5	ISR e IR	Adenos	SeqPrimer 5' - 3'	T _p (°C)	PCR	RFLP	RFLP
R392S	-	TLR5F	GGTGGCTGAGCTGAACTTTC			27pb	
TLR5	WT	TLR5R	GAGGAGTGTGAGGATGAGGAGGAGG	62°C	27pb	10pb	1

1. Localização do Sítio de Restrição; 2. Tamanho da Restrição; 3. Composição do Fragmento.

Reagentes	[] Reação	Vol (µL)	Vol (µL)
H ₂ O		16,9	
Buffer 10X PCR	1x	1,5	
dNTPs (200µM)	200 µM	1,0	
MgCl ₂	1,5 mM	1,0	
Primer TLR5F	1,5 mM	0,25	
Primer TLR5R	0,1 µM	0,25	
Taq DNA (1U)	0,1 µM	0,1	
Amostra de DNA	200 ng	2,0	
Volume Final da Reação		25,0	
Volume por Mix		25,0	

2. REACÃO DE RESTRIÇÃO

- 2.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rote especifíca;
- 2.2- Preparar a mix da Reação de Restrição, contendo para cada amostra;
- 2.3- Adicionar 5,0 µL de Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 2.4- Adicionar 5,0 µL da Mix da Reação de Restrição nos tubos e homogeneizar;
 - **Laider de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Enzima;**
- 2.5- Levam os microtubos ao Termociclador e deixar por 4 horas a 37°C.

3. GEL DE AGAROSE A 2%

- 3.1- Dissolva 100mg TBE 10X em 100 mL de TBE 1X;
- 3.2- Com uma pipeta aseptica adicione 100µL de TBE 1X;
- 3.3- Pesem 2g Agarose;
- 3.4- Limpar a tava horizontal que será utilizado e separar os pontos;
- 3.5- Dissolver a Agarose em 100 mL de TBE 1X em um Erlenmeyer de 250mL;
- 3.6- Aguardar o esfriar em microtubos até a solidificação completa de Agarose;
- 3.7- Adicionar 2,5µL de Brometo a solução e homogeneizar;
- 3.8- Deixar a solução se solidificar e colocar cuidadosamente os pontos;
- 3.9- Espere solidificar;
 - **Durante o processo de solidificação de agarose, prepare as amostras para aplicação no gel.**
- 3.10- Colocar 2 µL de Blue Juice em uma placa de Terasaki;
- 3.11- Após, colocar 8 µL do produto da restrição;
- 3.12- Homogeneizar e Aplicar os 10 µL do conteúdo no Gel de Agarose;
- 3.13- O Laider deve ser aplicado ao final no primeiro poço, no volume de 2,5 µL (sendo 3x de diluição no volume de 50µL de Laide original Blue Juice);
- 3.14- Ajustar a corrente (Voltagem= 100; Amperagem= 100 e Temperatura= 37°C) e deixar o gel em corrida por 60 minutos;

Imagem ilustrativa

Mix para Restrição – Polimorfismo *R392stopCodon TLR5*

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	3,65	
Buffer3	1x	1,25	
Enzima DdeI 10U/µL	1 U	0,1	
Produto da PCR	-	15,0	
Volume Final da Reação		20,0	
Volume por Mix		5,0	

Incubar no Termociclador ou Banho Maria para tubos de 0,2 µL a 37°C por 4 horas

7.3.6 TLR6 (S249P):

1. POLIMORFISMO S249P TLR6 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR):

- Para a amplificação do polimorfismo S249P do TLR6, será utilizado a técnica de PCR descrita por Costa et. al., (2017).

- 1.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específicos;
- 1.2- Preparar a mistura PCR;
- 1.3- Adicionar 2,0 µL de DNA extraído de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 1.4- Adicionar 23 µL da Mix de PCR nos tubos e homogeneizar.
 - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Taq.
- 1.5- Levar os microtubos ao Termociclador e utilizar o programa descrito abaixo:

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	5:00	1
55°C	1:30	40
65°C	1:30	
72°C	1:30	
72°C	7:00	1
4°C	=	1

- 1.6- Após amplificação, Colocar as amostras em gel de Agarose a 2%.

Tabela 11: Descrição dos primers, temperaturas de pareamento (Tp) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e restrição (RFLP).

TLR6	LSR ¹ e BR ²	Primers	Sequências 5' → 3'	Tp ³ (°C)	PCR	RFLP
TLR6	S249P- Aval ⁴	TLR6F TLR6R	GCAI GCGAGGCGT TGTATGG GCAAAAAGGCGTTCAGCTGGG	55°C	213bp	213bp 103bp 110bp

1. Localização de Sítio de Restrição; 2. Endonúcleia de Restrição; 3. Temperatura de Pareamento;

2. REAÇÃO DE RESTRIÇÃO

- 2.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específicos;
- 2.2- Preparar a mix da Reação de Restrição, conforme para cada restrição;
- 2.3- Adicionar 10 µL do Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 2.4- Adicionar 6,0 µL da Mix da Reação de Restrição nos tubos e homogeneizar.
 - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Enzima;
- 2.5- Levar os microtubos ao Termociclador e deixar por 4 horas a 37°C.

3. GEL DE AGAROSE A 3%

- 3.1- Diluir o TBE 10X em TBE 1X;
- 3.2- Com uma proveta separar 100mL de TBE 1X;
- 3.3- Pesar 3g Agarose;
- 3.4- Limpar a cuba horizontal que será utilizada e separar os pedras;
- 3.5- Dissolver a Agarose em 100 mL de TBE 1X em um Erlenmeyer de 250mL;
- 3.6- Aquecer a Solução em microondas até a solubilização completa da Agarose;
- 3.7- Adicionar 2,0µL de Brometo a solução e homogeneizar;
- 3.8- Despejar a solução na cuba e colocar cuidadosamente as pedras;
- 3.9- Esperar solidificar.
 - Durante o processo de solidificação da agarose, preparar as amostras para aplicação no gel.
- 3.10- Colocar 2 µL de Blue Juice em uma placa de Petri;
- 3.11- Após, colocar 5 µL do produto da restrição;
- 3.12- Homogeneizar e Aplicar os 10 µL do conteúdo no Gel de Agarose;
- 3.13- O Ladder deve ser aplicado ao final no primeiro poço, no volume de 2,5 µL (quando for utilizado no volume de 6^o 0,4 µL de Ladder original (Blue Juice));
- 3.14- Ajustar a fonte (Volts= 100; Amperes= 100 e Tempo=1h) e deixar o gel em corrida por 60 minutos;

Mix para Reação de PCR – Polimorfismo S249P TLR-6

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	17,4	
Buffer 10X PCR	1x	2,5	
dNTPs (200µM)	200 µM	1,0	
MgCl ₂	1,5 mM	1,5	
Primer TLR6F	1,5mM	0,25	
Primer TLR6R	0,1 µM	0,25	
Taq DNA (1U)	0,1 µM	0,1	
Amostra de DNA	200 ng	2,0	
Volume Final da Reação		25,0	
Volume por Mix		25,0	

Mix para Restrição – Polimorfismo S249P TLR-6

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	3,65	
Buffer4	1x	1,25	
Enzima Aval ⁴ (10U)µL	1U	0,1	
Produto da PCR	-	15,0	
Volume Final da Reação		20,0	
Volume por Mix		5,0	

Incubar ao Termociclador o Banho Maria para tubos de 0,2 µL a 37°C por 4 horas

7.3.7 TLR9 (-1237C/T):

1. POLIMORFISMO -1237C/T TLR9 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR):

- Para a amplificação do polimorfismo -1237C/T do TLR9, será utilizado a técnica de PCR descrita por Cozta et al., (2017).

- 1.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica;
- 1.2- Preparar a mistura PCR;
- 1.3- Adicionar 2,0 µL de DNA extraído de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 1.4- Adicionar 23 µL da Mix de PCR nos tubos e homogeneizar
 - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Taq.
- 1.5- Levar os microtubos ao Termociclador e utilizar o programa descrito abaixo:

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	5:30'	1
95°C	1:30'	
55°C	2:30'	40
72°C	3:45'	
72°C	7:30'	1
4°C	"	1

- 1.6- Após amplificação, Correr as amostras em gel de Agarose a 2%.
- 1.7-

Tabela 01: Descrição dos primers, temperaturas de anneamento (Tp) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).

TLR9	LSR e ER ¹	Prímera	Sequências 5' – 3'	Tp (°C)	PCR	RFLP
TLR9	1237 C/T 5a/9a	TLR91237F	GCGTGGAGGAGAGGAGGAGG	59°C	100pc	80pc
		TLR91237R	ATCGGAGGAGGAGGAGGAGG			
						80pc
						27pc

1 Localização de SsrI na Reação; 2 Enzima de Restrição; 3 Temperatura de Funcionamento.

Mix para Reação de PCR – Polimorfismo -1237 C/T TLR-9

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	14,3	
Buffer 10X PCR	1x	2,5	
dNTPs (200µM)	20,0 µM	1,0	
MgCl ₂	1,5 mM	2,0	
Primer TLR91237F	1,5µM	0,25	
Primer TLR91237R	0,1 µM	0,25	
Taq DNA (IU)	0,1 µM	0,1	
Amostra de DNA	200 ng	2,0	
Volume Final da Reação		25,0	
Volume por Mix		23,0	

2. REAÇÃO DE RESTRIÇÃO

- 2.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica;
- 2.2- Preparar a mix da Reação de Restrição;
- 2.3- Adicionar 15,0 µL do Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 2.4- Adicionar 5,0 µL da Mix da Reação de Restrição nos Tubos e homogeneizar;
 - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Enzima.
- 2.5- Levar os microtubos ao Termociclador e deixar por 12 horas (overnight) a 60°C.

3. GEL DE AGAROSE A 4%

- 3.1- Diluir o TBE 10X em TBE 1X;
- 3.2- Com uma proveta separar 100ml de TBE 1X;
- 3.3- Pesar 4g Agarose;
- 3.4- Limpar a cuba horizontal que será utilizada e separar as pentes;
- 3.5- Dissolver a Agarose em 100 mL de TBE 1X em um Erlenmeyer de 250mL;
- 3.6- Aquecer a Solução em microondas até a solubilização completa da Agarose;
- 3.7- Adicionar 2,0 µL de Brometo a solução e homogeneizar;
- 3.8- Despejar a solução na cuba e colocar cuidadosamente os pentes;
- 3.9- Espenar solidificar;
 - Durante o processo de solidificação da agarose, preparar as amostras para aplicação no gel.
- 3.10- Colocar 5 µL de Blue Juice direto nos tubos contendo 25 µL do produto de restrição;
- 3.11- Homogeneizar e Aplicar os tocos o contendo no Gel de Agarose;
- 3.12- O Ladder deve ser aplicado ao final, no primeiro poço, no volume de 1 µL (quando for diluído no volume de 50µL de Ladder original Blue Juice)
- 3.13- Ajustar a fonte (Volts= 100, Amperes= 100 e Tempo/Time de zero gel em contida por 60 minutos);

The BioLabs, Inc. 2013

Mix para Restrição – Polimorfismo -1237 C/T TLR-9

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	3,6	
CatSmart	1x	1,5	
Enzima SsrI 10U/µL	3 U	0,1	
Produto da PCR	-	15,0	
Volume Final da Reação		20,0	
Volume por Mix		5,0	

Incluir no Termociclador ou Banho Maria para tubos de 0,2 µL, a 60°C por 12 horas (overnight).

7.3.8 TLR9 (-1486C/T):

1. POLIMORFISMO -1486C/T TLR9 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR):

- Para a amplificação do polimorfismo -1486C/T do TLR9, será utilizada a técnica de PCR descrita por Costa et. al., (2017).

- 1.1- Identificar e distribuir nos microtubos de 0,2 mL em rack específico;
- 1.2- Preparar a mix da PCR;
- 1.3- Adicionar 1,0 µL de DNA extraído de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 1.4- Adicionar 24 µL da Mix de PCR nos tubos e homogeneizar
 - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Taq;
- 1.5- Levar os microtubos ao Termociclador e utilizar o programa descrito abaixo:

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	5:00'	1
55°C	0:30'	40
55°C	0:30'	
72°C	0:30'	
72°C	7:00'	1
4°C	"	1

- 1.6- Após amplificação, Centrifugar as amostras em gel de Agarose a 200g.

Tabela 01: Descrição dos primers, temperaturas de pareamento (T_a) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).

TLR9	LSR ¹ e ER ²	Primers	Seq.âncoras 5' → 3'	T _a (°C)	PCR	RFLP
TLR9	-1486C/T -1486	TLR91486F TLR91486R	TATCGTCTATCCCGCTGCAATGT TCCCGAAGCTGATGCTGCG	37°C	14pb	111pb 34pb

1. Localização de Sítio de Restrição; 2. Enzima de Restrição; 3. Temperatura de Pareamento

Mix para Reação de PCR – Polimorfismo -1486 C/T TLR-9

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	16,9	
Buffer 10X PCR	1x	2,5	
dNTPs (20µM)	200 µM	1,0	
MgCl ₂	1,5 mM	2,0	
Primer TLR91486F	1,5µM	0,25	
Primer TLR91486R	0,1 µM	0,25	
Taq DNA (1U)	0,1 µM	0,1	
Amostra de DNA	200 ng	2,0	
Volume Final da Reação		20,0	
Volume por Mix		23,0	

2. REAÇÃO DE RESTRIÇÃO

- 2.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específico;
- 2.2- Preparar a mix da Reação de Restrição;
- 2.3- Adicionar 15,0 µL de Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 2.4- Adicionar 5,0 µL da Mix da Reação de Restrição nos tubos e homogeneizar;
 - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Enzima;
- 2.5- Levar os microtubos ao Termobloco e deixar por 4 horas a 37°C.

3. GEL DE AGAROSE A 4%

- 3.1- Diluir o TBE 10X em TBE 1X;
- 3.2- Com uma proveta aspirar 100 mL de TBE 1X;
- 3.3- Pesar 4g Agarose;
- 3.4- Limpar a cuta horizontal que será utilizada e separar os perfis;
- 3.5- Dissolver a Agarose em 100 mL de TBE 1X em um Erlenmeyer de 250mL;
- 3.6- Aquecer a Solução em microondas até a solubilização completa da Agarose;
- 3.7- Adicionar 2,0µL de Brometo a solução e homogeneizar;
- 3.8- Despejar a solução na cuta e colocar cuidadosamente os perfis;
- 3.9- Esperar solidificar;
 - Durante o processo de solidificação da agarose, preparar as amostras para aplicação no gel.
- 3.10- Colocar 2 µL de Blue Juice em uma placa de Terasaki;
- 3.11- Após, colocar 8 µL de produto de restrição;
- 3.12- Homogeneizar e Aplicar os 10 µL do conteúdo no Gel de Agarose;
- 3.13- O Ladder deve ser aplicado ao final no primeiro poço, no volume de 2,5 µL (quando for diluído no volume de 510 µL de Ladder original Blue Juice);
- 3.14- Ajustar a fonte (Volts= 100; Amperes= 100 e Tempo=1h) e deixar o gel em corrida por 60 minutos;

Mix para Restrição – Polimorfismo -1486 C/T TLR-9

Reagentes	[] Reação	1 Reação Vol (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H ₂ O	-	3,4	
CutSmart	1x	1,5	
Enzima AflII 10U/µL	1 U	0,1	
Produto da PCR	-	15,0	
Volume Final da Reação		20,0	
Volume por Mix		5,0	

Incubar no Termobloco ou Banho Maria para tubos de 0,2 µL a 37°C por 4 horas

7.4 APÊNDICE 04: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA -CEP-HEMOAM (CAAE:49652815.8.0000.0009) – AMOSTRA CONTROLE.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPITÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Pesquisador: ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49652815.8.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.406.965

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPITÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Trata-se de um estudo descritivo, transversal constituindo subprojeto de um estudo maior da linha de pesquisa sobre Biotecnologia & Saúde

intitulado: "Desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao diagnóstico e terapia de doenças infecciosas tropicais", que será desenvolvido pelos

grupos de Pesquisa "Virologia" da Universidade Federal do Pará – UFPA, em parceria com os grupos "Imunologia Básica e Aplicada" da

Universidade Federal do Amazonas e "Nanotecnologia" da Universidade Federal de Uberlândia- UFU. Ainda teremos apoio das Universidade da

California (UCDAVIS) e da Universidade de Miami(UM). Aprovado pelo Edital Pró-Amazônia n. 047/2012,

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Determinar a reatividade em soro de indivíduos HCV+ para peptídeos miméticos ao HCV identificados pela técnica phage display e caracterizar o

Endereço: Av. Constantino Nery 4307 Bl.D Dir Ens Pesq			
Bairro: Chepada		CEP: 69.050-002	
UF: AM	Município: MANAUS		
Telefone: (92)3655-0114	Fax: (92)3655-0112	E-mail: cep@hemocem.am.gov.br	

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.406.965

perfil de citocinas envolvidas no desenvolvimento de fibrose hepática em cultura de células

Objetivo Secundário:

- Selecionar e identificar peptídeos miméticos reativos a soros de pacientes HCV+ com fibrose hepática;
- Sequenciar os clones isolados e realizar análises de bioinformática;
- Descrever o perfil de citocinas envolvidos no desenvolvimento da fibrose em cultura de células mesenquimais e hepatócitos;
- Pré-validar os clones selecionados através de ensaios de Phage-ELISA utilizando proteínas totais de pacientes com fibrose hepática;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco de contaminação dos colaboradores da pesquisa com sangue contaminado com o vírus da Hepatite C

Benefícios: Conseguir desenvolver peptídeos que possam ser utilizados posteriormente em biossensores capazes de detectar proteínas presente em soro de

pacientes que possam predizer e servir de biomarcadores para diagnóstico de fibrose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa Relevante que busca detectar marcadores que auxiliem na detecção de peptídeos miméticos ao vírus da hepatite C capazes de predizer fibrose utilizando tecnologias combinadas em engenharia genética, como Phage Display com o intuito de gerar estratégias direcionadas para a investigação do processo do desenvolvimento da fibrose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	09/09/2015	-	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69 050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.406.965

Básicas do Projeto	ETO_579290.pdf	15:35:04		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/09/2015 15:32:42	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 15:30:02	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/09/2015 15:26:05	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.pdf	09/09/2015 15:21:14	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.docx	09/09/2015 14:46:19	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 12 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Elisa Brosina de Leon
(Coordenador)

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

7.5 APÊNDICE 05: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-HEMOAM (CAAE:0024.0.112.000-10) – AMOSTRA CONTROLE.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP CAAE- 0024.0.112.000-10 - VERSÃO 002/10

IDENTIFICAÇÃO	
Título:	Avaliação do perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus.
Instituição:	Fundação HEMOAM
Pesquisador:	Laura Patricia Viana Maia
Data da Reapresentação:	06.10.2010

OBJETIVOS	
Geral:	Avaliar o perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus.
Específico:	Avaliar a soroprevalência de doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B, através dos marcadores HBsAg e/ou anti-HBc; Analisar o perfil celular dos linfócitos T CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+; Analisar a sub-população de leucócitos ativadas através do marcador CD69+ (linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos); Analisar a sub-população linfócitos T reguladores através do marcador CD25+; Avaliar o perfil de citocinas TH1 (IL12 e IFN- γ); citocinas Th2 (IL-4); citocina supressora (IL-10) e citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF – α); f – Caracterizar os genótipos virais na população de doadores e correlacionar com a resposta imune encontrada.

SUMÁRIO DO PROJETO	
Metodologia:	Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo não-probabilístico que será realizado com doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc no período de novembro de 2010 a abril de 2011, com uma amostra de 123 doações reativas.
Caracterização da Amostra:	Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo não-probabilística que será realizado com todos os doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc do vírus da hepatite B no período de setembro de 2010 a setembro de 2011, totalizando 1.396 doadores (valor estimado).
Critérios de Inclusão	Doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos e os que apresentarem

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS – HEMOAM
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. CONSTANTINO NERY, 4397 – CHAPADA – CEP 69050-002 – MANAUS/AMAZONAS
FONE (92) 3655-0113 FAX (92) 3655-0112
E-mail: cep_hemoam@hotmail.com



	co-infecção (sífilis, doença de chagas, HCV, HIV e HTLV).
Crerios de Exclussão	Doadores que apresentarem resultados negativos para ambos os marcadores da hepatite B na segunda amostra de sangue.

COMENTÁRIOS DO CEP FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E RESOLUÇÕES COMPLEMENTARES

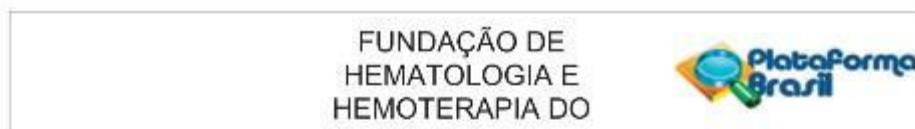
Na análise do protocolo observou-se que os autores responderam aos questionamentos descritos no parecer anterior.

PARECER DO CEP

Projeto Aprovado. Conforme determinado pela resolução CNS 196/96 os pesquisadores deverão apresentar a este CEP relatórios parcial e/ou final, ficando determinado desde então, o prazo para apresentação de relatório: 27/04/2011. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem se apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O termo de Consentimento deverá ser aplicado em duas vias sendo que uma delas ficará com o sujeito da pesquisa.

SITUAÇÃO	DATA DO PARECER
APROVADO	26.10.2010

7.6 APÊNDICE 06: DOCUMENTO DE PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-HEMOAM – AMOSTRA CASO.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo dos polimorfismos nos genes dos receptores e citocinas da imunidade inata em pacientes diagnosticados com leucemia linfóide aguda

Pesquisador: Fabíola Silva Alves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12615918.9.0000.0009

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO DE APOIO AO HEMOAM SANGUE NATIVO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.393.207

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo longitudinal, analítico e descritivo, para avaliar a influência dos polimorfismos nos genes dos receptores TLRs, NLRPs e citocinas inflamatórias IL-1 e IL-18 em pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA). A amostragem será composta por aproximadamente 200 indivíduos diagnosticados com LLA no período de 2010 a 2017. As amostras de DNA serão obtidas da DNAteca do Laboratório de Tipagem de HLA da Fundação HEMOAM. Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo serão obtidos no Sistema de Atendimento Médico e Estatístico (SAME), Sistema iDoctor e Setor de Estatística da Fundação HEMOAM. Serão incluídos pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda, de faixa etária geral e que possuem amostras criopreservadas no laboratório de tipagem de HLA da Fundação HEMOAM.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos são exequíveis e estão coerentes com a proposta:

Objetivo Primário: Avaliar a influência dos polimorfismos nos genes dos receptores TLRs, NLRPs e citocinas inflamatórias IL-1 e IL-18 em pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA).

Objetivo Secundário:

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bl. A, Sala do CEP-HEMOAM
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemcom@gmail.com

8 ANEXOS

8.1 MANUSCRITO SUBMETIDO COMO PRIMEIRO AUTOR.

Hematological Oncology



SNPs in Toll-like Receptor genes associated with Acute Lymphoblastic Leukemia and Infectious Comorbidities in patients from the Brazilian Amazon

Journal:	<i>Hematological Oncology</i>
Manuscript ID:	HON-20-0253
Wiley - Manuscript type:	Original Research Article
Date Submitted by the Author:	03-Jun-2020
Complete List of Authors:	Xabregas, Lilyane ; Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia Alves, Fabíola ; Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia Rodrigues, Maria Gabriela ; Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical Santos-Neto, Firmino ; Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Diretoria de Ensino e Pesquisa Souza, Gláucia ; Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia Cama, Fábio ; Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada Kerr, Marlon ; Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia Tarragô, Andréa ; Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Diretoria de Ensino e Pesquisa Santiago, Mirian ; Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Diretoria de Ensino e Pesquisa Carvalho, Maria ; Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Diretoria de Ensino e Pesquisa Malheiro, Adriana ; Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada Costa, Allyson ; Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Diretoria de Ensino e Pesquisa ; Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia
Keywords:	Childhood leukemia, Immunologic system, Toll-like receptors, Single Nucleotide Polymorphisms

SCHOLARONE™
Manuscripts

<http://mc.manuscriptcentral.com/hon>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 SNPs in Toll-like Receptor genes associated with Acute Lymphoblastic 2 Leukemia and Infectious Comorbidities in patients from the Brazilian Amazon

3 4 SNPs in TLR and Acute Lymphoblastic Leukemia

5
6 Lilyane Amorim Xabregas^{1,2}, Fabíola Silva Alves^{1,2}, Maria Gabriela Almeida
7 Rodrigues³, Firmino Martins Santos-Neto², Gláucia Lima Souza^{1,2}, Fábio Magalhães
8 Gama⁴, Marlon Wendell Athaydes Kerr^{1,2}, Andréa Monteiro Tarragô^{1,2}, Mirian
9 Rodrigues Ribeiro Santiago^{1,2}, Maria Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho^{1,2}, Adriana
10 Malheiro^{1,2,3,4}, Allyson Guimarães Costa^{1,2,3,4,5*}

11 1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do
12 Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;

13 2. Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
14 (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil;

15 3. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA),
16 Manaus, AM, Brazil;

17 4. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas,
18 Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;

19 5. Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira
20 Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil;

21
22 *Corresponding author: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
23 (HEMOAM), Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, Manaus, AM, CEP 69050-001, Brazil. Phone: +55
24 (92) 98153-5233. E-mail: allyson.gui.costa@gmail.com.

25 26 27 ABSTRACT

28 Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common hematological neoplasm and
29 the main cause of childhood mortality. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in key
30 molecules of the immune system, such as Toll-Like receptors, are associated with the
31 development of various diseases, however, their role in ALL is unknown. In this study,
32 we described the frequency of Toll-Like receptor polymorphisms in patients with acute
33 lymphoblastic leukemia and their association with clinical prognosis. A case-control
34 study was carried out with 152 DNA samples from patients with ALL and 187 samples
35 from individuals without the disease (control group). Genotypic and allelic
36 discrimination was performed using the Polymerase Chain Reaction-Restriction
37 Fragment Length Polymorphism method (PCR-RFLP) for the *TLR1 S602I*
38 (*rs5743618*), *TLR4 A299G* and *I399T* (*rs4986790* and *rs4986791*), *TLR5 R392S*
39 (*rs5744105*), *TLR6 S249P* (*rs5743810*), *TLR9 -1237C/T* and *-1486C/T* (*rs5743836*
40 and *rs187084*) and *CD14 -159* (*rs2569191*) polymorphisms. Descriptive and statistical
41 analysis was performed using Microsoft Excel 2013 and GraphPad Prism v.5.0
42 software. The C/C genotype from *-1486C/T* polymorphism (*TLR9*) was associated with
43 the risk of development acute lymphoblastic leukemia (*TLR9*: T/T + C/T vs. C/C OR =
44 2.0 [95% CI: 1.1 -3.5, $p=0.01$]; C/T vs. C/C OR = 2.2 [95% CI: 1.2–4.1, $p=0.00$]). In
45 addition, the T/T genotype from *-1486 C/T* (*TLR9*) was associated with the presence
46 of comorbidities on diagnosis (*TLR9*: T/T C/T vs. C/C OR = 2.1 [95% CI: 1.1- 4.3,
47 $p=0.04$]; T/T vs. C/T OR = 2.2 [95% CI: 1.0-4.7, $p=0.04$]). Our findings suggest a
48 significant role for the *-1486C/T* (*TLR9*) SNP in the development and presence of
49 infectious comorbidities in patients with acute lymphoblastic leukemia.

[Digite aqui]

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Keywords: Childhood leukemia, Immunologic system, Toll-like receptors, Single Nucleotide Polymorphisms.

1. INTRODUCTION

Leukemia is one of the leading causes of cancer deaths worldwide, and has shown a significant increase in the number of cases in the period from 1990 to 2018 (rising from 297.000 to 437.033 cases)¹. In Brazil, approximately 10,810 new cases in both genders are expected between 2020 and 2022². In the Northern region of Brazil, leukemia is the fifth most common type of cancer and the State of Amazonas recorded 843 cases of Acute Leukemia from 2005 to 2015, of which 68% of the cases were diagnosed as Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)²⁻⁴.

ALL is the most common subtype of leukemia in childhood and it is responsible for the highest infant mortality rates in the 0-15 year age group³⁻⁵. The neoplasm process originates from genetic errors that contribute to the blocking of cell maturation and the accumulation of leukemic clones (blasts) in the medullary microenvironment. Its etiology is still unknown, however, some risk factors had been associated to its development, such as environmental, genetic and infectious factors^{6,7}.

Evidence from previous studies suggests that ALL is related to a deficit in the regulation of the immune system in early childhood⁸⁻¹³. In addition, it is suggested that polymorphisms or genetic variations in the genes of important molecules in the development and progression of diseases may prove to be important factors in the increase of intrinsic biological differences, thus influencing clinically different results and conferring genetic susceptibility to cancer^{14,15}.

The immune system is compared to a pathway with two likely routes, where adequate regulation provides longevity and protection against infectious comorbidities, diseases and neoplasms, while changes in molecules, which are responsible for the expression or cell signaling associated with the immune system, can induce autoimmune and carcinogenic processes, among them, hematopoietic neoplasms¹⁶⁻¹⁸.

Toll-Like receptors are the main family of Pattern Recognition Receptors (PRRs) of the innate immune system involved in fighting pathogens that recognize Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) and Damage-Associated Molecular Patterns

[Digite aqui]

1
2
3 84 (DAMPs), and are responsible for the activation of cells that mediate the immune
4
5 85 response. In addition, TLRs are vital molecules in regulating the activation of adaptive
6
7 86 immunity and essential in cancer prevention and cure¹⁹⁻²².

8
9 87 Genetic variations in the TLR genes are considered risk factors for prostate
10
11 88 cancer, rectal colon, in addition to non-Hodgkin B cell lymphomas^{14,23-26}. Single
12
13 89 Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in TLR genes can lead to changes in the immune
14
15 90 system and variations have been identified in different types of tumors, both solid
16
17 91 tumors and in hematological malignant transformation^{18,20-23}. However, the role of
18
19 92 immunogenic genes that play a crucial role in ALL are yet to be elucidated. In this
20
21 93 study, SNPs in the TLR genes and in the CD14 co-receptor were identified in patients
22
23 94 diagnosed with ALL in the State of Amazonas, in order to describe their frequency and
24
25 95 their influence on the clinical prognosis. This is the first study to report the association
26
27 96 of SNPs involving Toll-Like receptors in patients with acute lymphoblastic leukemia in
28
29 97 the Brazilian Amazon.

28
29 98

30 31 99 **2. MATERIAL AND METHODS**

32 33 100 **2.1 Samples profile**

34
35 101 A case-control study was carried out in the State of Amazonas, Northern Brazil,
36
37 102 with biological samples obtained between 2010 and 2017 at the Fundação Hospitalar
38
39 103 de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). The HEMOAM is located
40
41 104 in capital of the state of Amazonas, Manaus, and is responsible for all activities related
42
43 105 to hematology and hemotherapy in the state, in addition to attending patients from
44
45 106 other regions of the Brazilian Amazon.

46
47 107 A total of 339 samples were used. These were segregated into two groups: the
48
49 108 Case group, which was composed of 152 biological samples from patients with ALL
50
51 109 diagnosed by myelogram and cell immunophenotyping, in which the samples were
52
53 110 cryopreserved in the DNA library of the Compatibility Typing Laboratory, and the
54
55 111 Control group, which was composed of 187 samples from blood donors with negative
56
57 112 serology for the pathogens which are verified for blood donation (HBV, HCV, HIV,
58
59 113 HTLV, Syphilis, Malaria and Chagas Disease).

58
59
60
[Digite aqui]

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

114 This study was approved by the Research Ethics Committee of the Fundação
115 Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM), under
116 protocol number 3.393.207/2019.

117 2.2 Case group data collection

118 The clinical and demographic data collection was carried out with the support of
119 the HEMOAM Medical and Statistical Service System (SAME) team. The data
120 regarding gender, age, blood count, presence of comorbidities [Infectious diseases
121 and others], relapse and death were obtained from physical and electronic medical
122 records.

123 2.3 Healthy group samples and data collection

124 A clinical-epidemiological form was applied, and subsequently approximately
125 12mL of peripheral blood was obtained by venipuncture in tubes with a vacuum system
126 containing EDTA and Separator Gel (Gel BD SST® II Advance) for the performing of
127 blood count, biochemical tests and serology.

128 2.4 Genotyping of TLR1, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9 and CD14 polymorphisms

129 The *TLR1* 1602S (*rs5743618*), *TLR4* A299G (*rs4986790*), *TLR4* T399I
130 (*rs4986791*), *TLR5* R392StopCodon (*rs5744105*), *TLR6* S249P (*rs5743810*), *TLR9* -
131 1237C/T (*rs187084*), *TLR9* -1486 C/T (*rs5743836*) and *CD14* -159 (*rs2569191*) SNPs
132 were genotyped using the Restriction Fragment Length Polymorphism technique by
133 Polymerase Chain Reaction (PCR-RFLP) in accordance with COSTA et al²⁷. For the
134 PCR-RFLP, DNA was extracted using the illustra triplePrep Kit® Genomicprep DNA
135 Extration (GE Healthcare Life Sciences), BIOPUR Mini Spin plus® extraction kit
136 (Mobius Life Science) and QIAmp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) for the
137 case and control groups, respectively. The PCR reaction was performed with 2µL of
138 genomic DNA (20ng) added to 23µL of amplification mixture which contained 0.1µL of
139 Taq Platinum Polymerase (2UI), 2.5µL of 10x buffer (containing 100 mmol/L Tris -HCl
140 [pH 8.3] and 500 mmol/L KCL), 2µL of MgCl₂ (1.5 mmol/L), 1µL of dNTPs (40mmol/L),
141 0.25µL of each forward and reverse primer (0.25 pmol/L) and 16.9µL of ultrapure
142 water. A total of 10µL of PCR product was digested with 5U of the respective restriction
143 endonuclease (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and 10x enzyme buffer
144 according to the manufacturer's instructions. Primers, PCR cycle conditions and
145 restriction endonucleases are shown in Supplementary Table 1. The fragments were

[Digite aqui]

1
2
3 146 separated by 3–4% agarose gel electrophoresis stained with GelRed™ Nucleic Acid
4
5 147 Gel Staining (Biotium, Hayward, CA, USA) and visualized on the UV light Gel + DocXR
6
7 148 System transilluminator (Bio-Rad Corporation, Hercules, CA, USA) using a
8
9 149 photographic documentation system.

10 11 150 **2.5 Data analysis**

12 151 Sociodemographic variables were tabulated and stored in the database created
13
14 152 with Microsoft Excel® v.2013 software. Statistical and descriptive analyses were
15
16 153 performed using Stata v.13 (StataCorp LP, College Station, TX, USA) and GraphPad
17
18 154 Prism v.5 (San Diego, CA, USA), with significance levels of 5%. The comparison
19
20 155 between groups was performed using the Chi-square test (χ^2) or Fisher's exact test,
21
22 156 with a 95% confidence interval (95% CI). The univariate logistic regression model was
23
24 157 used to investigate the association between polymorphisms with the occurrence of ALL
25
26 158 and the presence of infectious comorbidities, relapse and death in patients. The Hardy-
27
28 159 Weinberg Equilibrium (EHW) was determined by comparing the observed and
29
30 160 expected frequencies of the studied genotypes and alleles and was applied to both
31
32 161 groups via the website: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

32 162

34 163 **3. RESULTS**

36 164 **3.1 General characteristics of the study population**

38 165 In Table 1, the epidemiological and clinical characteristics of the study
39
40 166 population are described. The median age was 30 years for the control group and 12
41
42 167 years for the case group. The male gender was predominant in both groups (control
43
44 168 and case), 133 (71%) and 95 (62%), respectively. In relation to presence of
45
46 169 comorbidities, 69 (45%) patients presented comorbidity during the diagnosis and 66
47
48 170 (96%) had comorbidities from infectious etiology (cytomegalovirus, toxoplasmosis,
49
50 171 rubella, chickenpox, parasitic diseases, among others). A total of 114 (75%) patients
51
52 172 relapsed during the treatment period and 67 (44%) died (Table 1). In addition, the
53
54 173 patients had a median hemoglobin concentration of 8.6 g/dL, hematocrit 25.1 g/dL,
55
56 174 leukocyte counts were 9,435/mm³ and platelet counts were 58,000/mm³.

56 175

57 176 **Table 1.** Epidemiological and clinical characteristics of the population in the study.

58 177

[Digite aqui]

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

178 3.2 Association of the polymorphisms in *TLR9 -1486C/T* with ALL

179 In Table 2, the genotype and allele distributions of the SNPs under study are
180 described. There was a significant difference in the distribution of these frequencies
181 between the case and control group in the SNP *TLR9 -1486C/T*. The wild homozygous
182 (C/C) genotype from SNP *-1486C/T* suggested a two-fold increased risk for the
183 development of ALL (TLR9: T/T + C/T vs. C/C OR=2.0 [95% CI: 1.1-3.6, $p=0.01$]; C/T
184 vs. C/C OR=2.3 [95% CI: 1.2-4.2, $p=0.00$]). However, we did not observe any
185 association with the C allele (OR: 1.2 [95% CI: 0.9 - 1.6, $p=0.27$)

186

187 **Table 2.** Association between the TLRs and CD14 polymorphisms and acute
188 lymphoblastic leukemia patients.

189

190 3.3 Association of the polymorphisms in *TLR9-1486C/T* with infectious 191 comorbidities in patients with acute lymphoblastic leukemia

192 In Figure 1, the distribution of the frequency of genotypes among the clinical
193 variables studied (infectious comorbidities, relapse and death) in the case group are
194 shown. In Table 3, the data regarding the association of polymorphisms with clinical
195 variables are summarized. The patients with ALL who have the genotype T/T from -
196 *1486 C/T (TLR9)* present double the risk of having infectious comorbidities during
197 clinical follow-up (TLR9: T/T + C/T vs. C/C OR=2.1 [95% CI: 1.1-4.3, $p=0.04$]; T/T vs.
198 C/T OR=2.2 [95% CI: 1.0-4.7, $p=0.04$]). In relation to relapse and death, no association
199 with the SNPs under study was observed. In Table 4, it is possible to observe that no
200 association of the alleles with the clinical variables was found.

201

202 **Figure 1:** Distribution of the frequencies of the TLR and CD14 genotypes among the
203 clinical variables in patients with acute lymphoblastic leukemia.

204 **Table 3.** Association between the TLRs and CD14 genotypes and comorbidities
205 (infectious diseases), relapse and death in patients with acute lymphoblastic leukemia.

206 **Table 4.** Association between the TLRs and CD14 alleles and comorbidities (infectious
207 diseases), relapse and death in patients with acute lymphoblastic leukemia.

208

209 4. DISCUSSION

[Digite aqui]

1
2
3 210 The State of Amazonas, located in the Amazon region of Brazil, is known for its
4
5 211 tropical climate and for a highly heterogeneous population that is exposed to various
6
7 212 pathogens. In addition, it has different endemic areas for infectious diseases, which
8
9 213 could contribute to the modulation of the immune response and, consequently, the
10 214 triggering of physiological, genetic and hematological changes²⁸. The biological profile
11
12 215 of ALL is still unknown and has different patterns according to the various geographic
13
14 216 and ethnic regions in the world^{4,28-30}.

15
16 217 Studies involving the genetic characteristics of immune system molecules in
17
18 218 patients with hematological neoplasms have been carried out. Polymorphisms or
19
20 219 genetic variations in the genes of important molecules in the immune response
21
22 220 involved in the progression of diseases may prove to be important factors in the
23
24 221 amplification of intrinsic biological differences, and influence clinically different results
25
26 222 and confer genetic susceptibility to cancer^{14,15}. Several genetic polymorphisms have
27
28 223 already been described in TLRs capable of modifying the balance between pro and
29
30 224 anti-inflammatory cytokines, thus modulating the risk of infection, chronic inflammation
31
32 225 and cancer in different populations, however, their relationship with ALL has not yet
33
34 226 been fully elucidated^{14,22,31-33}.

35
36 227 In our study, ALL was predominant in patients with a median age of 12 years
37
38 228 and male, in accordance with the literature^{4,29,34}. When the genotype distribution of the
39
40 229 *1602S (TLR1)*, *A299G (TLR4)*, *T399I (TLR4)*, *R392S (TLR5)*, *S249P (TLR6)*, *-1237*
41
42 230 *C/T (TLR9)*, *-159 C/T (CD14)* polymorphisms in ALL were observed, no association
43
44 231 was found. However, the genotype C/C from *-1486 C/T (TLR9)* has a two-fold
45
46 232 increased risk of developing ALL (TLR9: T/T + C/T vs. C/C OR = 2.0 [95% CI: 1.1-3.6,
47
48 233 $p=0.01$]; C/T vs. C/C OR = 2.3 [95% CI: 1.2-4.2, $p=0.00$]), as well as twice the chance
49
50 234 of presenting comorbidities on diagnosis (TLR9: T/T + C/T vs. C/C OR = 2.1 [95% CI:
51
52 235 1.1-4.3, $p=0.04$]; T/T vs. C/T OR = 2.2 [95% CI: 1.0-4.7, $p=0.04$]).

53
54 236 Studies have demonstrated that the exchange of T/C nucleotides in *-1237* and
55
56 237 *-1486* SNPs located on the TLR9 promoter region is capable of creating two additional
57
58 238 binding sites for transcription factors, Sp-1 and NF-kappa B, which can be functionally
59
60 239 relevant³⁵. Variant alleles of these polymorphisms can change the functional capacity
240 of *TLR9* gene and modify the response to bacterial pathogens, thus varying the
241 susceptibility to the interindividual disease³⁶⁻³⁸.

[Digite aqui]

1
2
3 242 Research involving polymorphisms in TLR genes in ALL is scarce, however, in
4
5 243 2006, NIETERS and collaborators demonstrated that the -1486 C/T and -1237 C/T
6
7 244 (*TLR9*) SNPs can be considered risk factors for the development of non-Hodgkin's
8
9 245 lymphoma³⁹. In addition, C/T and C/C genotypes from *TLR9* -1486 C/T polymorphism
10
11 246 were associated with an increased risk of early cervical cancer⁴⁰. Other variants of
12
13 247 *TLR9* have also been described as risk factors for diseases such as non-Hodgkin's
14
15 248 lymphoma, endometrial and cervical cancer^{41,42}.

16 249 In contrast, a study conducted on Hodgkin's lymphoma suggests that carriers of
17
18 250 the C allele from *TLR9* -1237 C/T SNP have a 2.5-fold increased risk of developing the
19
20 251 disease⁴³. A survey with patients diagnosed with Acute Myeloid Leukemia (AML)
21
22 252 showed that the C (*TLR9* -1237 C/T) and T (*TLR9* -1486 C/T) alleles were associated
23
24 253 with a predisposition to the disease. It was also observed that the T/T genotype from -
25
26 254 1486 polymorphism (*TLR9*) was more frequent in patients who relapsed⁴⁴.

27 255 The T/T genotype from *TLR9* 2848 C/T variant was associated with an
28
29 256 increased risk of advanced cervical cancer in a population in Northern India⁴⁵. Among
30
31 257 Americans with European ancestry, studies suggest an increased risk of asthma can
32
33 258 associated to the C allele from *TLR9* -1237C/T SNP (OR 1.85, 95% CI 1.05 - 3.25)⁴⁶.

34
35 259 Similarly to our results, a study involving polymorphisms of the *TLR4* gene
36
37 260 (*A299G* and *T399I*) and the risk to ALL carried out in the population of Turkey also
38
39 261 found no association⁴⁷. However, a study with patients with cervical cancer (CRC)
40
41 262 reported that the C/C genotype from *TLR4* *T399I* variant and the A and G alleles from
42
43 263 *TLR4* *A299G* polymorphism may influence the increased risk of developing the
44
45 264 disease⁴⁰. In addition, a higher frequency of homozygous G/G and T/T genotypes from
46
47 265 *A299G* and *T399I* SNPs was shown in patients with rectal cancer, which may be
48
49 266 associated with susceptibility to the disease⁴⁸. In a population in Western India,
50
51 267 PANDEY et. al⁴⁹ suggested that the heterozygous genotype (A/G) from SNP *A299G*
52
53 268 (*TLR4*) could be associated with HPV 16/18 infection and could be a risk factor for
54
55 269 uterine cancer.

56
57 270 Similar to our study with ALL, when comparing the frequencies of the genotypes,
58
59 271 the wild homozygote was also the most frequent when compared to all *TLR*
60
272 polymorphisms, except in -1486 (*TLR9*) and -159 (*CD14*), however, no association
273 was observed. In contrast, in a study carried out in Egypt, involving the -1237 C/T

[Digite aqui]

1
2
3 274 polymorphism from the *TLR9* gene, a frequency of 58% of the heterozygous genotype
4
5 275 (C/T) and only 1% of the homozygous genotype (C/C) was observed. This difference
6
7 276 presented a significant four-fold risk of developing non-Hodgkin's B-cell lymphoma²⁶.

8
9 277 When we observed the TLRs and CD14 SNPs in the ALL patient group and
10
11 278 compared them to the relapse and death variables, no association was found.
12
13 279 However, our study has some limitations. Due to the small sample size, a validation
14
15 280 with a larger sample size would be necessary in order to confirm the importance of
16
17 281 studying polymorphisms in TLR genes in patients with ALL.

18
19 282

20 21 283 **CONCLUSION**

22
23 284 In conclusion, our findings suggest a significant role for the -1486C/T (*TLR9*)
24
25 285 SNP in the development and presence of infectious comorbidities in acute
26
27 286 lymphoblastic leukemia. To our knowledge, this study is the first to report the
28
29 287 association of polymorphisms in the TLRs and CD14 genes and ALL in individuals from
30
31 288 the Brazilian Amazon. TLRs are important for the recognition of PAMPs/DAMPs and
32
33 289 induce cells to produce inflammatory molecules and activate the immune response.

34
35 290

36 37 291 **ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE**

38
39 292 All protocols and consent forms were approved by the Research Ethics Committee at
40
41 293 the HEMOAM Foundation (CEP/HEMOAM process 3.335.123/2019). Patients were
42
43 294 treated according to the recommendations of Brazilian Health Ministry.

44
45 295

46 47 296 **CONFLICTING INTERESTS**

48
49 297 The authors declare no commercial or other associations that might pose conflict of
50
51 298 interests.

52
53 299

54 55 300 **FUNDING**

56
57 301 This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do
58
59 302 Amazonas (FAPEAM) (Pró-Estado Resolution [#002/2008, #007/2018 and #005/2019]
60
303 and PAPAC Program [#005/2019]), Rede de Genômica de Vigilância em Saúde do
304
Estado do Amazonas (REGESAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico

[Digite aqui]

1
2
3 305 e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
4 306 Superior (CAPES). LAX, FSA, MGAR and FMSN have fellowships from FAPEAM
5 307 (Masters and SI students). MWAK and FMG have fellowships from CAPES (Masters
6 308 student). AM is level 2 research fellow from CNPq. The funders had no role in study
7
8 309 design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the
9
10 310 manuscript.
11
12
13
14
15

16 311

17 312 REFERENCES

- 18
19 313 1. Bawazir A, Al-Zamel N, Amen A, Akiel MA, Alhawiti NM, Alshehri A. The
20 314 burden of leukemia in the Kingdom of Saudi Arabia: 15 years period (1999-
21 315 2013). *BMC Cancer*. 2019;19(1):1-10. doi:10.1186/s12885-019-5897-5
22
23 316 2. INCA. *ESTIMATIVA 2020/ Incidência de Câncer No Brasil.*; 2020.
24
25 317 3. Alves S, Wendell M, Id ALS, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a
26 318 Brazilian Amazon population : Epidemiology and predictors of comorbidity and
27 319 deaths. *PLoS One*. 2019;14(e0221518):1-16.
28 320 doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221518
29 321 4. Reis RDS, Camargo B De, Santos MDO, et al. Childhood Leukemia Incidence
30 322 in Brazil According to Different Geographical Regions. *Pediatr blood cancer*.
31 323 2011;56(2011):58-64. doi:10.1002/pbc
32
33 324 5. Abboud MR, Ghanem K, Muwakkit S. Acute lymphoblastic leukemia in low and
34 325 middle-income countries. *Curr Opin Oncol*. 2014;26(6):650-655.
35 326 doi:10.1097/CCO.000000000000125
36
37 327 6. Zuckerman T, Rowe J. Pathogenesis and prognostication in acute
38 328 lymphoblastic leukemia. *F1000Prime Rep*. 2014;6(July):3-7. doi:10.12703/P6-
39 329 59
40
41 330 7. Ladines-Castro W, Barragán-Ibañez G, Luna-Pérez MA, et al. Morphology of
42 331 leukaemias. *Rev Médica del Hosp Gen México*. 2016;79(2):107-113.
43 332 doi:10.1016/j.hgmx.2015.06.007
44
45 333 8. Greaves MF. Differentiation-Linked Leukemogenesis Origins of Phenotypic
46 334 Diversity in. *Science (80-)*. 1986;234.

[Digite aqui]

<http://mc.manuscriptcentral.com/hon>

- 1
2
3 335 9. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet*. 1997;349(9048):344-349.
4
5 336 doi:10.1016/S0140-6736(96)09412-3
6
7 337 10. Greaves M. The 'delayed infection' (aka 'hygiene') hypothesis for childhood
8 leukaemia. In: *The Hygiene Hypothesis and Darwinian Medicine*. Basel:
9 338 Birkhäuser Basel; 2009:239-255. doi:10.1007/978-3-7643-8903-1_13
10
11 339
12
13 340 11. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia.
14
15 341 *Nat Rev Cancer*. 2018;18(8):471-484. doi:10.1038/s41568-018-0015-6
16
17 342 12. Kinlen L. Childhood leukaemia, nuclear sites, and population mixing. *Br J*
18
19 343 *Cancer*. 2011;104(1):12-18. doi:10.1038/sj.bjc.6605982
20
21 344 13. Kinlen LJ. Childhood leukemia and population mixing. *Cancer Causes Control*.
22
23 345 2016;27(12):1499. doi:10.1007/s10552-016-0819-1
24
25 346 14. Monlish DA, Bhatt ST, Schuettpeiz LG. The Role of Toll-Like Receptors in
26
27 347 Hematopoietic Malignancies. *Front Immunol*. 2016;7(SEP):390.
28
29 348 doi:10.3389/fimmu.2016.00390
30
31 349 15. Saborit-Villarroya I, Vaisitti T, Rossi D, et al. E2A is a transcriptional regulator
32
33 350 of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2011;25:479-
34
35 351 488. doi:10.1038/leu.2010.291
36
37 352 16. Jacqueline C, Tasiemski A, Sorci G, et al. Infections and cancer: The "fifty
38
39 353 shades of immunity" hypothesis. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1-11.
40
41 354 doi:10.1186/s12885-017-3234-4
42
43 355 17. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and
44
45 356 targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent*. 2019;43(1). doi:10.1186/s42269-
46
47 357 019-0227-2
48
49 358 18. Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S.
50
51 359 Immune system: A double-edged sword in cancer. *Inflamm Res*.
52
53 360 2013;62(9):823-834. doi:10.1007/s00011-013-0645-9
54
55 361 19. Porcelli SA. *EFFECTOR MECHANISMS IN AUTOIMMUNITY AND*
56
57 362 *INFLAMMATION CHAPTER 17 Innate Immunity*. Tenth Edit. Elsevier Inc.;
58
59 363 2017. doi:10.1016/B978-0-323-31696-5.00017-6
60

[Digite aquí]

- 1
2
3 364 20. Mcdonald DR, Levy O. 3 - *Innate Immunity*. Fifth Edit. Elsevier Ltd
4
5 365 doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00003-X
6
7 366 21. Ishii KJ, Akira S. *Cap 3 – Innate Immunity*. Third Edit. Elsevier; 2008.
8
9 367 doi:10.1016/B978-0-323-04404-2.10003-X
10
11 368 22. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin*
12
13 369 *Immunol*. 2006;117(5):979-987. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.023
14
15 370 23. Harsini S, Beigy M, Akhavan-Sabbagh M, Rezaei N. Toll-like receptors in
16
17 371 lymphoid malignancies: Double-edged sword. *Crit Rev Oncol Hematol*.
18
19 372 2014;89(2):262-283. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.08.010
20
21 373 24. Messaritakis I, Stogiannitsi M, Koulouridi A, et al. Evaluation of the detection of
22
23 374 Toll-like receptors (TLRs) in cancer development and progression in patients
24
25 375 with colorectal cancer. *PLoS One*. 2018;13(6):1-14.
26
27 376 doi:10.1371/journal.pone.0197327
28
29 377 25. Zhao S, Zhang Y, Zhang Q, Wang F, Zhang D. Toll-Like Receptors and
30
31 378 Prostate Cancer. *Front Immunol*. 2014;5(JUL):1-6.
32
33 379 doi:10.3389/fimmu.2014.00352
34
35 380 26. Rahman HAA, Khorshied MM, Khorshid OMR, Mahgoub SM. Toll-like receptor
36
37 381 2 and 9 genetic polymorphisms and the susceptibility to B cell Non-Hodgkin
38
39 382 Lymphoma in Egypt. *Ann Hematol*. 2014;93(11):1859-1865.
40
41 383 doi:10.1007/s00277-014-2131-z
42
43 384 27. Costa AG, Ramasawmy R, Ibiapina HNS, et al. Association of TLR variants
44
45 385 with susceptibility to Plasmodium vivax malaria and parasitemia in the Amazon
46
47 386 region of Brazil. *PLoS One*. 2017;12(8):1-14.
48
49 387 doi:10.1371/journal.pone.0183840
50
51 388 28. Azevedo-Silva F, De Camargo B, Pombo-de-Oliveira MS. Implications of
52
53 389 infectious diseases and the adrenal hypothesis for the etiology of childhood
54
55 390 acute lymphoblastic leukemia. *Brazilian J Med Biol Res*. 2010;43(3):226-229.
56
57 391 doi:10.1590/S0100-879X2010007500011
58
59 392 29. Chan LC, Lam TH, Li CK, et al. Is the timing of exposure to infection a major
60
393 determinant of acute lymphoblastic leukaemia in Hong Kong? *Paediatr Perinat*

[Digite aqui]

<http://mc.manuscriptcentral.com/hon>

- 1
2
3 394 *Epidemiol.* 2002;16(2):154-165. doi:10.1046/j.1365-3016.2002.00406.x
4
5 395 30. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.*
6 396 2008;371(9617):1030-1043. doi:10.1016/S0140-6736(08)60457-2
7
8 397 31. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.*
9 398 2005;17(1):1-14. doi:10.1093/intimm/dxh186
10
11 399 32. Wolska A, Lech-Marañda E, Robak T. Toll-like receptors and their role in
12 400 carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cell Mol Biol Lett.* 2009;14(2).
13 401 doi:10.2478/s11658-008-0048-z
14
15 402 33. Trejo-De La O A, Hernández-Sancén P, Maldonado-Bernal C. Relevance of
16 403 single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and
17 404 inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun.* 2014;15(4):199-209.
18 405 doi:10.1038/gene.2014.10
19
20 406 34. Redaelli A, Corporation P, Redaelli A, et al. The clinical and epidemiological
21 407 burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl).*
22 408 2004;13(10):279-287.
23
24 409 35. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR. Toll-
25 410 like receptor (TLR)-9 promotor polymorphisms and atherosclerosis. *Clin Chim*
26 411 *Acta.* 2006;364(1-2):303-307. doi:10.1016/j.cca.2005.07.017
27
28 412 36. Roszak A, Lianeri M, Sowińska A, Jagodziński PP. Involvement of toll-like
29 413 receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. *Mol Biol Rep.*
30 414 2012;39(8):8425-8430. doi:10.1007/s11033-012-1695-8
31
32 415 37. Ng MTH, Van't Hof R, Crockett JC, et al. Increase in NF- κ B binding affinity of
33 416 the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is
34 417 associated with *Helicobacter pylori*-induced gastric disease. *Infect Immun.*
35 418 2010;78(3):1345-1352. doi:10.1128/IAI.01226-09
36
37 419 38. Zhang L, Qin H, Guan X, Zhang K, Liu Z. The TLR9 gene polymorphisms and
38 420 the risk of cancer: evidence from a meta-analysis. *PLoS One.*
39 421 2013;8(8):e71785. doi:10.1371/journal.pone.0071785
40
41 422 39. Nieters A, Beckmann L, Deeg E, Becker N. Gene polymorphisms in Toll-like
42 423 receptors , interleukin-10 , and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma

[Digite aqui]

- 1
2
3 424 risk. *Genes Immun.* 2006;7:615-624. doi:10.1038/sj.gene.6364337
- 4
5
6 425 40. Pandey N o., Chauhan A, Pandey N, et al. Association of TLR4 and TLR9
7 426 gene polymorphisms and haplotypes with cervicitis susceptibility. *PLoS One.*
8 427 2019;14(7):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0220330
- 9
10
11 428 41. Carvalho A, Cunha C, Almeida A, et al. The rs5743836 polymorphism in TLR9
12 429 confers a population- based increased risk of non-Hodgkin lymphoma. *Genes*
13 430 *Immun.* 2012;13(2):1-9. doi:10.1038/gene.2011.59
- 14
15
16
17 431 42. Ashton KA, Proietto A, Otton G, et al. Toll-Like Receptor (TLR) and
18 432 Nucleosome-binding Oligomerization Domain (NOD) gene polymorphisms
19 433 and endometrial cancer risk. *BMC Cancer.* 2010;10:1-7. doi:10.1186/1471-
20 434 2407-10-382
- 21
22
23
24 435 43. Mollaki V, Georgiadis T, Tassidou A, et al. Polymorphisms and haplotypes in
25 436 TLR9 and MYD88 are associated with the development of Hodgkin's
26 437 lymphoma: A candidate-gene association study. *J Hum Genet.*
27 438 2009;54(11):655-659. doi:10.1038/jhg.2009.90
- 28
29
30
31 439 44. Rybka J, Gębura K, Wróbel T, et al. Variations in genes involved in regulation
32 440 of the nuclear factor - κ B pathway and the risk of acute myeloid leukaemia. *Int*
33 441 *J Immunogenet.* 2016;43(2):101-106. doi:10.1111/iji.12255
- 34
35
36
37 442 45. Pandey S, Mittal B, Srivastava M, et al. Evaluation of Toll-like receptors 3
38 443 (c.1377C/T) and 9 (G2848A) gene polymorphisms in cervical cancer
39 444 susceptibility. *Mol Biol Rep.* 2011;38(7):4715-4721. doi:10.1007/s11033-010-
40 445 0607-z
- 41
42
43
44
45 446 46. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, et al. Single-nucleotide polymorphisms in
46 447 the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies , pairwise linkage
47 448 disequilibrium , and haplotypes in three U . S . ethnic groups and exploratory
48 449 case – control disease association studies □. *Genomics.* 2003;81:85-91.
49 450 doi:10.1016/S0888-7543(02)00022-8
- 50
51
52
53
54 451 47. Batar B, Mutlu T, Özdemir N, Celkan T, Güven M. TLR4 ve NOD2
55 452 Polimorfizmlerinin Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi ile İlişkisiq/
56 453 Association of the TLR4 and NOD2 Polymorphisms with Childhood. *Bezmi'alem*
57 454 *Sci.* 2018;6:119-125. doi:10.14235/bs.2018.1678

[Digite aqui]

- 1
2
3 455 48. Sheng WY, Yong Z, Yun Z, Hong H, Hai LL. Systematic review / Meta-analysis
4
5 456 Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer :
6
7 457 a meta-analysis and review. *Arch Med Sci* 2015;. 2015;11(4):699–707.
8
9 458 doi:10.5114/aoms.2015.53288
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

[Digite aqui]

<http://mc.manuscriptcentral.com/hon>

460 **Table 1.** Epidemiological and clinical characteristics of the population in the
 461 study.

Variables	Control Group (n = 187)	ALL Cases (n = 152)
Age, years (median [IQR])	30 [23-39]	12 [4-18]
Gender		
Male, n (%)	133 (71%)	95 (62%)
Female, n (%)	54 (29%)	57 (38%)
Comorbidities	-	-
Yes, n (%)	-	69 (45%)
Infectious diseases, n (%)	-	66 (96%)
Others, n (%)	-	3 (4%)
No, n (%)	-	83 (55%)
Relapse	-	-
Yes, n (%)	-	114 (75%)
No, n (%)	-	38 (25%)
Death	-	-
Yes, n (%)	-	67 (44%)
No, n (%)	-	85 (56%)
Hemoglobin, g/dL (median [IQR])	-	8.6 [6.5-10.1]
Hematocrit, % (median [IQR])	-	25.1 [20.2-30.7]
Leukocyte, unit x 10⁹/mm³ (median [IQR])	-	9.435 [3.388-57.850]
Platelets, unit x 10⁹/mm³ (median [IQR])	-	58.000 [24.000-152.800]

462

[Digite aqui]

<http://mc.manuscriptcentral.com/hon>

463 **Table 2.** Association between the TLRs and CD14 polymorphisms and acute
 464 lymphoblastic leukemia patients.

Polymorphism, Genotype / Allele	Control Group (n = 187)	ALL Cases (n = 152)	OR (IC 95%)	(p) value*	
TLR1 I602S (rs5743618)					
T/T	100 (54%)	88 (58%)	1.2 (0.8-1.8)	0.45	T/T vs T/G + G/G
T/G	72 (39%)	53 (35%)	1.2 (0.8-1.9)	0.49	T/T vs T/G
G/G	15 (7%)	11 (7%)	1.2 (0.5-2.8)	0.68	T/T vs G/G
T	272 (73%)	229 (75%)	1.1	0.49	
G	102 (27%)	75 (25%)	(0.8-1.6)		
TLR4 A299G (rs4986790)					
A/A	177 (95%)	144 (95%)	1.0 (0.4-2.6)	0.97	A/A vs A/G + G/G
A/G	10 (5%)	7 (4%)	1.2 (0.4-3.1)	0.77	A/A vs A/G
G/G	-	1 (1%)	-	-	-
A	364 (97%)	295 (97%)	1.1 (0.4-2.8)	0.82	
G	10 (3%)	9 (3%)			
TLR4 T399I (rs4986791)					
C/C	180 (97%)	144 (95%)	1.4 (0.5-4.0)	0.60	C/C vs C/T + T/T
C/T	7 (3%)	7 (4%)	1.2 (0.4-3.6)	0.79	C/C vs C/T
T/T	-	1 (1%)	-	-	-
C	367 (98%)	295 (97%)	1.6	0.45	
T	7 (2%)	9 (3%)	(0.6-4.3)		
TLR5 R392S (rs5744105)					
R/R	177 (95%)	143 (94%)	1.1 (0.4-2.8)	0.82	R/R vs R/S
R/S	10 (5%)	9 (6%)	-	-	-
S/S	-	-	-	-	-
R	364 (97%)	295 (97%)	1.1	0.82	
S	10 (3%)	9 (3%)	(0.4-2.8)		
TLR6 S249P (rs5743810)					
T/T	125 (67%)	107 (70%)	1.2 (0.7-1.9)	0.56	T/T vs C/T + C/C
C/T	57 (30%)	37 (24%)	1.3 (0.8-2.1)	0.27	T/T vs C/T
C/C	5 (3%)	8 (6%)	0.5 (0.2-1.7)	0.39	T/T vs C/C
T	307 (82%)	251 (83%)	1.0	0.92	
C	67 (18%)	53 (17%)	(0.7-1.5)		
TLR9 -1237 C/T (rs5743836)					
C/C	121 (65%)	112 (74%)	1.5 (1.0-2.4)	0.08	C/C vs C/T + T/T
T/C	66 (35%)	39 (25%)	1.6 (1.0-2.5)	0.08	C/C vs C/T
T/T	-	1 (1%)	-	-	-
C	308 (82%)	263 (87%)	1.4	0.17	
T	66 (18%)	41 (13%)	(0.9-2.1)		
TLR9 -1486 T/C (rs187084)					
T/T	61 (33%)	52 (34%)	2.0 (1.1-3.6)	0.01	T/T+C/T vs C/C
C/T	102 (55%)	65 (43%)	1.7 (0.9-3.2)	0.11	T/T vs C/C
C/C	24 (12%)	35 (23%)	2.3 (1.2-4.2)	0.00	C/T vs C/C
T	224 (60%)	169 (56%)	1.2	0.27	
C	150 (40%)	135 (44%)	(0.9-1.6)		
CD14 -159 (rs2569191)					
C/C	55 (29%)	40 (26%)	1.2 (0.7-1.9)	0.55	C/C vs C/T + T/T

[Digite aqui]

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

465

C/T	93 (50%)	85 (56%)	1.2 (0.8-2.1)	0.44	C/C vs C/T
T/T	39 (21%)	27 (18%)	1.0 (0.5-1.8)	1.00	C/T vs T/T
C	203 (54%)	165 (54%)	1.0	1.00	
T	171 (46%)	139 (46%)	(0.7-1.4)		

For Review Only

[Digite aqui]

<http://mc.manuscriptcentral.com/hon>

Table 3. Association between the TLRs and CD14 genotypes and comorbidities (infectious diseases), relapse and death in patients with acute lymphoblastic leukemia.

Polymorphism	LLA subgroups						
	Comorbidities		Relapse		Death		
	OR (CI 95%)	(p) value	OR (CI 95%)	(p) value	OR (CI 95%)	(p) value	
TLR1 1602S (rs5743618)	1.6 (0.8-3.1)	0.19	1.0 (0.5-2.1)	1.00	1.4 (0.7-2.7)	0.32	T/T vs. T/G + G/G
	1.8 (0.9-3.6)	0.12	1.0 (0.5-2.3)	1.00	1.6 (0.8-3.3)	0.22	T/T vs. T/G
	0.9 (0.2-3.4)	1.00	1.1 (0.3-4.6)	1.00	1.3 (0.4-4.6)	0.76	T/T vs. G/G
TLR4 A299G (rs4986790)	5.8 (0.7-48.1)	0.14	1.9 (0.4-8.2)	0.41	1.3 (0.3-5.3)	0.73	A/A vs. A/G + G/G
	4.9 (0.6-42.1)	0.14	2.3 (0.5-10.9)	0.37	1.7 (0.4-7.9)	0.70	A/A vs. A/G
	-	-	-	-	-	-	-
TLR4 T399I (rs4986791)	1.7 (0.4-8.5)	0.50	3.2 (0.8-13.6)	0.11	2.5 (0.5-12.7)	0.47	C/C vs. C/T + T/T
	2.2 (0.5-9.7)	0.30	4.3 (0.9-20.2)	0.07	2.1 (0.4-11.0)	0.46	C/C vs. C/T
	-	-	-	-	-	-	-
TLR5 R392S (rs5744105)	3.3 (0.7-16.0)	0.19	2.8 (0.3-23.1)	0.45	1.0 (0.3-3.9)	1.00	R/R vs. R/S
	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-
TLR6 S249P (rs5743810)	1.2 (0.8-2.4)	0.72	1.1 (0.5-2.5)	0.84	1.4 (0.7-2.9)	0.37	T/T vs. C/T + C/C
	1.1 (0.5-2.6)	0.84	1.5 (0.7-3.4)	0.39	1.2 (0.5-2.4)	0.85	T/T vs. C/T
	2.5 (0.8-7.9)	0.15	-	-	6.1 (0.7-51.7)	0.07	T/T vs. C/C
TLR9 -1237 C/T (rs5743836)	1.1 (0.5-2.3)	0.85	1.2 (0.5-2.7)	0.68	1.4 (0.7-3.0)	0.36	C/C vs. C/T + T/T
	1.0 (0.5-2.2)	1.00	1.2 (0.5-2.8)	0.67	1.5 (0.7-3.3)	0.27	C/C vs. T/C
	-	-	-	-	-	-	-
TLR9 -1486 T/C (rs167084)	2.1 (1.1-4.3)	0.04	1.0 (0.4-2.5)	1.00	1.4 (0.7-2.8)	0.31	T/T + C/T vs. C/C
	2.2 (1.0-4.7)	0.04	1.0 (0.4-2.4)	1.00	1.2 (0.6-2.6)	0.58	T/T vs. C/T
	2.1 (0.9-4.8)	0.10	1.0 (0.4-2.8)	1.00	1.9 (0.8-4.6)	0.19	T/T vs. C/C
CD14 -159 (rs2569191)	1.5 (0.7-3.2)	0.27	1.3 (0.6-2.8)	0.67	1.1 (0.5-2.2)	1.00	C/C vs. C/T + T/T
	1.6 (0.7-3.4)	0.25	1.6 (0.7-3.7)	0.37	1.1 (0.5-2.4)	0.85	C/C vs. C/T
	1.4 (0.5-3.7)	0.62	1.0 (0.3-3.0)	1.00	1.1 (0.4-3.0)	0.81	C/C vs. T/T

469

470

[Digite aqui]

471 **Table 4.** Association between the TLRs and CD14 alleles and comorbidities
 472 (infectious diseases), relapse and death in patients with acute lymphoblastic
 473 leukemia.

Polymorphism	CLINICAL PARAMETERS												
	COMORBIDITIES				RELAPSE				DEATH				
	NO (N=83)	YES (N=66)	OR (CI 95%)	(p) valu e	NO (N=38)	YES (N=114)	OR (CI 95%)	(p) valu e	NO (N=85)	YES (N=67)	OR (CI 95%)	(p) valu e	
TLR1 -1602S (rs5743618)	T 127 (77%)	G 95 (72%)	1.2 (0.8- 2.1)	0.42	57 (75%) 19 (25%)	172 (75%) 56 (25%)	1.0 (0.6- 1.8)	0.94	126 (74%) 44 (26%)	103 (77%) 31 (23%)	1.2 (0.7-2.0)	0.60	
TLR4 A299G (rs4986790)	A 158 (95%)	G 131 (99%)	6.6 (0.8- 53.8)	0.05	73 (98%) 3 (4%)	222 (97%) 6 (3%)	1.5 (0.4- 6.2)	0.70	165 (97%) 5 (3%)	130 (97%) 4 (3%)	1.0 (0.3-3.9)	1.00	
	T399I (rs4986791)	C 166 (97%)	T 127 (96%)	1.3 (0.4- 4.6)	0.75	72 (95%) 4 (5%)	223 (98%) 5 (2%)	2.5 (0.6- 9.5)	0.23	163 (96%) 7 (4%)	132 (99%) 2 (1%)	2.8 (0.8- 13.8)	0.31
	TLR5 R392S (rs5744105)	R 158 (95%)	S 130 (96%)	3.2 (0.7- 15.8)	0.19	75 (99%) 1 (1%)	220 (98%) 8 (4%)	2.7 (0.3- 22.2)	0.48	165 (97%) 5 (3%)	130 (97%) 4 (3%)	1.0 (0.3-3.9)	1.00
TLR6 S249P (rs5743610)	T 138 (83%)	C 102 (77%)	1.5 (0.8- 2.8)	0.24	12 (16%) 64 (84%)	41 (18%) 187 (82%)	1.2 (0.6- 2.4)	0.73	135 (78%) 35 (21%)	116 (87%) 18 (13%)	1.7 (0.9-3.1)	0.13	
	TLR9 -1237 C/T (rs5743836)	C 145 (87%)	T 114 (86%)	1.1 (0.6- 2.1)	0.66	65 (88%) 11 (14%)	198 (87%) 30 (13%)	1.1 (0.5- 2.4)	0.65	145 (85%) 25 (15%)	118 (88%) 16 (12%)	1.3 (0.6-2.5)	0.50
-1486 T/C (rs187084)		T 77 (48%)	C 76 (58%)	1.6 (1.0- 2.5)	0.06	47 (55%) 34 (45%)	177 (56%) 101 (44%)	1.0 (0.6- 1.7)	1.00	88 (52%) 82 (48%)	81 (60%) 53 (40%)	1.4 (0.9-2.3)	0.13
CD14 -159 (rs2569191)		C 86 (52%)	T 74 (56%)	1.2 (0.7- 1.9)	0.48	42 (55%) 34 (45%)	123 (54%) 105 (48%)	1.1 (0.6- 1.8)	0.89	95 (55%) 77 (45%)	72 (54%) 62 (48%)	1.0 (0.7-1.6)	0.91

474

475

[Digite aqui]

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

476 **Figure Legend**

477 **Figure 1:** Distribution of the frequencies of the TLR and CD14 genotypes among
478 the clinical variables in patients with acute lymphoblastic leukemia.

479

For Review Only

[Digite aqui]

S1 Table. Description of primer sequences, cycling, restriction enzymes and fragments of the study polymorphisms.

SNPs	Primer Sequence (5'-3')	PCR protocol	Restriction Enzyme	Fragments
rs5743618 (TLR1)	Forward:	1 cycle of 95°C for 5'	AfuI	T: 280 G: 151+129
	GGAAAGTTATAGAGGAACCCT	40 cycles of 95°C for 30",		
	Reverse:	55°C for 30" and 72°C for 30"		
rs4986790 (TLR4)	CTTCACCCAGAAAGAATCGTGCC	1 cycle of 72°C for 7'	NcoI	A: 259 G: 239+20
	Forward:	1 cycle of 95°C for 5'		
	GATTAGCATACTTAGACTACCTCCATG	40 cycles of 95°C for 30",		
rs4986791 (TLR4)	Reverse:	56°C for 30" and 72°C for 30"	Hinf-I	C: 147 T: 96+51
	GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC	1 cycle of 72°C for 7'		
	Forward:	1 cycle of 95°C for 5'		
rs5744105 (TLR5)	GGTTGCTGTTCTCAAAGTTTTGGGAGAA	40 cycles of 95°C for 15",	DofI	C: 277pb T: 186+91
	Reverse:	80°C for 15" and 72°C for 30"		
	ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT	1 cycle of 72°C for 7'		
rs5743810 (TLR6)	Forward:	1 cycle of 95°C for 5'	AvaII	C: 210 T: 180+50
	GGTAGCCTACATTGATTTGC	40 cycles of 95°C for 30",		
	Reverse:	62°C for 30" and 72°C for 30",		
rs187084 (TLR9)	GAGAACTGTGGAGATGAGGTACCCG	1 cycle of 72°C for 7'	BstNI	C: 108+27 T: 60+48+27
	Forward:	1 cycle of 95°C for 5'		
	CTGCTTGCAGTTGACTGTGT	40 cycles of 95°C for 30",		
rs5743836 (TLR9)	Reverse:	63°C for 30" and 72°C for 30"	AflII	C: 145 T: 111+34
	ATGGGAGCAGAGACATAATGGA	1 cycle of 72°C for 7'		
	Forward:	1 cycle of 95°C for 5'		
rs2669191 (CD14)	TATCGTCTTATCCCCTGCTGGAATGT	40 cycles of 95°C for 30",	Ava II	C: 497 T: 353+144
	Reverse:	59°C for 30" and 72°C for 30"		
	TGCCAGAGCTGACTGCTGG	72°C for 7'		
rs2669191 (CD14)	Forward:	1 cycle of 94°C for 5'	Ava II	C: 497 T: 353+144
	GTGCCAACAGATGAGGTTAC	35 cycles of 94°C for 30",		
	Reverse:	64°C for 30" and 72°C for 1'		
	GCCTCTGACAGTTTATGTAATC	1 cycle 72°C for 10'		

*rs: Referent String; *F: Forward; *R: Reverse.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

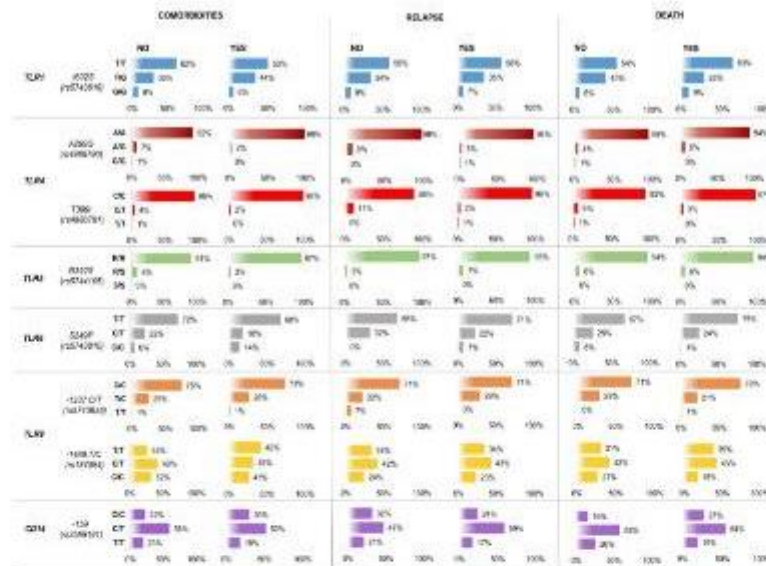


Figure 1: Distribution of the frequencies of the TLR and CD14 genotypes among the clinical variables in patients with acute lymphoblastic leukemia.

379x254mm (267 x 267 DPI)

8.2 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS COMO COLABORADOR.

8.2.1 Artigo 1

Cytokine 130 (2020) 155052



Combination of genetic polymorphisms in TLR influence cytokine profile in HCV patients treated with DAAs in the State of Amazonas

Andréa Monteiro Tarragô^{a,d,e,*}, Pedro Vieira da Silva Neto^{a,d}, Rajendranath Ramasawmy^{c,d},
Grenda Leite Pereira^{a,d}, Diana Mota Toro^{a,d}, Lilyane de Amorim Xabregas^{a,b,c},
Allyson Guimaraes Costa^{a,b,c,d,e}, Marilú Barbieri Victória^{b,c}, Flamir da Silva Victória^{b,c},
Adriana Malheiro^{a,d,e,-}

^a Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brazil

^c Fundação de Medicina Tropical Dr. Hélio Vieira Gusmano (FMT-HVG), Manaus, Amazonas, Brazil

^d Laboratório de Genética, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Amazonas, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Hepatitis C
Polymorphisms
Toll-like receptor
Hepatocellular carcinoma
DAAs

ABSTRACT

Hepatitis C is a public health problem and affects approximately 3% of the world's population. HCV infections have a wide spectrum of clinical manifestations, and several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes of the toll-like receptors are cited to influence the clinical outcomes. A cross-sectional study was conducted in the Amazonas State, Brazil in which SNPs in TLR4 and TLR9 genes were genotyped by PCR-RFLP in 151 HCV chronic liver disease patients and 206 healthy donors. The circulating cytokines IL-6, TNF, IL-10, IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-17A were measured by cytometric bead array (CBA) which revealed that the combined genotypes of TLR9 -1237T/T and -1486C/T seem to influence the cytokine profile under lipopolysaccharide (LPS) stimulation of the Th17 profile, especially among patients with advanced chronic liver disease when treated with DAAs.

1. Introduction

Chronic hepatitis C (CHC) is a major global health problem worldwide and in 2018 more than 71 million people suffered chronic hepatitis C infections [1]. The liver damage which occurs during chronic infection is commonly attributed to mechanisms mediated by the host immune response associated with a marked release of inflammatory mediators, which favors changes in the patterns of adhesion molecule expression and recruitment of cells to the hepatic inflammatory tissue microenvironment [2]. Immunological events linked to chronic hepatitis C can lead to dysregulated architecture and function of the liver and increases intestinal permeability through the release of cytokines that alter the portal circulation and intestinal epithelial junctions, which allows the LPS derived from the intestinal microbiota to enter the portal circulation [3–5].

Previous studies showed that TLR-4 and TLR-9 pathways can activate hepatic stellated cells (HSCs) in patients with advanced liver disease through an increase of LPS levels in systemic/portal vein blood and

DNA from dying hepatocytes, respectively [6–9]. Several studies have already investigated the association between TLR single nucleotide polymorphisms (SNPs) and different outcomes in HCV infection [10], and direct-acting antivirals (DAAs) are known to inhibit the tumor suppressor p53 in patients with successful clearance of HCV, though the inflammatory process continues to persist and places patients at risks of developing HCC [11].

Clearance of HCV in patients treated with interferon-free therapy and the genetic background of the host may contribute to the progression of the disease via the persistence of the inflammatory process after virologic immune response [12–17].

In the present study, we analyzed whether the polymorphisms in TLR4 rs4986790 (A299G A/G), TLR4 rs4986791 (T399I C/T), TLR9 rs5743836 (-1237C/T) and TLR9 rs187084 (-1486C/T) are associated with susceptibility to HCV infection and cytokine profile changes after treatment with DAAs in the sample group of the population from the Amazonas state.

* Corresponding authors at: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Constantino Nery Avenue, 4397 - Chapada, 69050-002 Manaus, Amazonas, Brazil.

E-mail addresses: andrea.monteiro@hoemail.com (A.M. Tarragô), malheiroadriana@yzhoo.com.br (A. Malheiro).

<https://doi.org/10.1016/j.cyt.2020.155052>

Received 18 June 2019; Received in revised form 26 November 2019; Accepted 24 February 2020

1043-4666/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

8.2.2 Artigo 2



RESEARCH ARTICLE

Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths

Alexander Leonardo Silva-Junior^{1,2*}, Fabiola Silva Alves^{1,2*}, Marlon Wendell Athaydes Kerr^{1,2}, Lilyane Amorim Xabregas^{1,2}, Fábio Magalhães Gama^{1,3}, Maria Gabriela Almeida Rodrigues^{4,5}, Alexandre Santos Torres¹, Andréa Monteiro Tarragó^{1,2,3}, Vanderson Souza Sampaio^{4,5,6}, Maria Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho^{1,2}, Nelson Abrahim Fraiji^{1,2}, Adriana Malheiro^{1,2,3}, Allyson Guimarães Costa^{1,2,3,4,5,6*}

1 Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil, **3** Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil, **4** Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil, **5** Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas, Brazil, **6** Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Manaus, Brazil

* These authors contributed equally to this work.
* allyson.gui.costa@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Silva-Junior AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, et al. (2019) Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. *PLoS ONE* 14(8): e0221518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221518>

Editor: Elias Jacobour, M D Anderson Cancer Center, UNITED STATES

Received: March 7, 2019

Accepted: August 8, 2019

Published: August 22, 2019

Copyright: © 2019 Silva-Junior et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Due to ethical restrictions regarding patient privacy, data are available upon request. Data are available upon request from the Ethics Committee of Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM - cephemam@gmail.com), for researchers who meet the criteria for access to confidential data. Additional requests for the data may be sent to the corresponding author or coauthors Allyson G. Costa (allyson.gui.costa@gmail.com), Adriana Malheiro

Abstract

Introduction

Leukemia is the most common cancer in children and has the highest rates of incidence in industrialized countries, followed by developing countries. This epidemiologic profile can mainly be attributed to the availability of diagnostic resources. In Brazil, leukemia diagnosis is a challenge due to financial viability, lack of hemovigilance services in isolated regions and the vast size of the territory. Its incidence in the state of Amazonas has been increasing since 2010. Therefore, this study aims to describe the epidemiological pattern and spatial distribution of patients with acute lymphoid leukemia and acute myeloid leukemia in Amazonas and identify the predictors of comorbidity and death.

Materials and methods

A retrospective cross-sectional study was carried out based on patients' data which was obtained from the database of a referral center for the period of 2005 to 2015. Variables included age, gender, ethnicity, civil status, schooling, income, location of residence, sub-type of leukemia, comorbidities, and date of death. The spatial distribution was performed using QGIS v.2.18. Stata software was used for univariable and multivariable logistic regression to evaluate the association between both comorbidities and death for all characteristic groups of ALL and AML.

8.2.3 Artigo 3

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

776

Current Molecular Medicine 2019, 19, 776-783

RESEARCH ARTICLE

Frequency of Interleukins *IL1B/IL18* and Inflammasome *NLRP1/NLRP3* Polymorphisms in Sickle Cell Anemia Patients and their Association with Severity Score

Emerson de Almeida¹, Sonia Rejane Frantz², Purim Cesar^{1,2}, Andrea Monteiro Tarragô^{1,2}, Lilyane de Amorim Xabregas^{1,2}, Nadja Pinto Garcia^{1,2}, Allyson Guimarães Costa^{1,2,4,5}, Erich Vinicius de Paula^{1,3} and Adriana Malheiro^{1,2,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil; ²Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil; ³Escola de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brazil; ⁴Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil; ⁵Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;

Abstract: Background: Interleukins *IL1B/IL18* and inflammasome *NLRP1/NLRP3* polymorphisms can change the course of multiple human diseases, both inflammatory as infectious. SNPs these proteins were associated with the constructive activation of the inflammasome and excessive production of *IL-1β* induce a serious auto-inflammatory disease, as sickle cell anemia (SCA). The present study aims to association of interleukins *IL1B/IL18* and inflammasome *NLRP1/NLRP3* polymorphisms in SCA patients in Amazon region and their association with severity score.

Methods: The study was developed at Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) with 21 patients diagnosed SCA (HbSS) and 50 Healthy Donor's. Genetic polymorphisms (SNPs) in interleukins *IL1B/IL18* and inflammasome *NLRP1/NLRP3* were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and real time PCR. Simple and multiple logistic regression were performed to investigate association between the polymorphisms and the SCA and severe score.

Results: The genotypes C/C (*IL18* -137G/C) and C/A (*NLRP3*, rs35829419) appear to be risk factors for SCA disease (*IL18*: G/G vs C/C OR=103.500 [95% CI: 8.32-1287.79, p<0.00001]; *IL18*: G/G vs G/C OR=7.360 [95% CI: 0.85-63.48, p=0.040]; *IL18*: G/G vs CC+CG OR=14.481 [95% CI: 1.79-117.32, p=0.002; *NLRP3*: C/C vs C/A: OR=10.967 [95% CI: 2.41-49.89, p=0.0004]). In addition, only allelic C (*IL18* -137G/C) and A (*NLRP3*) appear to be risk factors for SCA disease (*IL18*: G vs C OR=8.366 [95% CI: 2.73-14.86, p<0.00001]; *NLRP3*: C vs A OR=8.383 [95% CI: 2.03-34.62, p=0.005]. No associations were observed between genotypes and alleles with the severity score.

Conclusion: Evidence of association between the *IL18* (rs16944) and *NLRP3* (rs35829419) polymorphisms with sickle cell anemia were described. Our results suggest that individuals with genotypes evaluated are associated SCA disease even though it does not influence the severe score.

ARTICLE HISTORY

Received: October 13, 2018
Revised: July 31, 2019
Accepted: August 8, 2019

DOI
10.2177/1920655240193359190820143749

Keywords: SCA, Polymorphism, Proinflammatory cytokines, Inflammasome.

1. INTRODUCTION

Sickle cell anemia (SCA) is a hereditary disease caused by a point mutation on chromosome 11 in the chain of beta-globin, which results in the replacement of glutamic acid for valine in position 6 of the gene,

resulting in hemoglobin S (Hb S). In hypoxic conditions, erythrocytes assume a sickle shape generating clinical manifestations varying degrees [1].

Many studies were done in order to establish a classification in the standard of the severity of SCA having databases for this calculation, and assessment of clinical and laboratory parameters that influence the risk related mortality in patients with SCA [2-5].

*Address correspondence to this author at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, 69050-001, Manaus, AM, Brazil; Phone: +55 92 3655-0231; Mobile: +55 92 99114-9478; E-mail: malheiroadriana@yahoo.com.br

8.3 RESUMOS EM ANAIS DE EVENTOS CIENTÍFICOS

1. XABREGAS, L. A.; ALVES, F. S.; RODRIGUES, M. G. A.; S NETO, F. M.; TARRAGO, A. M.; SANTIAGO, M. R. R.; PIMENTEL, J. P. D.; CARVALHO, M. P. S. S.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DOS RECEPTORES TLR4 E CD14 COM O PROGNOSTICO CLÍNICO DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA). In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2019, Rio de Janeiro.
2. ALVES, F. S.; XABREGAS, L. A.; SOUZA, G. L. ; KERR, M. W. A.; TARRAGO, A. M.; PIMENTEL, J. P. D.; SANTIAGO, M. R. R.; CARVALHO, M. P. S. S. ; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS IL-1B -511 C/T E IL-18 -137 G/C COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA EM PACIENTES DA AMAZÔNIA BRASILEIRA. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2019, Rio de Janeiro.
3. ALVES, F. S.; XABREGAS, L. A.; KERR, M. W. A.; TARRAGO, A. M.; PIMENTEL, J. P. D.; CARVALHO, M. P. S. S.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. FREQUÊNCIA DOS REARRANJOS GÊNICOS DE IMUNOGLOBULINAS E RECEPTORES DE CÉLULAS T EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA REGIÃO AMAZÔNICA. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2019, Rio de Janeiro.
4. ALVES, FS; XABREGAS, L. A.; KERR, M. W. A.; TARRAGO, A. M.; PIMENTEL, J. P. D.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. Association of IL-1 β -511 C/T and IL-18 -137 G/C polymorphisms with risk of acute lymphoid leukemia development in the Amazon region of Brazil. In: XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2019, Florianópolis. XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2019.
5. KIONG, L. A.; ALVES, F. S.; SOUZA, G. L.; XABREGAS, L. A.; KERR, M. W. A.; TARRAGO, A. M. ; PIMENTEL, J. P. D. ; CARVALHO, M. P. S. S. ; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G.; PASSOS, L. N. M. . PERFIL CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES TRANSPLANTADOS DE MEDULA ÓSSEA ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HEMOAM. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2019, Rio de Janeiro.
6. SOUZA, G. L.; ALVES, F. S.; XABREGAS, L. A.; KERR, M. W. A.; TARRAGÔ, ANDRÉA MONTEIRO; PIMENTEL, J. P. D.; CARVALHO, M. P. S. S.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. IDENTIFICAÇÃO DAS TRANSLOCAÇÕES CROMOSSÔMICAS BCR-ABL P190, MLL-AF4 E

- TEL-AML1 EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DE CÉLULAS B. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2019, Rio de Janeiro.
7. ALVES, FS; XABREGAS, L. A.; KERR, M. W. A.; TARRAGO, A. M.; PIMENTEL, J. P. D.; MALHEIRO, A; COSTA, A. G. Association of IL-1 β -511 C/T and IL-18 -137 G/C polymorphisms with risk of acute lymphoid leukemia development in the Amazon region of Brazil. In: XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2019, Florianópolis. XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2019.
 8. ALVES, F. S.; XABREGAS, L. A.; SOUZA, G. L.; TARRAGÔ, ANDRÉA MONTEIRO; CARVALHO, M. P. S. S.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO -511C/T IL1-B COM OCORRÊNCIA DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA EM PACIENTES DA AMAZÔNIA BRASILEIRA. In: 5º Congresso Pan-Amazônico de Oncologia, 2019, Manaus.
 9. GAMA, F. M.; KERR, M. W. A.; ALVES, F. S.; XABREGAS, L. A.; ALVES, E. B.; TARRAGO, A. M.; CARVALHO, M. P. S. S.; MALHEIRO, A. ; COSTA, A. G. Biomarcadores imunológicos preditores de doença residual mínima (DRM) em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA-B) tratados pelo protocolo GBTLI-2009. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, 2018, São Paulo.
 10. RODRIGUES, M. G. A.; ALVES, F. S.; XABREGAS, L. A.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. Estudo dos polimorfismos nos genes do Receptor TLR4 em pacientes com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) no Amazonas. In: I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Hematologia, 2018, Manaus/Am.
 11. GAMA, F. M.; KERR, M. W. A.; ALVES, F. S.; XABREGAS, L. A.; ALVES, E. B.; TARRAGO, A. M. ; PIMENTEL, J. P. D. ; CARVALHO, M. P. S. S.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. Chemokines profile in the medullary microenvironment of pediatric patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) from protocol GBTLI-2009 induction therapy. In: 6th International Symposium on Immunology, 2018, Manaus/Am.
 12. KERR, M. W. A.; GAMA, F. M.; ALVES, F. S.; XABREGAS, L. A.; ALVES, E. B.; TARRAGO, A. M.; CARVALHO, M. P. S. S.; COSTA, A. G.; MALHEIRO, A. IMMUNOLOGICALS BIOMARKERS PREDICTORS OF CHANGE IN RISK GROUP (CIRG) IN PATIENTS WITH B ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA TREATED BY THE GBTLI-2009 PROTOCOL. In: 6th International Symposium on Immunology, 2018, Manaus/Am.