



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto De Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Iêda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca

**Expressão dos níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM no seguimento de
crianças com Leucemia Linfoblástica Aguda**

Dissertação

Uberlândia-MG

2017

Iêda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca

Expressão dos níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM no seguimento de crianças com Leucemia Linfoblástica Aguda

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

Uberlândia-MG

2017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Iêda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca

“Expressão dos níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM no seguimento de crianças com Leucemia Linfoblástica Aguda”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 29 de novembro de 2017.


Luís Otávio de Miranda Cota – UFMG


Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso - FO/UFU


Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva - ICBIM/UFU (orientador)

À Deus, pois apesar de nada ser digno daquilo que Ele já fez por mim através de Seu filho Jesus Cristo, que tudo seja para Sua glória.

A todos que produzem ciência, não ao encontrar respostas, mas sim ao procurá-las. Que este trabalho possa ser útil para inspiração de pesquisas futuras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que por Sua graça permitiu a conclusão deste trabalho e me fortaleceu durante todo o processo.

Aos meus pais, Pedro e Elza, pelo exemplo de vida e por todo investimento nos meus estudos, mas principalmente pelo constante apoio e amor incondicional.

Ao meu marido Thiago, pelo companheirismo em todos os momentos, compreensão e carinho; e aos meus filhos, Alice e Mateus, por alegrarem a minha vida independente de qualquer circunstância.

Aos meus irmãos, Yara e Pedro, pela amizade e acolhimento nos momentos de adversidade.

Ao meu orientador, Dr Marcelo, por acreditar neste projeto, e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo do seu andamento.

A todos os colegas do Laboratório de Biomarcadores Tumoriais e Osteoimunologia, pela persistente disposição em colaborar e, especialmente ao Felipe, Pedro, Isadora e Daniele, que participaram ativamente deste projeto e foram essenciais para sua conclusão.

Às minhas colegas de trabalho, Anna Beatriz e Larissa, pelo suporte e apoio.

À Universidade Federal de Uberlândia por autorizar o desenvolvimento deste projeto; e ao Grupo Luta pela Vida e Instituto Ronald McDonald pelo investimento financeiro para aquisição do material necessário.

Aos pacientes e demais crianças envolvidas neste estudo, bem como seus responsáveis, por permitirem, através de sua fundamental participação, o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos, pelas orações, torcida e apoio ao longo dessa caminhada. Cada um é responsável de alguma forma por eu ter chegado até aqui.

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito,
nos aproxima” (Louis Pasteur)*

RESUMO

As moléculas de adesão celular podem ser biomarcadores úteis em alguns tipos de tumores malignos, fornecendo informações valiosas para seu diagnóstico e prognóstico. A expressão aberrante e os níveis solúveis elevados de algumas moléculas de adesão, como CD44, E-caderina e EpCAM, estão associados a vários tumores sólidos e neoplasias hematológicas, incluindo Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), relacionados com proliferação das células malignas, invasão tumoral e metástases. E-caderina e EpCAM são moléculas importantes de adesão célula-a-célula, enquanto CD44 é um fator importante para a adesão da célula à matriz extracelular. O objetivo do presente estudo foi avaliar a concentração sérica das formas solúveis dessas moléculas de adesão em crianças com diagnóstico de LLA, em fase de remissão da doença, e estabelecer uma possível correlação dessas moléculas nesses pacientes. Foi realizada a dosagem de sCD44, sE-caderina e sEpCAM por kits de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), comercialmente disponíveis, de 20 crianças de 0 a 13 anos, em remissão de LLA, tratadas no Hospital do Câncer da Universidade Federal de Uberlândia, conforme protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Infância, e 16 controles saudáveis, na mesma faixa etária. Não houve diferença estatística entre os níveis séricos circulantes de sCD44 e sE-caderina em pacientes com LLA em remissão e controles ($p=0,807$ e $p=0,226$, respectivamente), enquanto os níveis séricos circulantes de sEpCAM foram significativamente menores nos pacientes, em comparação com o grupo controle ($p=0,01$). Além disso, sCD44 e sE-caderina mostraram forte correlação linear positiva. Conclui-se que as crianças em remissão de LLA não apresentam diferença dos níveis séricos de sCD44 e sE-caderina, com exceção do sEpCAM, comparado às crianças saudáveis. A concentração de sE-caderina parece associada com a concentração de sCD44 nas crianças com LLA. Como perspectiva futura, propõe-se analisar as expressões de CD44, E-caderina e EpCAM, em suas formas membranares, relacionadas com as populações de blastos (estaminais, precursoras e progenitoras), e correlacionar com os níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM, respectivamente, em crianças com LLA, para melhor esclarecimento da função dessas moléculas de adesão nessa neoplasia hematológica, e sua relação com atividade de doença e fatores prognósticos.

Palavras-chave: CD44 solúvel; E-caderina solúvel; EpCAM solúvel; moléculas de adesão; níveis séricos ; leucemia linfoblástica aguda

ABSTRACT

Cellular adhesion molecules could be useful biomarkers in some types of malignant tumors, providing valuable information in diagnosis and prognosis. The aberrant expression and high soluble levels of some adhesion molecules, such as CD44, E-cadherin and EpCAM, are associated with many solid tumors and hematological malignancies, including acute lymphoblastic leukemia (ALL), related to proliferation, invasion tumor and metastases. E-cadherin and EpCAM are important molecules related to cell-to-cell adhesion, while CD44 is an important factor for cell-to-extracellular matrix adhesion. The purpose of the present study was to ascertain the serum levels of soluble adhesion molecules in children with ALL remission and to establish a possible correlation of these molecules in these patients. It was performed sCD44, sE-cadherin and sEpCAM dosage by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits of 20 children from 0 to 13 years old, with ALL remission, treated at the Cancer Hospital of the Federal University of Uberlândia, according to the protocol of the Brazilian Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment Group, and 16 healthy controls in the similar age. There was no statistical difference between circulating serum levels of sCD44 and sE-cadherin in patients with ALL remission and control ($p=0.807$ and $p=0.226$, respectively), whereas serum levels of sEpCAM were significantly lower in patients compared to the control group ($p = 0.01$). In addition, sCD44 and sE-cadherin showed a strong linear correlation. It is concluded that children with ALL remission have no difference in serum levels of sCD44 and sE-cadherin, with the exception of sEpCAM, compared to healthy children. The level of sE-cadherin seems to be associated with the level of sCD44 in children with ALL. As a future perspective, it is proposed to analyze the expression of CD44, E-cadherin and EpCAM in their membrane forms, related with the populations of blasts, and correlate with the serum levels of these molecules in children with ALL. It will be better to clarify the function of these adhesion molecules in this hematological neoplasia, and its relationship with disease activity and as prognostic factors.

Key words: soluble CD44; soluble E-cadherin; soluble EpCAM; adhesion molecules; serum levels; acute lymphoblastic leukemia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Desenho esquemático do processo proteolítico de CD44 | 15 |
| Figura 2 – Desenho esquemático do mecanismo de proteólise de E-caderina | 17 |
| Figura 3 – Desenho esquemático do processo proteolítico de EpCAM | 19 |
| Figura 4 – Representação gráfica dos níveis séricos das moléculas sCD44, sE-caderina e sEpCAM em pacientes com LLA em remissão e controles | 26 |
| Figura 5 – Representação gráfica dos níveis séricos das moléculas sCD44, sE-caderina e sEpCAM em pacientes em tratamento e após tratamento para LLA | 27 |
| Figura 6 – Representação gráfica dos níveis séricos das moléculas sCD44, sE-caderina e sEpCAM em pacientes em remissão com e sem envolvimento do SNC ao diagnóstico de LLA | 28 |
| Figura 7 – Diagramas de dispersão representando a correlação entre sCD44 e sE-caderina | 30 |
| Figura 8 – Representação gráfica dos níveis séricos das moléculas sCD44, sE-caderina e sEpCAM nos pacientes avaliados antes e após remissão da LLA | 31 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Distribuição dos valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e valor de p para a correlação entre as moléculas de adesão nos pacientes e controles | 29 |
| Tabela 2 – Modelos de regressão linear multivariada de sCD44, sE-caderina e sEpCAM entre os pacientes | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| ADAMs | A Disintegrin-like And Metalloproteases |
| °C | grau Celsius |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisas |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FHL2 | Four and a Half LIM domains 2 |
| g | Força centrífuga de rotação |
| GBTLI | Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| IBM | International Business Machines |
| IGF-1R | Insulin-like Growth Factor 1 Receptor |
| KLRG1 | Killer cell Lectin-like Receptor subfamily G member 1 |
| LCR | Líquido Cefalorraquidiano |
| LEF-1 | Lymphoid Enhancer-binding Factor 1 |
| LLA | Leucemia Linfoblástica Aguda |
| MCF-7 | Michigan Cancer Foundation-7 |
| MMPs | Matrix Metalloproteínases |
| MT1-MMP | Membrane type 1-matrix metalloproteinase |
| ng | nanograma |
| PCR | Reação em Cadeia de Polimerase |
| PS-2 | Presenilina 2 |
| SABC | Strept Avidin Biotin-peroxidase Complex |

| | |
|-------|--|
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SPSS | Statistical Package for Social Sciences |
| TMB | Tetrametilbencidina |
| UFU | Universidade Federal de Uberlândia |
| UI | Unidade Internacional |
| Wnt | Wingless-type MMTV integration site family |
| WNT5B | Wnt family member 5B |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 | Leucemia Linfoblástica Aguda | 13 |
| 1.2 | Leucemia Linfoblástica Aguda e moléculas de adesão | 14 |
| 1.3 | Moléculas de adesão | 14 |
| 1.3.1 | CD44 | 14 |
| 1.3.2 | E-caderina | 15 |
| 1.3.3 | EpCAM | 18 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 21 |
| 3 | OBJETIVO GERAL | 22 |
| 3.1 | Objetivos específicos | 22 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 4.1 | Participantes | 23 |
| 4.2 | Coleta das amostras | 23 |
| 4.3 | Quantificação de sCD44, sE-caderina e sEpCAM | 24 |
| 4.4 | Análise estatística | 24 |
| 5 | RESULTADOS | 25 |
| 6 | DISCUSSÃO | 32 |
| 7 | CONCLUSÕES | 36 |
| | REFERÊNCIAS | 37 |
| | ANEXOS | 44 |
| | ANEXO A – MODELO DE INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS | 45 |
| | ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 46 |
| | ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP | 48 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é uma neoplasia hematológica, caracterizada pela proliferação e acúmulo de linfócitos imaturos (linfoblastos) na medula óssea e em outros tecidos linfoides ou sistemas orgânicos, levando à inibição da diferenciação e substituição das células sanguíneas normais por células neoplásicas (GREAVES, 2002). É o tipo mais comum de câncer na infância e adolescência, compreendendo 25% dos cânceres antes dos 15 anos de idade (HUNGER et al., 2012).

Os sintomas e sinais clínicos da doença são geralmente inespecíficos, relacionados diretamente à expansão dos clones malignos de leucócitos na medula, como dor óssea, ou ao prejuízo na produção das células sanguíneas normais, como febre, palidez, fadiga, e sangramentos (JIN; XU; AN, 2017), ou ainda associados ao comprometimento extra medular, como sintomas neurológicos por envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC). Esse envolvimento, entretanto, muitas vezes é silencioso, e pode ser comprovado pela presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano (LCR) (THOMAS; PAVAN; LE, 2008). Já o comprometimento testicular é principalmente caracterizado por aumento indolor uni ou bilateral, e confirmado por biópsia (JACOBS; HASTINGS, 2010).

O diagnóstico laboratorial é feito pelo mielograma, com demonstração de mais de 20% de linfoblastos na medula óssea (VARDIMAN et al., 2009). A imunofenotipagem avalia a expressão de antígenos e estabelece a linhagem celular, B ou T, enquanto a avaliação citogenética e análise molecular são importantes para identificar possíveis marcadores prognósticos da doença (BOROWITZ et al., 2008).

A otimização da quimioterapia em estudos clínicos randomizados, com protocolos direcionados pelo risco, tem levado a altas taxas de remissão clínica (ausência de sinais e sintomas relacionados atribuíveis à leucemia), morfológica (demonstração de menos de 5% de linfoblastos na medula óssea), e molecular (doença residual mínima negativa por análise de citometria de fluxo ou reação em cadeia de polimerase – PCR), após terapia de indução (RIVERA; RIBEIRO, 2014), com consequente aumento na sobrevida global, que pode atingir taxas de 90% em países desenvolvidos (HUNGER et al., 2012). Entretanto, a recidiva pode ocorrer em 15-20% dos casos, o que reduz drasticamente essas chances de sobrevida (SAARINEN-PIHKALA et al., 2012). A recidiva é a principal causa de falha no tratamento e pode ser predita por uma combinação de critérios de resposta clínica, morfológica e molecular (PAGANIN et al., 2014). Pode ser medular, caracterizada pelo reaparecimento de mais de 5% de células leucêmicas na medula óssea, ou extra medular, principalmente em SNC e testículos.

1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda e moléculas de adesão

A expressão aberrante e os níveis séricos elevados de algumas moléculas de adesão, como CD44, E-caderina e EpCAM, têm sido associados a vários tumores sólidos e neoplasias hematológicas, incluindo LLA, e podem ser potenciais marcadores de atividade e prognóstico da doença (CHRISTOFORI, 2003; SEEBER; BRAICU; et al., 2015; SPIZZO et al., 2011; STAUDER et al., 1996; SYRIGOS et al., 2004).

A detecção de um marcador de atividade de doença no soro das crianças com LLA, como em outros tipos de câncer, é uma estratégia atraente porque a coleta de sangue periférico é mais simples e menos agressiva em comparação com o aspirado da medula óssea realizado para avaliação morfológica, imunofenotípica e citogenética.

1.3 Moléculas de adesão

1.3.1 CD44

CD44 é uma glicoproteína transmembranar com peso molecular de ~ 90 kDa expressa na maioria das células hematopoiéticas e em vários tipos de células não hematopoiéticas, incluindo células malignas (WILLIAMS et al., 2013). É codificada por um gene complexo contendo pelo menos 20 exons, com geração de isoformas variantes por *splicing* alternativo de parte desses exons (ZEILSTRA et al., 2014). CD44 é uma molécula multifuncional, envolvida em várias interações célula-matriz extracelular, especialmente com ácido hialurônico, regulando seu metabolismo em tecidos normais, e é vital na ativação, recirculação e *homing* de linfócitos, na angiogênese e na liberação de citocinas para seus receptores correspondentes (BJORKLUND et al., 2014). Todas essas funções biológicas são essenciais para o funcionamento das células normais, mas também são associadas às atividades patológicas das células malignas (SENBANJO; CHELLAIAH, 2017).

A sua forma solúvel (sCD44) é gerada por proteólise do domínio extracelular da proteína, por atividade das metaloproteinases (MMPs), presenilina-1/ γ -secretase, e outras *shedases*, podendo ser medida em fluidos corporais (OKAMOTO et al., 2001; THORNE; LEGG; ISACKE, 2004). O domínio intracelular, após a liberação por clivagem do domínio extracelular, promove sinalização celular e transcrição de genes, com importante papel na progressão tumoral e metástases (OKAMOTO et al., 2001; THORNE et al., 2004; WILLIAMS et al., 2013) (Figura 1).

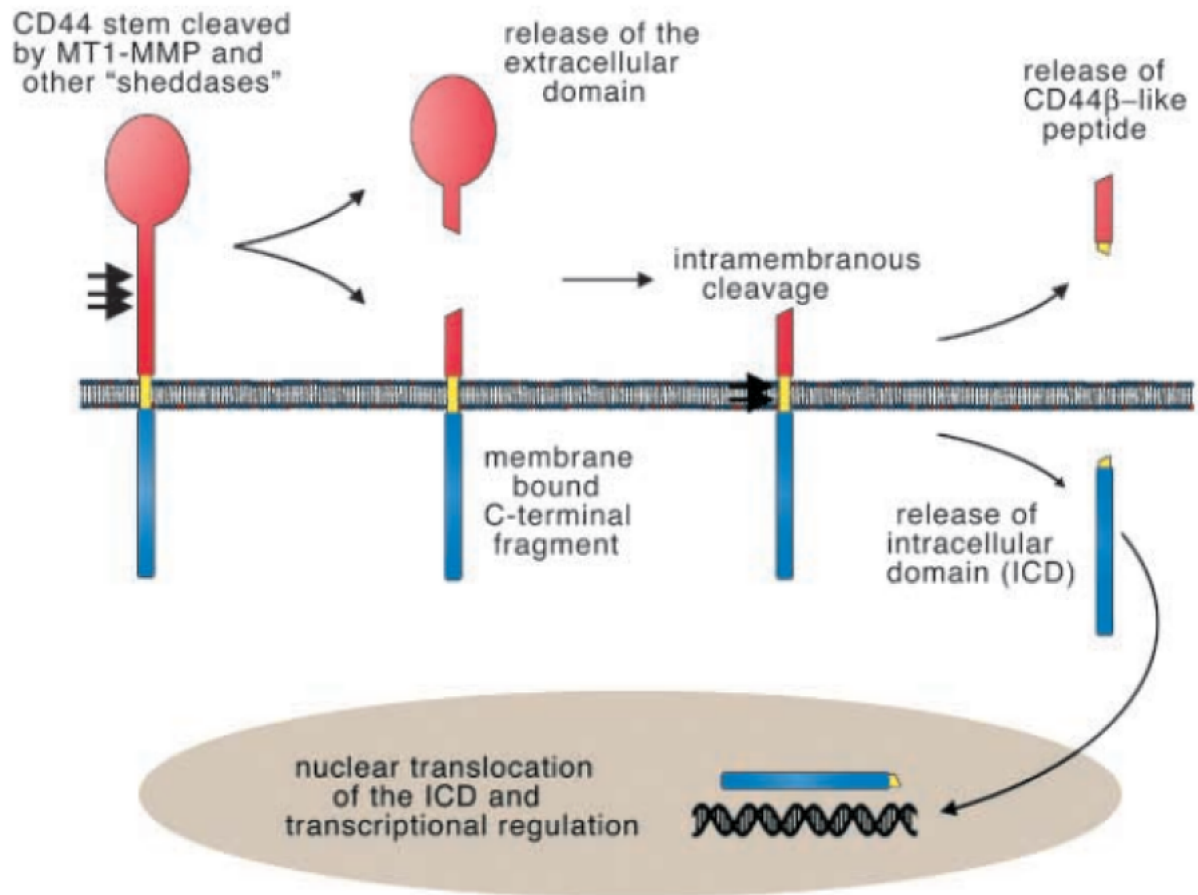


Figura 1 – Desenho esquemático do processo proteolítico de CD44. O domínio extracelular de CD44 é clivado pela metaloproteínase de matrix tipo 1 membranar (MT1-MMP) e outras *shedases*, e secretado nos fluidos corporais. Posteriormente ocorre proteólise intramembranar pela presenilina-1/ γ -secretase, o que resulta na liberação de um peptídeo *CD44 β -like* (domínio transmembranar) e geração do domínio intracelular, envolvido na sinalização celular e transcrição de genes importantes na sobrevivência celular, migração, invasão, angiogênese e metástases.

Fonte: THORNE et al., 2004

Estudos anteriores mostram uma relação entre concentrações séricas elevadas de sCD44 e potencial metastático de vários tipos de tumores sólidos, como carcinoma gástrico, de cólon e de mama (GUO et al., 1994; MARTIN et al., 1997; MAYER et al., 2008). Em pacientes com tumores hematológicos, como síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias, principalmente LLA, seus níveis séricos de sCD44 elevados são fortemente associados à mau prognóstico da doença (AMIRGHOFAN; ASIAEE; KAMAZANI, 2016; TACYILDIZ et al., 2001; TAKEUCHI et al., 1999).

1.3.2 E-caderina

A E-caderina pertence à família das caderinas, composta por glicoproteínas transmembranares dependentes de Ca^{2+} , que medeiam a adesão homotípica célula-célula. Tem um peso

molecular de $\sim 120\text{kDa}$ e é expressa predominantemente na superfície das células epiteliais, em uma variedade de tecidos adultos e embrionários, com a função de estabelecer e manter a arquitetura tecidual normal (WIJNHOFEN; PIGNATELLI, 1999). E-caderina foi recentemente detectada como uma proteína expressa em precursores hematopoiéticos eritróides, em um padrão regulado pelo desenvolvimento, isto é, está presente em eritroblastos precoces e tem sua expressão gradualmente reduzida nas células eritróides maduras (ARMEANU; CA; KLEIN, 2000).

Por sua relação com a manutenção da integridade do tecido, a E-caderina geralmente funciona como uma molécula supressora tumoral e, portanto, sua expressão reduzida tem sido associada com um pior prognóstico clínico em pacientes com câncer (XING et al., 2013; XU, X. L. et al., 2014). Há evidências de que muitas células altamente invasivas e metastáticas mantêm características moleculares e morfológicas de epitélio bem diferenciado, incluindo alta expressão de E-caderina, porém essa invasividade está associada à coexpressão de outras caderinas, como P-caderina e N-caderina (CHRISTIANSEN; RAJASEKARAN, 2006; NIEMAN et al., 1999; RIBEIRO et al., 2013). E-caderina também mostra um envolvimento crítico no desenvolvimento eritróide, já que sua inibição resulta em ruptura do processo de maturação dessa linhagem celular hematopoiética (ARMEANU et al., 2000).

As suas formas solúveis (sE-caderina) foram identificadas como polipeptídeos de 80-84kDa liberados da linhagem celular de carcinoma humano (MCF-7), como produtos de degradação proteolítica da forma membranar intacta, e detectados no soro de indivíduos normais e pacientes com várias doenças (KATAYAMA et al., 1994). A sE-caderina tem funções diferentes da E-caderina membranar, uma vez que o domínio extracelular, liberado pela clivagem, interfere nas junções de adesão intercelular, enquanto que o domínio intracelular pode ser translocado ao núcleo e ativar genes relacionados à tumorigênese (HU et al., 2016; SALAHSHOR et al., 2008) (Figura 2).

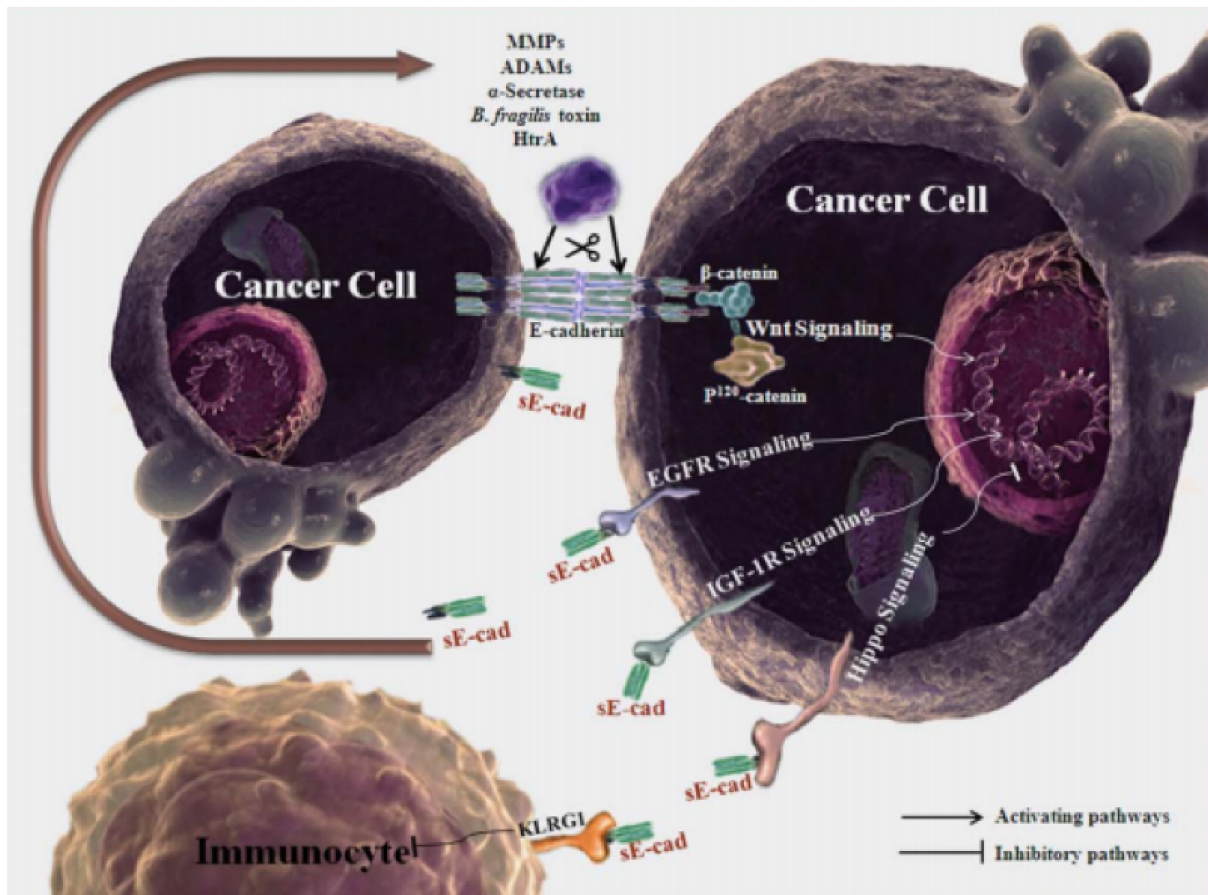


Figura 2 – Desenho esquemático do mecanismo de proteólise de E-caderina. A sE-caderina é produzida por atividade da α -secretase, além de metaloproteínas de matrix (MMPs), proteínas da família desintegrina e metaloproteínas (ADAMs), e outras moléculas. Após sua liberação, a sE-caderina ativa as vias de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), Wnt/ β -catenina e do receptor 1 do fator de crescimento *insulina-like* (IGF-1R), e inibe a via de sinalização Hippo (inibidora da proliferação celular e promotora de apoptose). Além disso, sE-caderina ativa o receptor de células *natural killers* *lecitina-like* (KLRG1), o qual inibe as células efectoras imunes, com consequente diminuição do efeito citotóxico para as células cancerígenas

Fonte: HU et al., 2016

Indivíduos com vários tipos de neoplasias epiteliais, como câncer gástrico, hepatocelular, pancreático, pulmonar, colorretal e ovariano, possuem níveis séricos de sE-caderina elevados, em comparação com controles (GADDUCCI et al., 1999; REPETTO et al., 2014). Além disso, o aumento de sE-caderina encontrado em pacientes oncológicos tem relação com progressão, proliferação e infiltração de células hematopoiéticas malignas, o que pode ter valor diagnóstico e prognóstico em pacientes com neoplasias hematológicas, como mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias (SYRIGOS et al., 2004; TAKUBO et al., 2002).

1.3.3 EpCAM

EpCAM é outra glicoproteína transmembranar, com peso molecular de 39-42kDa, que medeia a adesão homotípica dependente de Ca^{2+} entre células epiteliais, e está envolvida na sinalização, migração, proliferação e diferenciação celular (MAETZEL, D. et al., 2009). Pode ser usada como marcador diagnóstico e prognóstico para vários tipos de cânceres de origem epitelial, como carcinomas de mama, próstata, colorretal, pancreático, gástrico, ovariano e pulmonar (PATRIARCA et al., 2012), além de ser um alvo para terapia de inibição específica (HARTUNG et al., 2005; HEMPEL et al., 2000; PUNT et al., 2002). Seu papel na tumorigênese está associado à transcrição e tradução do proto-oncogene *c-myc*, envolvido na proliferação celular (MUNZ et al., 2004), com consequente estímulo para o desenvolvimento de metástases de carcinomas. O primeiro anticorpo anti-EpCAM foi aprovado em 2009 pela Comissão Européia para o tratamento intraperitoneal de ascite maligna em pacientes com tumores positivos para EpCAM, denominado catumaxomab (HEISS et al., 2010). No entanto, EpCAM pode desempenhar um duplo papel na tumorigênese, já que a perda de sua expressão foi associada, em carcinoma retal, com redução das adesões celulares, aumento do potencial migratório e progressão tumoral, sugerindo que a superexpressão da molécula também pode inibir a metástase, mediando a adesão entre essas células (HAN et al., 2017).

Embora EpCAM esteja ausente em células normais do sistema hematopoiético, sua expressão foi, recentemente, identificada em células malignas de pacientes com leucemia mieloide e mieloma múltiplo. As células leucêmicas que expressam EpCAM apresentam maior resistência às drogas quimioterápicas, devido à aumentada sinalização WNT5B, que promove migração e proliferação celular. Portanto, essa molécula de adesão apresenta-se como um potencial alvo terapêutico, efetivo e seguro, em leucemias quimiorresistentes (ZHENG et al., 2017).

Como outras moléculas, EpCAM pode sofrer proteólise e liberar seu domínio extracelular em fluidos corporais. A forma solúvel (sEpCAM) foi encontrada no soro, urina e líquido ascítico de pacientes com câncer, com sua alta concentração associada à pior prognóstico desses tumores (BRYAN et al., 2014; SEEGER; BRAICU; et al., 2015; SEEGER; MARTOWICZ; et al., 2015), uma vez que a clivagem proteolítica do domínio intracelular envia um sinal mitogênico para o núcleo celular e promove progressão tumoral (BAEUERLE; GIRE, 2007; MAETZEL, DOROTHEA et al., 2009; SCHNELL; CIRULLI; GIEPMANS, 2013) (Figura 3).

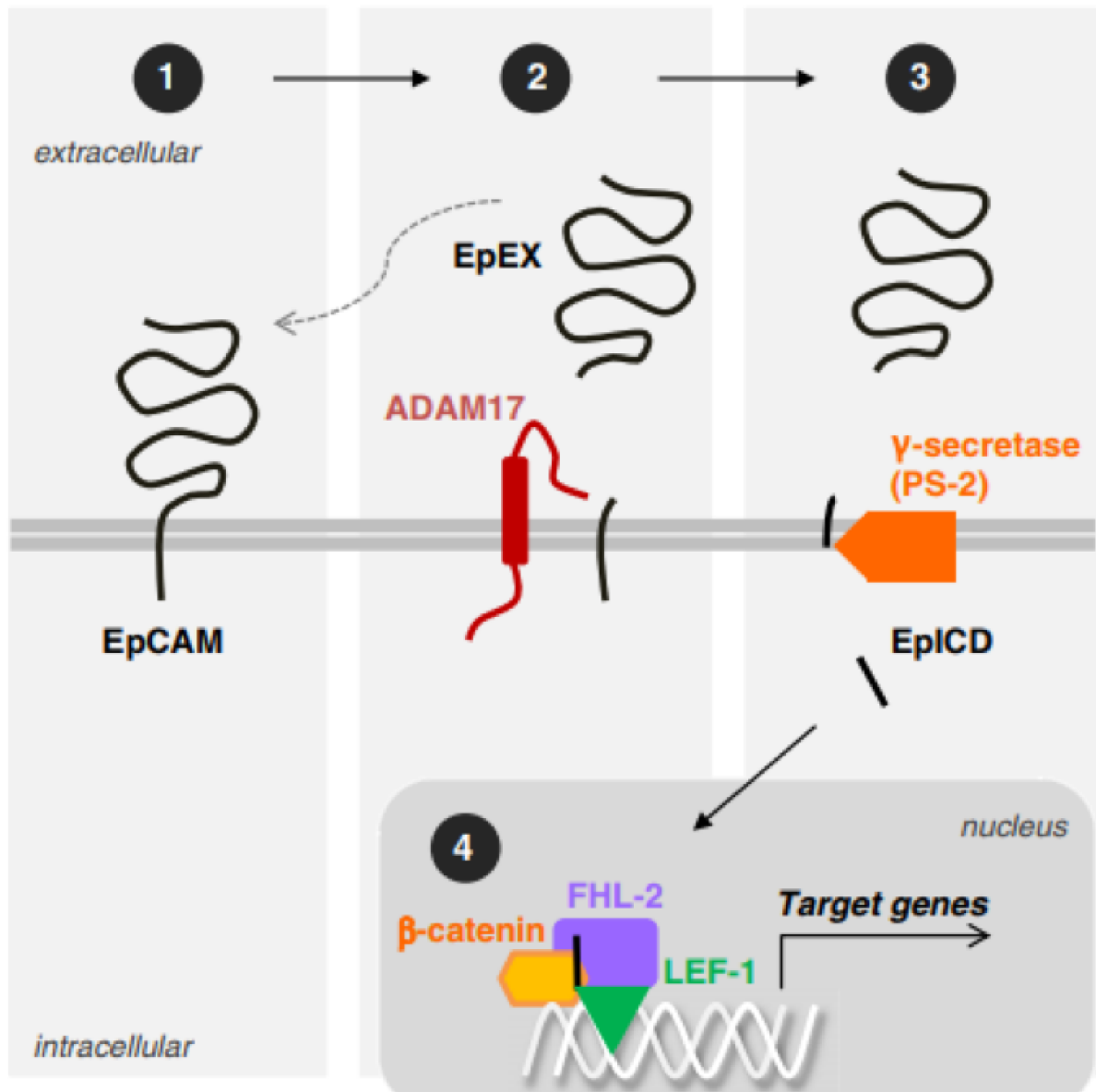


Figura 3 – Desenho esquemático do processo proteolítico de EpCAM. (1) Molécula EpCAM em seu tamanho completo. (2) Clivagem pela ADAM domínio 17 (ADAM17) e liberação do ectodomínio da EpCAM (EpEX). O EpEX pode ligar-se à EpCAM não clivada, induzindo sua proteólise (seta pontilhada). (3) Após a primeira clivagem, presenilina-2/ γ -secretase clivam a cauda citoplasmática da molécula, liberando seu domínio intracelular (EpICD). (4) EpICD associa-se com β -catenina e com a proteína *four and a half LIM domains 2* (FHL2) e transloca para o núcleo, onde se liga ao fator de transcrição *lymphoid enhancer-binding factor 1* (LEF-1) e DNA, e induz transcrição de genes alvo, como o proto-oncogene *c-myc*.

Fonte: SCHNELL et al., 2013 (Adaptado de MAETZEL et al., 2009)

Estudos recentes têm mostrado que o nível sérico de sEpCAM pode ser um marcador diagnóstico e prognóstico semelhante ao EpCAM tecidual em carcinomas (ABE et al., 2002; KIMURA et al., 2007; TAS; KARABULUT; DURANYILDIZ, 2014). Além disso, sEpCAM presente no líquido ascítico de origem maligna pode ser um preditor de pior sobrevida em pacientes com câncer, por bloquear a ação da terapia alvo. A forma solúvel da molécula,

presente no líquido ascítico, liga-se ao anticorpo anti-EpCAM e, conseqüentemente, bloqueia a interação desse anticorpo com a EpCAM membranar presente na célula tumoral, neutralizando sua atividade terapêutica (SEEBER; BRAICU; et al., 2015; SEEBER; MARTOWICZ; et al., 2015)

2 JUSTIFICATIVA

A literatura científica mostra o papel essencial dessas moléculas de adesão em vários tipos de câncer, incluindo neoplasias hematológicas. As formas membranares das moléculas têm sido estabelecidas como marcadores diagnósticos e/ou prognósticos na análise imuno-histoquímica de muitos desses tumores. Os níveis solúveis de CD44, E-caderina e EpCAM também estão intimamente relacionados à atividade e ao prognóstico de tumores sólidos e neoplasias hematológicas.

Níveis séricos de sCD44 e sE-caderina são elevados em pacientes com várias doenças malignas hematológicas, incluindo leucemias pediátricas, em comparação com indivíduos saudáveis (AMIRGHOFRAH et al., 2016; KHAN et al., 2008; TACYILDIZ et al., 2001; TAKEUCHI et al., 1999; TAKUBO et al., 2002).

Estudos mais recentes, revelam níveis elevados de sEpCAM em fluidos corporais de pacientes com vários tipos de tumores sólidos (BRYAN et al., 2014; KURBACHER et al., 2015; SEEBER et al., 2016; TAS; KARABULUT; SERILMEZ; et al., 2014) e, embora não haja dados publicados até o momento sobre o perfil de concentração de sEpCAM em neoplasias hematológicas, a expressão dessa molécula tem sido identificada em células leucêmicas (ZHENG et al., 2017), o que à princípio nos leva a inferir que o nível de sEpCAM também possa estar elevado neste tipo de câncer.

Entretanto, poucos estudos avaliaram o comportamento e correlação dos níveis séricos dessas moléculas de adesão em pacientes na fase de remissão de doença oncológica, especificamente LLA, em comparação com indivíduos saudáveis, visando corroborar a ligação dos níveis elevados com atividade de doença, com base na hipótese de que esses níveis diminuem a níveis considerados normais durante a remissão, na perspectiva futura de estabelecer um possível marcador sérico de atividade da LLA, como já existente em outros tumores, o que tornaria o diagnóstico mais simples e menos agressivo para o paciente.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a concentração sérica das formas solúveis de CD44, E-caderina e EpCAM em crianças com diagnóstico de LLA, na fase de remissão da doença, e estabelecer uma possível correlação entre essas moléculas.

3.1 Objetivos específicos

- Comparar os níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM entre pacientes com LLA em remissão e controles saudáveis;
- Comparar os níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM entre os sexos, tanto no grupo de pacientes quanto no grupo controle;
- Comparar os níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM entre pacientes ainda em tratamento da LLA, após a remissão, e pacientes após término do tratamento;
- Comparar os níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM entre pacientes, em remissão, com e sem acometimento do SNC ao diagnóstico da LLA;
- Avaliar existência de correlação entre essas moléculas tanto no grupo de pacientes quanto no grupo controle.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Participantes

Foi realizado um estudo observacional analítico transversal, no qual foram incluídos pacientes com idade entre 0 e 13 anos, diagnosticados com LLA entre 2009 e 2017, e tratados no Hospital do Câncer da Universidade Federal de Uberlândia, em remissão clínica e morfológica da doença. O tratamento foi realizado conforme Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Infância (GBTLI-LLA), o qual consiste em uma fase de 30 dias de indução e, após remissão, fases de consolidação e manutenção, com duração total média de 24 meses. Foram excluídos pacientes que sofreram recidiva da doença e/ou receberam outro protocolo de tratamento antes da remissão.

Os pacientes foram recrutados para o estudo no período de abril a agosto de 2017, durante consulta no ambulatório de oncologia pediátrica, resultando em uma amostra final de 20 pacientes. Desses 20 pacientes, quatro foram recrutados em dois momentos nesse mesmo período: ao diagnóstico da LLA e, portanto, na fase ativa da doença, e na fase de remissão da mesma após primeira etapa do tratamento.

Para comparação como grupo controle, foram incluídas 20 crianças saudáveis, combinadas com o grupo de pacientes por idade, recrutadas entre final de agosto e início de setembro de 2017, durante consulta pré-operatória para cirurgias eletivas, como adenoidectomia, amigdalectomia, hernioplastia e postectomia, no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Foram excluídas desse grupo crianças com quadro infeccioso, alérgico ou qualquer tipo de doença aguda ou crônica, resultando em um grupo controle composto por 16 crianças saudáveis.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelo responsável legal de cada um dos participantes do estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Uberlândia (número do parecer: 1.936.446).

As informações dos participantes, pertinentes ao estudo, foram coletadas dos prontuários ou por meio de entrevista no momento do recrutamento, utilizando uma ficha específica como instrumento de coleta de dados.

4.2 Coleta das amostras

Todas as amostras de sangue foram coletadas de abril a setembro de 2017 em um único momento, exceto para os quatro pacientes avaliados na fase de doença ativa e na fase de remissão. A coleta do sangue foi realizada no momento da coleta de outros exames de rotina para os pacientes com diagnóstico de LLA e no momento da coleta dos exames pré-operatórios para o grupo controle, sem riscos adicionais para os participantes do estudo.

Estas amostras de sangue foram centrifugadas a 600 g e o soro foi separado e armazenado a -80°C até a análise.

4.3 Quantificação de sCD44, sE-caderina e sEpCAM

A dosagem sérica de sCD44, sE-caderina e sEpCAM foi realizada por meio de kits de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) do tipo sanduíche, comercialmente disponíveis (Express Biotech International, Frederick, Maryland, EUA). Todo o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O limite de detecção das concentrações foi de 0,156 a 10 ng/mL para sCD44 e sE-caderina e 1,562 a 100 UI/mL para sEpCAM. Como a literatura não mostra a diluição ideal das amostras para ELISA, foram estabelecidas, com base na recomendação do fabricante, as seguintes diluições: 1:2; 1:5; 1:10; 1:20, 1:50 e 1:100. Os melhores pontos de diluição para sCD44, sE-caderina e sEpCAM foram 1:5, 1:5 e 1:2, respectivamente.

4.4 Análise estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o *software* de análise estatística SPSS (IBM Corporation, versão 21.0, Armonk, NY). Os gráficos foram construídos no *software* GraphPad Prism (versão 7.0, Califórnia, EUA). O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinar se as amostras assumiam uma distribuição normal. As diferenças entre dois grupos foram analisadas utilizando teste t de Student ou teste de Mann-Whitney, para dados com distribuição normal e não normal, respectivamente, sendo consideradas significativas se $p < 0,05$. Para análises de dados pareados, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon, com significância estatística se $p < 0,05$. A análise de correlação foi realizada, e estabelecido o coeficiente de correlação de Pearson, para avaliar a relação entre as moléculas, com significância estatística se $p < 0,01$. Regressão linear multivariada foi utilizada para avaliar os melhores modelos para explicar a variância de sCD44, sE-caderina e sEpCAM entre os pacientes. Uma vez que os modelos foram definidos, cada variável independente de cada modelo foi incluída em uma regressão linear univariada e as variáveis com $p < 0,05$ foram incluídas em uma análise multivariada. O método *stepwise backward* foi usado para construir um modelo final para essas variáveis com $p < 0,10$.

5 RESULTADOS

Entre os 20 pacientes com LLA envolvidos no estudo, 11 eram do sexo masculino e nove do sexo feminino, com idade média de 7,9 anos, variando entre 2 e 13 anos. Já o grupo controle foi composto por oito crianças do sexo masculino e oito do sexo feminino, com idade média de 8,1 anos, variando entre 3 e 13 anos.

Entre os pacientes, o tempo médio do diagnóstico da doença foi de 35 meses, enquanto o tempo médio de remissão foi de 34,3 meses. Onze pacientes ainda estavam em tratamento no momento do recrutamento e coleta da amostra, com um tempo médio de tratamento de 9,8 meses, enquanto nove já haviam terminado o tratamento. O tempo médio do término do tratamento foi de 17,3 meses. Três pacientes tinham história de envolvimento de SNC ao diagnóstico, enquanto 17 não apresentavam esse acometimento extra medular.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa nas médias das concentrações séricas das moléculas de adesão avaliadas entre os sexos, em nenhum dos dois grupos.

A Figura 4 compara os níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM entre pacientes com LLA em remissão e controles. No grupo de pacientes, as medianas das concentrações de sCD44, sE-caderina e sEpCAM foram 0,708 ng/mL (*range*: 0,416 – 5,159 ng/mL), 0,304 ng/mL (*range*: 0 – 4,756 ng/mL) e 6,357 UI/mL (*range*: 3,734 – 24,955 UI/mL), respectivamente. No grupo controle, as medianas das concentrações foram 0,696 ng/mL (*range*: 0,373 – 7,720 ng/mL), 0,406 ng/mL (*range*: 0,046 – 6,658 ng/mL) e 8,501 UI/mL (*range*: 5,729 – 26,314 UI/mL) para sCD44, sE-caderina e sEpCAM, respectivamente. Os níveis séricos circulantes de sEpCAM foram significativamente menores em pacientes com LLA em remissão, comparados aos níveis do grupo controle ($p=0,01$). Não houve diferença estatística dos níveis séricos circulantes de sCD44 e sE-caderina entre pacientes em remissão e controles ($p=0,807$ e $p=0,226$, respectivamente).

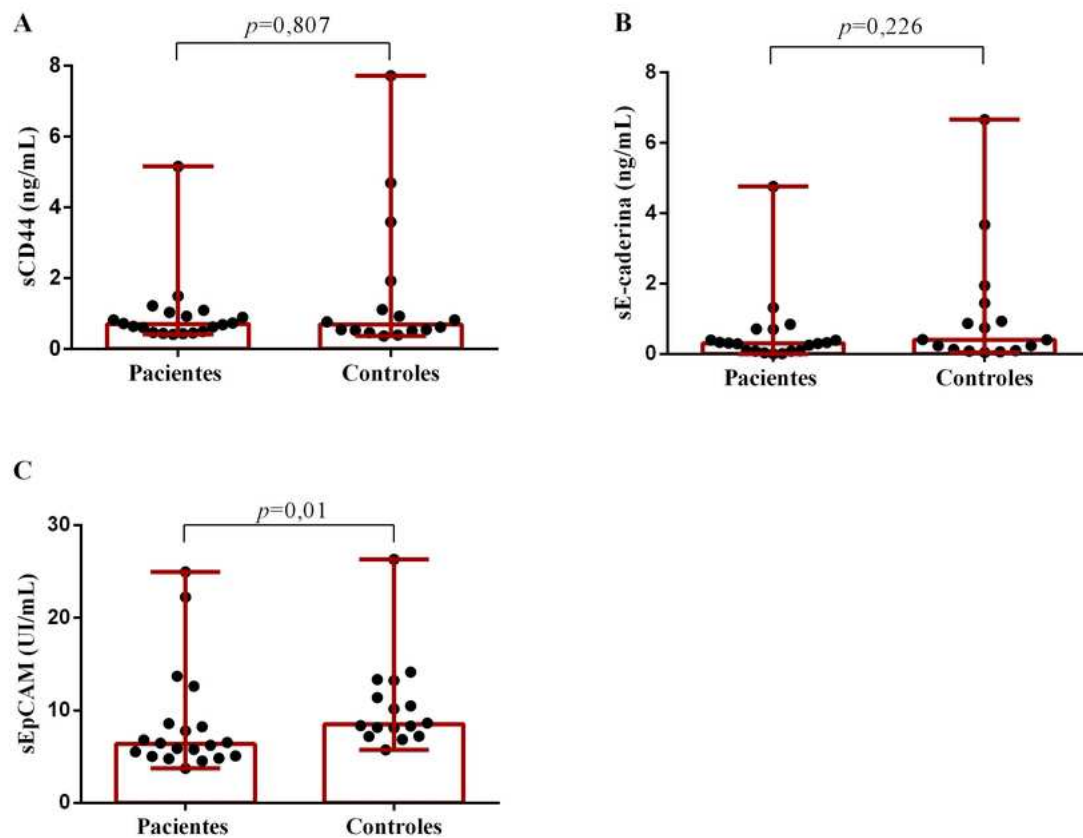


Figura 4 – Representação gráfica dos níveis séricos de (A) sCD44, (B) sE-caderina e (C) sEpCAM em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda em remissão e controles. Em cada gráfico estão representadas mediana e *range*. A significância estatística foi estabelecida utilizando o teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

A comparação das concentrações séricas de cada molécula entre pacientes avaliados ainda em tratamento da LLA após a remissão e pacientes avaliados após término do tratamento não mostrou diferença estatística (Figura 5).

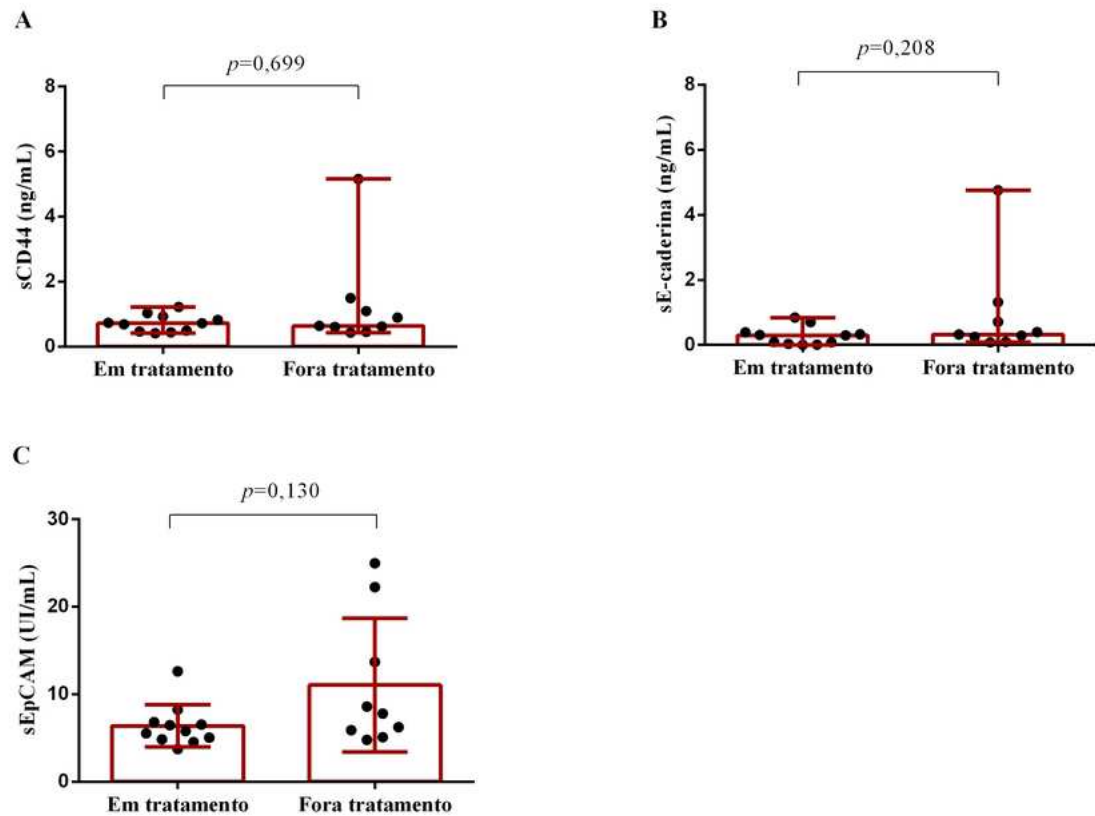


Figura 5 – Representação gráfica dos níveis séricos de (A) sCD44, (B) sE-caderina e (C) sEpCAM em pacientes ainda em tratamento para Leucemia Linfoblástica Aguda após remissão e pacientes após término do tratamento. Em cada gráfico estão representadas mediana e *range*. A significância estatística foi estabelecida utilizando o teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM entre pacientes em remissão com ou sem acometimento do SNC ao diagnóstico da LLA (Figura 6).

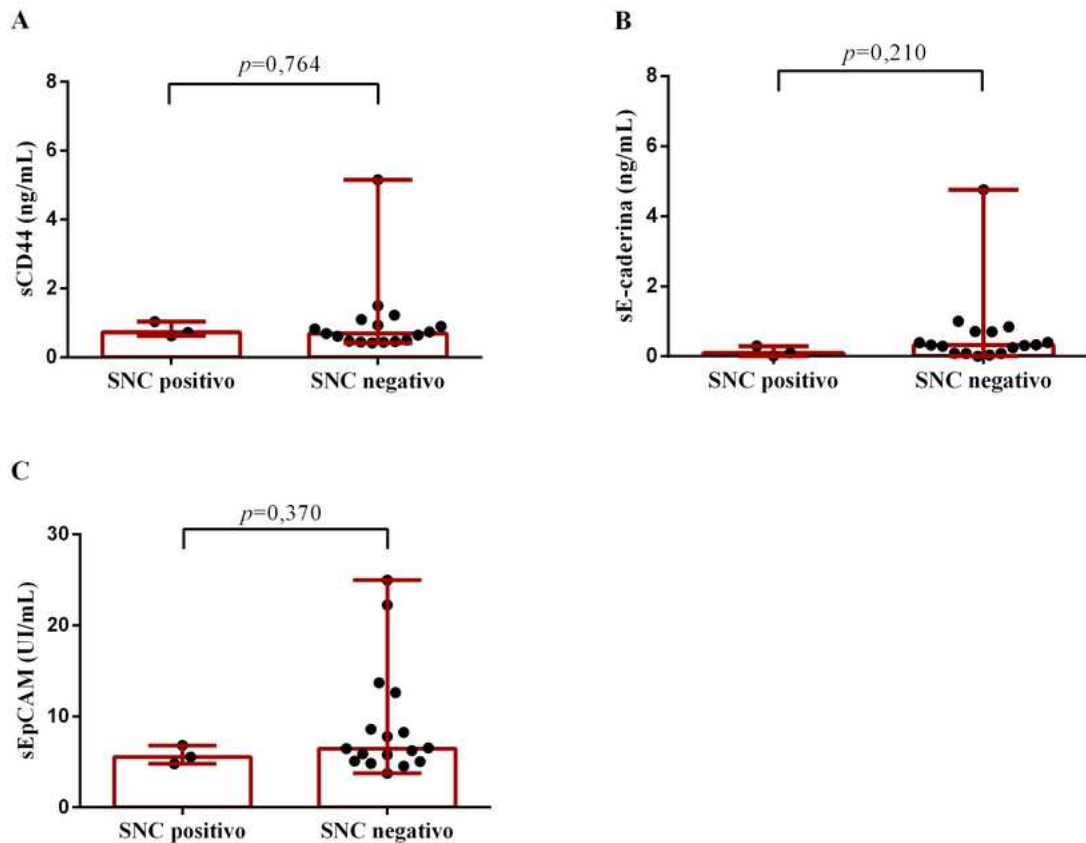


Figura 6 – Representação gráfica dos níveis séricos de (A) sCD44, (B) sE-caderina e (C) sEpCAM em pacientes em remissão com e sem envolvimento de Sistema Nervoso Central ao diagnóstico da Leucemia Linfoblástica Aguda. Em cada gráfico estão representadas mediana e *range*. A significância estatística foi estabelecida utilizando o teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

As moléculas analisadas mostraram correlação no grupo de pacientes, sendo que sCD44 e sE-caderina estão fortemente correlacionadas ($r = 0,954$; $p < 0,01$). Não houve correlação entre as moléculas no grupo controle ($p > 0,01$). Os valores dos coeficientes de correlação de Pearson e valor do nível descritivo do teste entre as moléculas estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e valor de p para a correlação entre as moléculas de adesão nos pacientes e controles

| Grupo | Variáveis | r | p^* |
|-----------|----------------------|--------------|-------|
| Pacientes | sCD44 e sE-caderina | 0,954 | 0,000 |
| | sCD44 e sEpCAM | 0,801 | 0,000 |
| | sE-caderina e sEpCAM | 0,790 | 0,000 |
| Controles | sCD44 e sE-caderina | 0,456 | 0,076 |
| | sCD44 e sEpCAM | 0,186 | 0,492 |
| | sE-caderina e sEpCAM | 0,435 | 0,092 |

*significância estatística se $p < 0,01$

A análise de regressão linear multivariada foi utilizada para definir o melhor modelo de relação entre as moléculas. Sendo assim, a análise mostrou que quando sCD44 e sE-caderina são colocados como variável dependente, é obtido um coeficiente de determinação próximo de 1. Definido o modelo, aplicou-se o método *stepwise backward* para definição da variável independente mais importante. Dessa forma, constatou-se que existe uma influência entre as concentrações de sE-caderina e sCD44. Os dados estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Modelos de regressão linear multivariada de sCD44, sE-caderina e sEpCAM entre os pacientes

| Variável dependente | Variável independentes | R^2 | p^* |
|---------------------|------------------------|--------------|---------------|
| sCD44 | sE-caderina e sEpCAM | 0,916 | 0,000 e 0,287 |
| sE-caderina | sCD44 e sEpCAM | 0,912 | 0,000 e 0,559 |
| sEpCAM | sCD44 e sE-caderina | 0,649 | 0,287 e 0,559 |

* significância estatística se $p < 0,05$

Com base na equação obtida por regressão linear, 1 ng/mL de aumento de sE-caderina resultaria em um aumento de 0,80 ng/mL de sCD44 no primeiro modelo, e 1 ng/mL de aumento de sCD44 resultaria em um aumento de 0,90 ng/mL de sE-caderina no segundo modelo, entre os pacientes. Essa alta correlação pode ser observada nos diagramas de dispersão entre sCD44 e sE-caderina gerados por análise de regressão linear univariada (Figura 7).

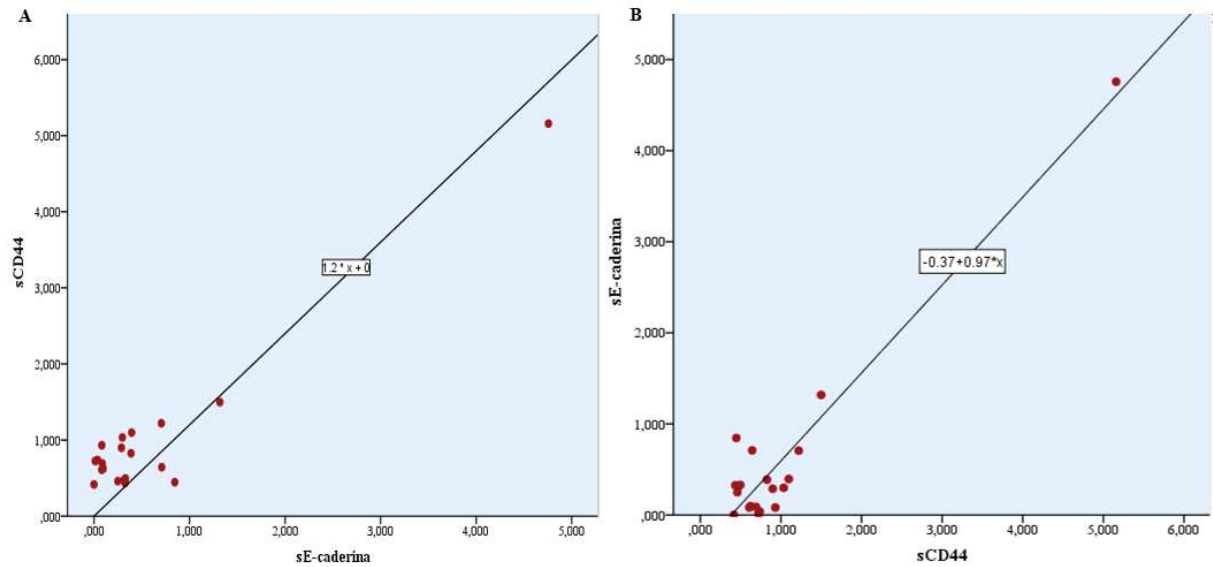


Figura 7 – Diagramas de dispersão representando a forte correlação positiva entre (A) variável dependente sCD44 e independente sE-caderina e (B) variável dependente sE-caderina e independente sCD44.

Embora sem significância estatística, a análise pareada dos quatro pacientes avaliados na fase de doença ativa e na fase de remissão mostrou uma queda nos níveis séricos circulantes de sCD44 na remissão em todos os pacientes, fato não observado para sE-caderina e sEpCAM (Figura 8).

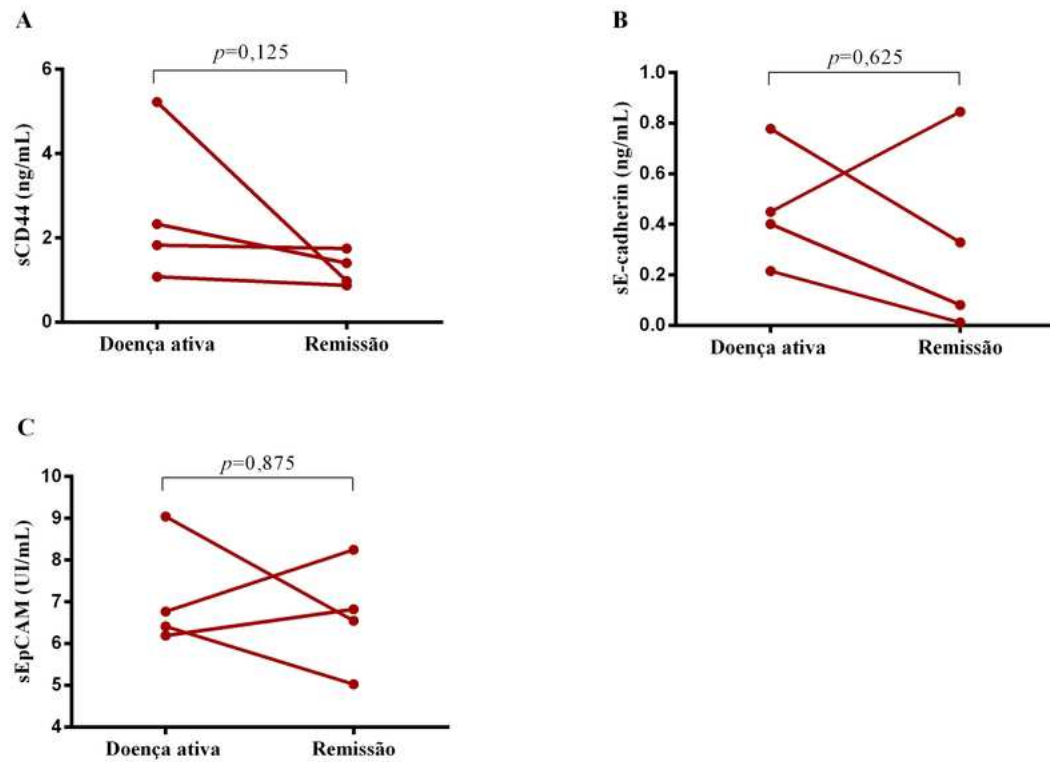


Figura 8 – Representação gráfica dos níveis séricos de (A) sCD44, (B) sE-caderina e (C) sEpCAM nos pacientes avaliados antes e após remissão da LLA. A significância estatística foi estabelecida utilizando o teste de Wilcoxon ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A comparação entre os níveis séricos de sCD44 e sE-caderina entre crianças tratadas para LLA, em remissão da doença, e crianças saudáveis, na mesma faixa etária, não mostrou diferença estatística entre os dois grupos. Outros autores encontraram resultados semelhantes em estudos com leucemias agudas, uma vez que mostraram que os níveis séricos mais altos de sCD44 em crianças com a doença ativa retornam a níveis considerados normais após a quimioterapia e remissão da doença, sendo essa molécula considerada pelos autores um bom indicador de resposta ao tratamento. Eles deduziram que a redução dos níveis de sCD44 provavelmente ocorre porque as células malignas, destruídas pela quimioterapia, eram a principal fonte de produção da molécula, após a supressão da hematopoiese normal (TAKEUCHI et al., 1999). Em análises pareadas, os níveis séricos de sE-caderina de pacientes com câncer de mama e bexiga reduziram após a quimioterapia (HOFMANN et al., 2013; HUSSAIN et al., 2014). O tratamento de ressecção cirúrgica tumoral também resultou em uma diminuição da sE-caderina sérica em pacientes com câncer de próstata (IACOPINO et al., 2012) e câncer hepático (SOYAMA et al., 2008).

Por outro lado, nossos resultados encontraram níveis séricos de sEpCAM significativamente menores nos pacientes com LLA em remissão, em comparação com os controles saudáveis. Estudos anteriores mostram que pacientes com câncer de ovário e esôfago apresentam, na fase ativa da doença, níveis séricos mais elevados de sEpCAM, em comparação com controles saudáveis, sendo a maior parte dessa sEpCAM liberada da superfície celular das células tumorais, por proteólise (KIMURA et al., 2007; TAS; KARABULUT; SERILMEZ; et al., 2014). As células tumorais possuem maior atividade de *shedases*, que clivam a porção extracelular de EpCAM e, dessa forma, aumentam seus níveis séricos (GOOZ, 2010). Nesses pacientes, uma redução drástica dos níveis séricos de sEpCAM, após remissão de doença, poderia ser explicada pela atividade citotóxica do tratamento quimioterápico contra as células tumorais produtoras de sEpCAM. Da mesma forma, a quimioterapia agressiva contra as células tumorais poderia explicar nossos resultados.

No entanto, alguns autores não encontraram diferença entre os níveis séricos de sEpCAM em pacientes com câncer de pulmão e controles saudáveis, e também não estabeleceram nenhuma correlação desses níveis com resposta à quimioterapia (TAS; KARABULUT; DURANYILDIZ, 2014). Outros mostraram níveis séricos de sEpCAM mais baixos em pacientes com adenocarcinoma pancreático em comparação com controles saudáveis (GEBAUER et al., 2014). Portanto, uma questão importante deve ser levantada em relação à quantificação sérica de sEpCAM. A forma solúvel de EpCAM liberada de células malignas difere, em relação à glicosilação e estrutura terciária, da forma solúvel de EpCAM liberada de células não-malignas. Esta variante de sEpCAM liberada da superfície celular de células malignas forma oligômeros, que podem ser ligados à superfície de outras células tumorais (TREBAK et al., 2001). Essa interação impede que

o sEpCAM seja detectado por anticorpos do teste ELISA, já que o local de ligação do anticorpo está bloqueado pela oligomerização. Além disso, as proteínas hiperglicosiladas podem formar estruturas que também se ligam às células malignas (LANGE et al., 2014). Esses efeitos podem explicar a menor detecção de sEpCAM clivada da membrana de células tumorais, levando a valores de sEpCAM semelhantes, ou até mais baixos, em pacientes com câncer, em comparação com controles saudáveis (GEBAUER et al., 2014). Além disso, não é possível determinar se os pacientes desse estudo produziram a sEpCAM modificada, uma vez que no grupo de pacientes existem aqueles em que foi detectado níveis elevados dessa molécula.

Os valores das concentrações séricas de sCD44 e sE-caderina encontrados neste estudo foram menores do que os relatados na literatura, tanto em pacientes com LLA em remissão, quanto em controles saudáveis (TAKEUCHI et al., 1999; TAKUBO et al., 2002), o que pode ser explicado pelas diferenças nas técnicas de diluição e quantificação das amostras. As concentrações séricas de sEpCAM foram determinadas em unidades de medida (UI/mL) diferentes das utilizadas em outros estudos (ng/mL) (GEBAUER et al., 2014; SEEGER; MARTOWICZ; et al., 2015; TAS; KARABULUT; DURANYILDIZ, 2014), estabelecidas de acordo com os fabricantes dos respectivos kits de quantificação, dificultando a comparação dos valores das concentrações séricas encontradas com os publicados na literatura.

Os dados publicados sobre os níveis séricos de moléculas de adesão estão focados na sua relação com fatores diagnósticos e prognósticos em pacientes com câncer. Existem poucos estudos que comparam os níveis séricos das moléculas entre os sexos. No presente estudo, não houve diferença nos níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM entre os sexos, nem no grupo de pacientes em remissão e nem no grupo controle. Resultados semelhantes foram encontrados na análise dos níveis séricos de sE-caderina em pacientes com mieloma múltiplo e controles saudáveis (SYRIGOS et al., 2004).

Na comparação dos níveis de cada uma das moléculas estudadas entre pacientes ainda em tratamento da LLA, após a remissão da doença, e pacientes após o término do tratamento, não foi encontrada diferença estatística para nenhuma das moléculas. Não é possível estabelecer, pela literatura, se existe alguma diferença nas concentrações das moléculas ao longo do tratamento e após seu término, já que as comparações publicadas para os diversos tipos de tumores baseiam-se na doença ativa e na remissão, e não na fase do tratamento.

Nossos dados não permitem caracterizar as moléculas sCD44, sE-caderina e sEpCAM como possíveis marcadores diagnósticos ou prognósticos, uma vez que os pacientes foram avaliados em fase de remissão da doença, e não foi encontrada nenhuma relação entre as concentrações séricas das moléculas analisadas e presença de acometimento do SNC ao diagnóstico da LLA. Estudos prévios mostram que a expressão de CD44 está relacionada com acometimento extra medular da LLA, como envolvimento do SNC, devido à função dessa molécula de adesão nos linfoblastos (EL-SHARKAWY et al., 2017). O CD44 pode facilitar a passagem de blastos para os diferentes tecidos por estabelecer uma firme aderência da célula maligna ao endotélio, levando à

disseminação extra medular, como observado em linfomas (HORST et al., 1990). Outros estudos apresentam a relação da alta expressão de EpCAM com desenvolvimento de metástases em tumores sólidos, incluindo disseminação para o SNC (CIMINO et al., 2010). No entanto, os autores analisaram a doença ativa, diferentemente do presente estudo.

Embora não existam dados prévios sobre a correlação entre as moléculas de adesão nas suas formas solúveis, sabe-se que a expressão de determinadas moléculas pode influenciar a expressão de outras. Um estudo realizado com linhagens celulares de câncer pancreático transfectadas com EpCAM mostrou que a alta expressão de EpCAM foi associada com aumento da expressão de E-caderina (AKITA et al., 2011), enquanto outro estudo encontrou relação da coexpressão de CD44 e EpCAM, em análise imuno-histoquímica de tecidos de tumores colorretal e pancreático humanos, com menor sobrevida livre de doença dos pacientes acometidos (KUHN et al., 2007).

Neste estudo, encontramos correlação linear positiva entre todas as moléculas solúveis no grupo de pacientes, com uma forte relação entre sCD44 e sE-caderina, caracterizada pela interdependência, já que os modelos de regressão linear mostraram que os níveis de sCD44 influenciam os níveis de sE-caderina enquanto que os níveis dessa última também influenciam os níveis da primeira. Alguns estudos investigaram a relação funcional entre as formas membranares dessas duas moléculas. Um desses estudos estabeleceu *in vitro* uma correlação inversa entre a expressão de CD44 e E-caderina, através de um modelo experimental de transfecção de E-caderina exógena em células de carcinoma mamário murino. A alta expressão de E-caderina diminuiu a afinidade da ligação de CD44, expresso nessas células tumorais, com ácido hialurônico da matrix extracelular. Como muitas funções de CD44 são mediadas por essa ligação, incluindo migração e invasão das células tumorais, sua inibição pode fazer parte da função supressora tumoral da E-caderina (XU, Y.; YU, 2003). Outro estudo reforçou essa correlação inversa entre CD44 e E-caderina, já que demonstrou que a perda gradual de E-caderina esteve associada com aumento progressivo de CD44 em tumores esofágicos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Em análise imuno-histoquímica, a E-caderina mostrou-se restrita às áreas com baixa expressão de CD44, enquanto foi observado um aumento da expressão de CD44 na ausência da E-caderina na maior parte dos tecidos tumorais avaliados. Na transfecção *in vitro* de E-caderina em linhagens de células de carcinoma esofágico, com baixos níveis dessa molécula, foi evidenciada diminuição da expressão, inicialmente aumentada, de CD44 (LE BRAS et al., 2011). Correlação negativa entre CD44 e E-caderina também foi encontrada em adenocarcinoma gástrico, com a ausência de expressão de E-caderina relacionada a pior sobrevida, em comparação com a presença de sua expressão na superfície da célula tumoral (LU et al., 2013).

Por outro lado, outros autores encontraram correlação linear positiva entre as moléculas, detectadas por imuno-histoquímica de carcinomas uroteliais, com uma diminuição significativa da expressão de E-caderina e CD44 em carcinomas de alto grau, caracterizados por alto índice de proliferação, invasão e metástases (STEPAN et al., 2015).

As análises de correlação entre as moléculas de adesão são estabelecidas, na literatura, no microambiente tumoral. Curiosamente, nossos resultados mostraram que as correlações entre as formas solúveis dessas moléculas, especialmente entre sCD44 e sE-caderina, foram definidas no grupo de pacientes, mas nenhuma correlação significativa entre as mesmas moléculas foi encontrada no grupo controle. É possível que em um microambiente com altos níveis de E-caderina solúvel, como no microambiente tumoral, a mesma induza a expressão de metaloproteinases (NAWROCKI-RABY et al., 2003). Uma vez que essas enzimas estão ativas, elas iniciam a atividade proteolítica sobre CD44 membranar (OKAMOTO et al., 1999), aumentando os seus níveis séricos, o que pode explicar a relação positiva, encontrada neste estudo, entre essas duas moléculas no grupo dos pacientes, diferente do observado no grupo controle.

A análise pareada dos quatro pacientes que tiveram seus níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM avaliados na doença ativa e na remissão, embora não estatisticamente significativa, corroborou os resultados de estudos anteriores mostrando uma redução nos níveis séricos de sCD44 associada à remissão da doença (TAKEUCHI et al., 1999). Os níveis de sE-caderina também reduziram, após remissão, em três pacientes, com discrepância de um paciente, o qual foi individualmente avaliado e mostrou uma análise imunofenotípica desfavorável, com marcadores de mau prognóstico. Já os resultados para os níveis de sEpCAM foram discrepantes entre os pacientes analisados, mas a amostra foi muito pequena para gerar conclusões.

7 CONCLUSÕES

As crianças em remissão de LLA não apresentam diferença dos níveis séricos de sCD44 e sE-caderina, com exceção do sEpCAM, comparado às crianças saudáveis.

A concentração de sE-caderina parece associada com a concentração de sCD44 nas crianças com LLA.

Como perspectiva futura, propõe-se analisar as expressões de CD44, E-caderina e EpCAM, em suas formas membranares, relacionadas com as populações de blastos (estaminais, precursoras e progenitoras), e correlacionar com os níveis séricos de sCD44, sE-caderina e sEpCAM, respectivamente, em crianças com LLA, para melhor esclarecimento da função dessas moléculas de adesão nessa neoplasia hematológica, e sua relação com atividade de doença e fatores prognósticos.

REFERÊNCIAS

- ABE, H. et al. Preparation of recombinant MK-1/Ep-CAM and establishment of an ELISA system for determining soluble MK-1/Ep-CAM levels in sera of cancer patients. **J Immunol Methods**, v. 270, n. 2, p. 227-33, Dec 15 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00332-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00332-0)
- AKITA, H. et al. Ep-CAM is a significant prognostic factor in pancreatic cancer patients by suppressing cell activity. **Oncogene**, v. 30, n. 31, p. 3468-76, Aug 04 2011.
<https://doi.org/10.1038/onc.2011.59>
- AMIRGHOFRAH, Z.; ASIAEE, E.; KAMAZANI, F. M. Soluble CD44 and CD44v6 and prognosis in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Asia Pac J Clin Oncol**, v. 12, n. 3, p. e375-82, Sep 2016. <https://doi.org/10.1111/ajco.12268>
- ARMEANU, S.; CA, M. U.; KLEIN, G. Involvement of E-cadherin in the Development of Erythroid Cells; Subject Heading. **Hematology**, v. 5, n. 4, p. 307-316, 2000.
<https://doi.org/10.1080/10245332.2000.11746524>
- BAEUERLE, P. A.; GIRES, O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. **Br J Cancer**, v. 96, n. 3, p. 417-23, Feb 12 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603494>
- BJORKLUND, C. C. et al. Evidence of a role for CD44 and cell adhesion in mediating resistance to lenalidomide in multiple myeloma: therapeutic implications. **Leukemia**, v. 28, n. 2, p. 373-83, Feb 2014. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.174>
- BOROWITZ, M. J. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5477-85, Jun 15 2008.
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132837>
- BRYAN, R. T. et al. Urinary EpCAM in urothelial bladder cancer patients: characterisation and evaluation of biomarker potential. **Br J Cancer**, v. 110, n. 3, p. 679-85, Feb 04 2014.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2013.744>
- CHRISTIANSEN, J. J.; RAJASEKARAN, A. K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. **Cancer Res**, v. 66, n. 17, p. 8319-26, Sep 01 2006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0410>
- CHRISTOFORI, G. Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. **Embo j**, v. 22, n. 10, p. 2318-23, May 15 2003.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg228>

- CIMINO, A. et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is overexpressed in breast cancer metastases. **Breast Cancer Res Treat**, v. 123, n. 3, p. 701-8, Oct 2010.
<https://doi.org/10.1007/s10549-009-0671-z>
- EL-SHARKAWY, N. et al. CD44 Expression and Soluble CD44 as a Potential Marker of Tumor Load in Pediatric Acute Leukemia. 2017.
- GADDUCCI, A. et al. Preoperative serum E-cadherin assay in patients with ovarian carcinoma. **Anticancer Res**, v. 19, n. 1b, p. 769-72, Jan-Feb 1999.
- GEBAUER, F. et al. Serum EpCAM expression in pancreatic cancer. **Anticancer Res**, v. 34, n. 9, p. 4741-6, Sep 2014.
- GOOZ, M. ADAM-17: the enzyme that does it all. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 45, n. 2, p. 146-69, Apr 2010. <https://doi.org/10.3109/10409231003628015>
- GREAVES, M. Childhood leukaemia. **BMJ: British Medical Journal**, v. 324, n. 7332, p. 283-287, 2002. <https://doi.org/10.1136/bmj.324.7332.283>
- GUO, Y. J. et al. Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. **Cancer Res**, v. 54, n. 2, p. 422-6, Jan 15 1994.
- HAN, S. et al. Is Ep-CAM Expression a Diagnostic and Prognostic Biomarker for Colorectal Cancer? A Systematic Meta-Analysis. **EBioMedicine**, v. 20, p. 61-69, Jun 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.025>
- HARTUNG, G. et al. Adjuvant therapy with edrecolomab versus observation in stage II colon cancer: a multicenter randomized phase III study. **Onkologie**, v. 28, n. 6-7, p. 347-50, Jun 2005.
<https://doi.org/10.1159/000084595>
- HEISS, M. M. et al. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. **Int J Cancer**, v. 127, n. 9, p. 2209-21, Nov 01 2010. <https://doi.org/10.1002/ijc.25423>
- HEMPEL, P. et al. Combination of high-dose chemotherapy and monoclonal antibody in breast-cancer patients: a pilot trial to monitor treatment effects on disseminated tumor cells. **Cytotherapy**, v. 2, n. 4, p. 287-95, 2000. <https://doi.org/10.1080/146532400539224>
- HOFMANN, G. et al. The predictive value of serum soluble E-cadherin levels in breast cancer patients undergoing preoperative systemic chemotherapy. **Clin Biochem**, v. 46, n. 15, p. 1585-9, Oct 2013. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.06.010>
- HORST, E. et al. Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large-cell lymphoma: expression of a lymphocyte homing receptor (CD44), LFA-1 (CD11a/18), and ICAM-1 (CD54). **Leukemia**, v. 4, n. 8, p. 595-9, Aug 1990.

- HU, Q. P. et al. Beyond a tumor suppressor: Soluble E-cadherin promotes the progression of cancer. **Int J Cancer**, v. 138, n. 12, p. 2804-12, Jun 15 2016. <https://doi.org/10.1002/ijc.29982>
- HUNGER, S. P. et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 14, p. 1663-9, May 10 2012. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.8018>
- HUSSAIN, M. et al. A randomized phase 2 trial of gemcitabine/cisplatin with or without cetuximab in patients with advanced urothelial carcinoma. **Cancer**, v. 120, n. 17, p. 2684-93, Sep 01 2014. <https://doi.org/10.1002/cncr.28767>
- IACOPINO, F. et al. Soluble E-cadherin and IL-6 serum levels in patients affected by prostate cancer before and after prostatectomy. **Oncol Rep**, v. 28, n. 1, p. 370-4, Jul 2012.
- JACOBS, J. E.; HASTINGS, C. Isolated extramedullary relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. **Curr Hematol Malig Rep**, v. 5, n. 4, p. 185-91, Oct 2010. <https://doi.org/10.1007/s11899-010-0063-9>
- JIN, M.; XU, S.; AN, Q. Pediatric haematopoiesis and related malignancies. **Oncol Lett**, v. 14, n. 1, p. 10-14, Jul 2017.
- KATAYAMA, M. et al. Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. **Br J Cancer**, v. 69, n. 3, p. 580-5, Mar 1994. <https://doi.org/10.1038/bjc.1994.106>
- KHAN, N. I. et al. Expression of CD44, but not CD44v6, predicts relapse in children with B cell progenitor acute lymphoblastic leukemia lacking adverse or favorable genetics. **Leuk Lymphoma**, v. 49, n. 4, p. 710-8, Apr 2008. <https://doi.org/10.1080/10428190701861660>
- KIMURA, H. et al. Prognostic significance of EpCAM expression in human esophageal cancer. **Int J Oncol**, v. 30, n. 1, p. 171-9, Jan 2007. <https://doi.org/10.3892/ijo.30.1.171>
- KUHN, S. et al. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. **Mol Cancer Res**, v. 5, n. 6, p. 553-67, Jun 2007. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0384>
- KURBACHER, C. M. et al. Outpatient Intraperitoneal Catumaxomab Therapy for Malignant Ascites Related to Advanced Gynecologic Neoplasms. **Oncologist**, v. 20, n. 11, p. 1333-41, Nov 2015. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0076>
- LANGE, T. et al. Importance of altered glycoprotein-bound N- and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells. **Carbohydr Res**, v. 389, p. 39-45, May 07 2014. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.01.010>
- LE BRAS, G. F. et al. CD44 upregulation in E-cadherin-negative esophageal cancers results in cell invasion. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27063, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027063>

LU, G. et al. [Expressions of CD133 and CD44 in gastric adenocarcinoma and their relationship with E-cadherin expression]. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 33, n. 11, p. 1632-7, Nov 2013.

MAETZEL, D. et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 2, p. 162-71, Feb 2009. <https://doi.org/10.1038/ncb1824>

MARTIN, S. et al. Soluble CD44 splice variants in metastasizing human breast cancer. **Int J Cancer**, v. 74, n. 4, p. 443-5, Aug 22 1997.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970822\)74:4<443::AID-IJC14>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970822)74:4<443::AID-IJC14>3.0.CO;2-A)

MAYER, S. et al. Increased soluble CD44 concentrations are associated with larger tumor size and lymph node metastasis in breast cancer patients. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 134, n. 11, p. 1229-35, Nov 2008. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0397-z>

MUNZ, M. et al. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. **Oncogene**, v. 23, n. 34, p. 5748-58, Jul 29 2004.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207610>

NAWROCKI-RABY, B. et al. Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. **Int J Cancer**, v. 105, n. 6, p. 790-5, Jul 20 2003.

<https://doi.org/10.1002/ijc.11168>

NIEMAN, M. T. et al. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. **J Cell Biol**, v. 147, n. 3, p. 631-44, Nov 01 1999.

<https://doi.org/10.1083/jcb.147.3.631>

OKAMOTO, I. et al. Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. **J Cell Biol**, v. 155, n. 5, p. 755-62, Nov 26 2001.

<https://doi.org/10.1083/jcb.200108159>

OKAMOTO, I. et al. CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. **Oncogene**, v. 18, n. 7, p. 1435-46, Feb 18 1999.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202447>

PAGANIN, M. et al. Postinduction minimal residual disease monitoring by polymerase chain reaction in children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 31, p. 3553-8, Nov 01 2014. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.0698>

PATRIARCA, C. et al. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 1, p. 68-75, Feb 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.04.002>

- PUNT, C. J. et al. Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. **Lancet**, v. 360, n. 9334, p. 671-7, Aug 31 2002. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09836-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09836-7)
- REPETTO, O. et al. Levels of soluble E-cadherin in breast, gastric, and colorectal cancers. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 408047, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/408047>
- RIBEIRO, A. S. et al. P-cadherin functional role is dependent on E-cadherin cellular context: a proof of concept using the breast cancer model. **J Pathol**, v. 229, n. 5, p. 705-18, Apr 2013. <https://doi.org/10.1002/path.4143>
- RIVERA, G. K.; RIBEIRO, R. C. Improving treatment of children with acute lymphoblastic leukemia in developing countries through technology sharing, collaboration and partnerships. **Expert Rev Hematol**, v. 7, n. 5, p. 649-57, Oct 2014. <https://doi.org/10.1586/17474086.2014.949233>
- SAARINEN-PIHKALA, U. M. et al. RALLE pilot: response-guided therapy for marrow relapse in acute lymphoblastic leukemia in children. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 34, n. 4, p. 263-70, May 2012. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e3182352da9>
- SALAHSHOR, S. et al. Frequent accumulation of nuclear E-cadherin and alterations in the Wnt signaling pathway in esophageal squamous cell carcinomas. **Mod Pathol**, v. 21, n. 3, p. 271-81, Mar 2008. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800990>
- SCHNELL, U.; CIRULLI, V.; GIEPMANS, B. N. EpCAM: structure and function in health and disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1828, n. 8, p. 1989-2001, Aug 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.018>
- SEEBER, A. et al. Detection of soluble EpCAM (sEpCAM) in malignant ascites predicts poor overall survival in patients treated with catumaxomab. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, p. 25017-23, Sep 22 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4496>
- SEEBER, A. et al. Soluble EpCAM levels in ascites correlate with positive cytology and neutralize catumaxomab activity in vitro. **BMC Cancer**, v. 15, p. 372, May 07 2015. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1371-1>
- SEEBER, A. et al. Predominant expression of truncated EpCAM is associated with a more aggressive phenotype and predicts poor overall survival in colorectal cancer. **Int J Cancer**, v. 139, n. 3, p. 657-63, Aug 01 2016. <https://doi.org/10.1002/ijc.30099>
- SENBANJO, L. T.; CHELLAIAH, M. A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. **Front Cell Dev Biol**, v. 5, p. 18, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>

- SOYAMA, A. et al. Significance of the serum level of soluble E-cadherin in patients with HCC. **Hepatogastroenterology**, v. 55, n. 85, p. 1390-3, Jul-Aug 2008.
- SPIZZO, G. et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. **J Clin Pathol**, v. 64, n. 5, p. 415-20, May 2011.
<https://doi.org/10.1136/jcp.2011.090274>
- STAUDER, R. et al. Different CD44 splicing patterns define prognostic subgroups in multiple myeloma. **Blood**, v. 88, n. 8, p. 3101-8, Oct 15 1996.
- STEPAN, A. E. et al. E-cadherin/CD44 immunophenotype in the epithelial-mesenchymal transition of bladder urothelial carcinomas. **Rom J Morphol Embryol**, v. 56, n. 1, p. 85-91, 2015.
- SYRIGOS, K. N. et al. Circulating soluble E-cadherin levels are of prognostic significance in patients with multiple myeloma. **Anticancer Res**, v. 24, n. 3b, p. 2027-31, May-Jun 2004.
- TACYILDIZ, N. et al. Serum levels and differential expression of CD44 in childhood leukemia and malignant lymphoma: correlation with prognostic criteria and survival. **Pediatr Int**, v. 43, n. 4, p. 354-60, Aug 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1442-200X.2001.01415.x>
- TAKEUCHI, M. et al. Serum soluble CD44 in pediatric patients with acute leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 21, n. 5, p. 384-8, Sep-Oct 1999.
<https://doi.org/10.1097/00043426-199909000-00009>
- TAKUBO, T. et al. Clinical significance of serum E-cadherin levels in patients with haematological malignancies. **Haematologia (Budap)**, v. 31, n. 4, p. 319-25, 2002.
<https://doi.org/10.1163/15685590160141341>
- TAS, F.; KARABULUT, S.; DURANYILDIZ, D. Clinical significance of serum epithelial cell adhesion molecule (EPCAM) levels in patients with lung cancer. **Mol Cell Biochem**, v. 396, n. 1-2, p. 307-12, Nov 2014. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2167-3>
- TAS, F. et al. Clinical significance of serum epithelial cell adhesion molecule (EPCAM) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) levels in patients with epithelial ovarian cancer. **Tumour Biol**, v. 35, n. 4, p. 3095-102, Apr 2014. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1401-z>
- THOMAS, X.; PAVAN, L.; LE, Q. H. [Adult acute lymphoblastic leukemia with central nervous system involvement: an overview]. **Bull Cancer**, v. 95, n. 7, p. 707-15, Jul-Aug 2008.
- THORNE, R. F.; LEGG, J. W.; ISACKE, C. M. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 3, p. 373-80, Jan 26 2004.

- TREBAK, M. et al. Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. **J Biol Chem**, v. 276, n. 3, p. 2299-309, Jan 19 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004770200>
- VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-51, Jul 30 2009. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209262>
- WIJNHOFEN, B. P.; PIGNATELLI, M. E-cadherin-catenin: more than a "sticky" molecular complex. **Lancet**, v. 354, n. 9176, p. 356-7, Jul 31 1999. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)90055-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)90055-7)
- WILLIAMS, K. et al. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 238, n. 3, p. 324-38, Mar 2013. <https://doi.org/10.1177/1535370213480714>
- XING, X. et al. The prognostic value of E-cadherin in gastric cancer: a meta-analysis. **Int J Cancer**, v. 132, n. 11, p. 2589-96, Jun 01 2013. <https://doi.org/10.1002/ijc.27947>
- XU, X. L. et al. The impact of E-cadherin expression on the prognosis of esophageal cancer: a meta-analysis. **Dis Esophagus**, v. 27, n. 1, p. 79-86, Jan 2014. <https://doi.org/10.1111/dote.12024>
- XU, Y.; YU, Q. E-cadherin negatively regulates CD44-hyaluronan interaction and CD44-mediated tumor invasion and branching morphogenesis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 10, p. 8661-8, Mar 07 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208181200>
- ZEILSTRA, J. et al. Stem cell CD44v isoforms promote intestinal cancer formation in Apc(min) mice downstream of Wnt signaling. **Oncogene**, v. 33, n. 5, p. 665-70, Jan 30 2014. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.611>
- ZHENG, X. et al. EpCAM Inhibition Sensitizes Chemoresistant Leukemia to Immune Surveillance. **Cancer Res**, v. 77, n. 2, p. 482-493, Jan 15 2017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0842>

Anexos

ANEXO A – MODELO DE INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Número de identificação: _____ Data da coleta: ____/____/____

Data de nascimento: ____/____/____ sexo: () M () F

Data do diagnóstico: ____/____/____ () não se aplica

Data da remissão: ____/____/____ () não se aplica

Momento atual da doença:

() Não se aplica

() Diagnóstico

() Em tratamento

() Após término do tratamento

() Recidiva

Data do término do tratamento: ____/____/____ () não se aplica

Acometimento de SNC ao diagnóstico: () não () sim () não se aplica

Se grupo controle:

Infecção: () não () sim . Qual(is): _____

Neoplasia: () não () sim. Qual(is): _____

Doença crônica: () não () sim. Qual(is): _____

Alergia: () não () sim. Qual(is): _____

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) senhor(a), o(a) menor, pelo qual o(a) senhor(a) é responsável, está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada **“Avaliação da relação de E-caderina, N-caderina e CD44 com a população de células tronco leucêmicas como marcadores prognósticos em crianças com Leucemias Agudas”**, sob a responsabilidade dos pesquisadores **Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva e Iêda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca**. A razão da participação do (a) menor é que ele (a) é um (a) paciente com diagnóstico de Leucemia Aguda ou voluntário (a) saudável (grupo controle).

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender **os níveis de algumas substâncias no sangue das crianças com Leucemia Aguda que podem estar relacionadas com a evolução favorável ou desfavorável da doença**.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelo pesquisador **Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva** ou por qualquer outro participante desta pesquisa, no momento do diagnóstico de leucemia aguda ou em consulta ambulatorial no Hospital do Câncer (pacientes) ou no ambulatório de pediatria do Hospital de Clínicas da UFU (voluntários). Os outros participantes são: Iêda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca, Anna Beatriz Costa Neves do Amaral, Carlos Eduardo Sá Araújo, Livia de Paula Peres, Laysa Oliveira Santos Dias, Danielle Pereira Silva e Felipe Cordero da Luz.

Na participação do(a) menor, ele(a) **serão coletados 6ml do seu sangue no mesmo momento da coleta de outros exames relacionados com o diagnóstico da doença ou exames da rotina de seguimento no ambulatório de oncologia pediátrica (pacientes) ou no ambulatório de pediatria (controles), para evitar uma punção adicional, além de coleta de informações do prontuário do Hospital do Câncer (pacientes) ou do Hospital de Clínicas (controles). Serão também coletados 4ml de seu aspirado medular (pacientes) durante coleta já programada ao diagnóstico da doença ou no caso de recidiva da mesma. O sangue e, em alguns casos, o aspirado medular serão estudados para dosagem de algumas substâncias, cujo nível pode estar relacionado com evolução favorável ou desfavorável das crianças com Leucemia Aguda. Todas as informações coletadas durante o estudo serão mantidas de forma confidencial, o que permitirá que a identidade do(a) menor não seja revelada. Os resultados serão analisados individualmente, e os mesmos serão mantidos com o grupo de pesquisa**. Portanto, em nenhum momento o(a) menor será identificado(a). Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

O(A) menor não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Os riscos, da participação do(a) menor na pesquisa, consistem em **formação de hema-**

toma ou flebite no local que foi retirado o sangue, e/ou dor no local em que foi retirado o aspirado medular (pacientes em diagnóstico ou recidiva da doença), os quais serão minimizados por coleta realizada por profissionais qualificados e experientes e, caso ocorram, serão tratados e acompanhados pela equipe médica e de enfermagem do Hospital do Câncer (pacientes) e Hospital de Clínicas (controles). Embora as análises das amostras de sangue possam não beneficiá-lo diretamente, os resultados poderão futuramente ajudar outras crianças, com diagnóstico de Leucemia Aguda.

O(A) menor é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o(a) senhor(a), responsável legal pelo(a) menor.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, o(a) senhor(a), responsável legal pelo(a) menor, poderá entrar em contato com: **Dr. Marcelo José Barbosa Silva no bloco 4C, Laboratório de Imunologia, no campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia. Fone: 3218 – 2058. Também, a Dra Ieda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca nos seguintes telefones (34) 3291-6100 ou (34) 3291-6174, no Hospital do Câncer, campus Umuarama.** Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa – Centro Universitário do Triângulo: Av. Nicomedes Alves dos Santos, nº 4545, bloco E, 3º Piso – Uberlândia –MG, CEP: 38411-106; fone: 34-4009-9039

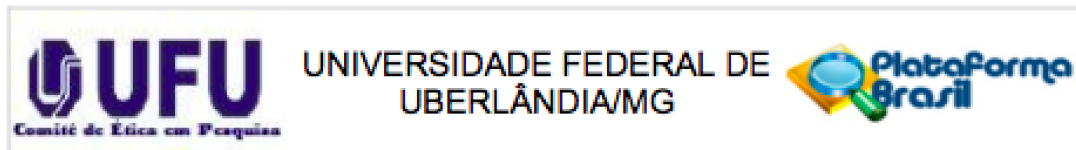
Uberlândia, dede

Assinatura dos pesquisadores

Eu, responsável legal pelo(a) menor _____, consento na sua participação no projeto citado acima, caso ele(a) deseje, após ter sido devidamente esclarecido.

Responsável pelo(a) menor participante da pesquisa

ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DOS MARCADORES E-CADERINA, N-CADERINA E CD44 COM AS CÉLULAS TRONCO LEUCÊMICAS COMO MARCADORES PROGNÓSTICOS EM CRIANÇAS COM LEUCEMIAS AGUDAS

Pesquisador: Ieda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 63843116.9.0000.5152

Instituição Proponente: HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Patrocinador Principal: ASSOCIACAO MEMBROS GR L V PRO E CONST AMP C M HOS C UDI

DADOS DO PARECER

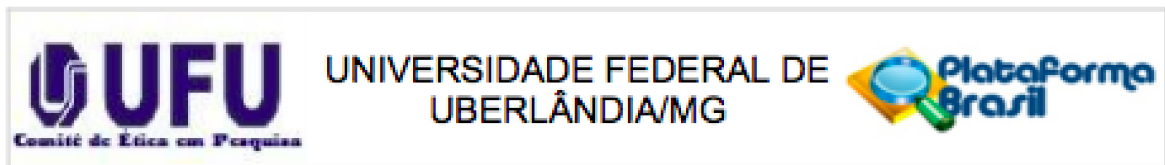
Número do Parecer: 1.936.446

Apresentação do Projeto:

Segundo os pesquisadores o projeto tentará estabelecer uma relação entre proteínas séricas dos pacientes com subpopulações de células leucêmicas iniciadoras e resistentes à quimioterapia, causadoras de grande parte das recidivas. Apesar de estudos anteriores mostrarem que as proteínas séricas sE-caderina e sCD44 são marcadores de mau prognóstico na leucemia e que algumas subpopulações, como as células estaminais, são causadoras de recidivas, esses estudos não fazem a correlação entre esses fatores séricos e as populações de células leucêmicas circulantes.

Serão recrutados todos os pacientes na faixa etária de 0 a 11 anos e 11 meses com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda ou Leucemia Mielóide Aguda no período de agosto de 2010 a julho de 2017, acompanhados no setor de Oncologia do HC-UFU. Serão coletados 6ml (3 tubos com 2ml) de sangue periférico dos 84 pacientes recrutados no momento da coleta de outros exames relacionados com o diagnóstico da doença ou exames de rotina de seguimento no ambulatório de Oncologia Pediátrica, e será analisada a correlação das variáveis idade e fase do tratamento na qual se encontram os pacientes no momento da coleta (antes do tratamento, em tratamento ou período de tempo após tratamento) com os níveis séricos das proteínas e fenotipagem das linhagens de células tronco leucêmicas circulantes, através do modelo de regressão linear

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 1.936.446

múltipla. Para comparação dos resultados em sangue periférico e medula óssea, serão coletados 4ml (2 tubos com 2ml) durante coleta de aspirado medular dos pacientes ao diagnóstico e/ou recidiva da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores definem :

"Objetivo Geral

Correlacionar os níveis de marcadores solúveis (sE-caderina, sN-caderina e sCD44) com as populações de blastos (estaminais, precursoras, progenitoras) em leucemias agudas em crianças, como ferramenta para acompanhar o tratamento e a evolução da doença no setor de Oncologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Objetivos específicos

- Avaliar o número de células tronco leucêmicas circulantes antes, durante e após o tratamento da Leucemia Linfóide Aguda e Leucemia Mielóide Aguda.
- Quantificar os marcadores solúveis E-caderina, CD44 e N-caderina no soro de crianças com Leucemia Linfóide Aguda e Leucemia Mielóide Aguda antes, durante e após o tratamento.
- Fenotipar linhagens mais diferenciadas (precursoras, progenitoras e outras subpopulações) e correlacionar com os níveis séricos das proteínas solúveis E-caderina, CD44 e N-caderina."

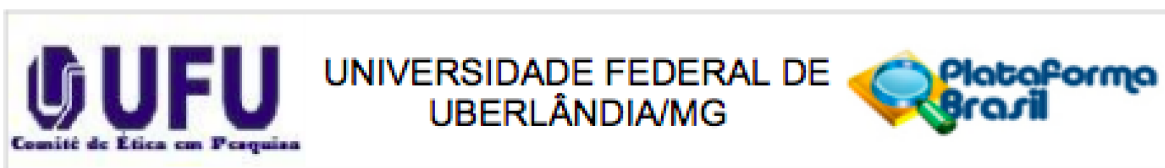
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

"Riscos:

A pesquisa apresenta risco mínimo já que emprega a coleta de sangue periférico e, em alguns casos medula óssea, no momento da coleta de outros exames, sem punção adicional, mantendo os riscos inerentes à coleta periférica, como hematoma e flebite no local da punção, e/ ou dor no local da punção medular, os quais serão minimizados por coleta realizada por profissionais qualificados e experientes e, caso ocorram, serão tratados e acompanhados pela equipe médica e de enfermagem do Hospital do Câncer (pacientes) e Hospital de Clínicas (controles); além de coleta de informações de forma indireta (prontuário). Entretanto, pode haver identificação acidental do participante da pesquisa, o que será minimizado por acesso restrito aos dados do paciente, apenas do pesquisador principal e pesquisadores assistentes.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 1.938.448

Benefícios:

Com a confirmação da análise proposta no estudo será possível direcionar e monitorizar o tratamento das crianças com Leucemias Agudas baseado nos níveis dessas proteínas séricas, portanto por meios menos invasivos e com resultados mais rápidos do que o utilizado atualmente por aspirado medular.”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os participantes serão divididos em 3 grupos.

Para comparação do nível de cada proteína sérica entre os grupos de crianças saudáveis, crianças com Leucemia Linfóide Aguda e crianças com Leucemia Mielóide Aguda, serão recrutados, através de sorteio aleatório dentro da amostra total de 84 pacientes, 34 pacientes com Leucemia Linfóide Aguda (Grupo 1) e 34 pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (Grupo 2) e serão também recrutados aleatoriamente 34 pacientes saudáveis na mesma faixa etária dos pacientes sorteados nos dois primeiros grupos, em seguimento no ambulatório de Pediatria Geral do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, para grupo controle (Grupo 3). Serão coletados 6ml (3 tubos com 2ml) de sangue periférico desses pacientes do grupo controle no momento da coleta de outros exames de rotina, para evitar punção adicional.

Informações desses pacientes serão coletadas dos seus respectivos prontuários do Hospital do Câncer (pacientes com diagnóstico de leucemia) ou do Hospital de Clínicas (pacientes do grupo controle), conforme modelo de instrumento de coleta de dados (Anexo 1). Todas as informações coletadas durante o estudo serão mantidas de forma confidencial pelos pesquisadores.

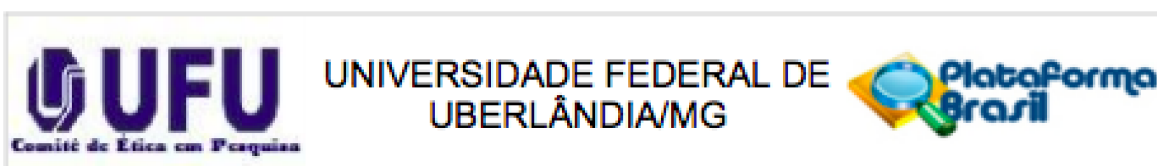
Os responsáveis legais pelos menores envolvidos no estudo receberão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), para suas autorizações da participação do menor, no momento do diagnóstico da leucemia ou em consulta ambulatorial no Hospital do Câncer (pacientes com leucemia) ou no ambulatório de Pediatria Geral do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (pacientes do grupo controle).

Para este estudo os pesquisadores definiram como critério de inclusão exclusão:

Critérios de inclusão

Serão incluídos todos os pacientes, na faixa etária de 0 a 12 anos e 11 meses com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda ou Leucemia Mielóide Aguda no período de agosto de 2010 a julho de 2017, os quais os pais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; e pacientes saudáveis na mesma faixa etária em seguimento no ambulatório de Pediatria Geral do Hospital de

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 1.938.448

Benefícios:

Com a confirmação da análise proposta no estudo será possível direcionar e monitorizar o tratamento das crianças com Leucemias Agudas baseado nos níveis dessas proteínas séricas, portanto por meios menos invasivos e com resultados mais rápidos do que o utilizado atualmente por aspirado medular.”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os participantes serão divididos em 3 grupos.

Para comparação do nível de cada proteína sérica entre os grupos de crianças saudáveis, crianças com Leucemia Linfóide Aguda e crianças com Leucemia Mielóide Aguda, serão recrutados, através de sorteio aleatório dentro da amostra total de 84 pacientes, 34 pacientes com Leucemia Linfóide Aguda (Grupo 1) e 34 pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (Grupo 2) e serão também recrutados aleatoriamente 34 pacientes saudáveis na mesma faixa etária dos pacientes sorteados nos dois primeiros grupos, em seguimento no ambulatório de Pediatria Geral do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, para grupo controle (Grupo 3). Serão coletados 6ml (3 tubos com 2ml) de sangue periférico desses pacientes do grupo controle no momento da coleta de outros exames de rotina, para evitar punção adicional.

Informações desses pacientes serão coletadas dos seus respectivos prontuários do Hospital do Câncer (pacientes com diagnóstico de leucemia) ou do Hospital de Clínicas (pacientes do grupo controle), conforme modelo de instrumento de coleta de dados (Anexo 1). Todas as informações coletadas durante o estudo serão mantidas de forma confidencial pelos pesquisadores.

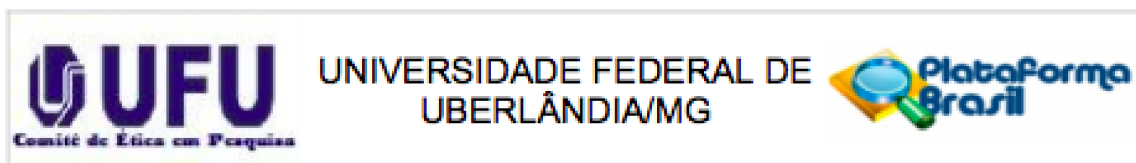
Os responsáveis legais pelos menores envolvidos no estudo receberão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), para suas autorizações da participação do menor, no momento do diagnóstico da leucemia ou em consulta ambulatorial no Hospital do Câncer (pacientes com leucemia) ou no ambulatório de Pediatria Geral do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (pacientes do grupo controle).

Para este estudo os pesquisadores definiram como critério de inclusão exclusão:

Critérios de inclusão

Serão incluídos todos os pacientes, na faixa etária de 0 a 12 anos e 11 meses com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda ou Leucemia Mielóide Aguda no período de agosto de 2010 a julho de 2017, os quais os pais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; e pacientes saudáveis na mesma faixa etária em seguimento no ambulatório de Pediatria Geral do Hospital de

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 1.936.446

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo Participante da pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O Participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante da pesquisa ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--------------------------------|--|------------------------|-------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_805139.pdf | 18/01/2017 10:58:39 | | Aceito |

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 1.936.446

| | | | | |
|--|----------------|------------------------|---|--------|
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto.docx | 18/01/2017 10:58:23 | Anna Beatriz Costa Neves do Amaral | Aceito |
| Outros | Ficha.doc | 18/01/2017 10:56:02 | Anna Beatriz Costa Neves do Amaral | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.doc | 18/01/2017 10:54:38 | Anna Beatriz Costa Neves do Amaral | Aceito |
| Outros | Lattes.doc | 26/10/2016 11:59:58 | Ieda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | executores.pdf | 26/10/2016 11:59:07 | Ieda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | ICBIM.pdf | 26/10/2016 11:58:39 | Ieda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | anuencia.pdf | 26/10/2016 11:58:20 | Ieda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca | Aceito |
| Folha de Rosto | rosto.pdf | 26/10/2016 11:54:14 | Ieda Cristina Cunha Ferreira e Fonseca | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 21 de Fevereiro de 2017

Assinado por:

Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br