



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM GENÉTICA**

**A ANGIOGÊNESE NAS LEUCEMIAS:
UMA REVISÃO**

LUCIANA CARDOSO MARINHO

**Goiânia - GO
Agosto de 2016**



PUC GOIÁS

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM GENÉTICA**

**A ANGIOGÊNESE NAS LEUCEMIAS:
UMA REVISÃO**

LUCIANA CARDOSO MARINHO

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação – Nível mestrado em
Genética, da Pró - Reitoria de
Pesquisa e Pós- Graduação da
Pontifícia Universidade Católica
de Goiás para obtenção do título
de Mestre.**

Goiânia - GO

Agosto de 2016

M338a Marinho, Luciana Cardoso
 A angiogênese nas leucemias[manuscrito]: uma revisão/
Luciana Cardoso Marinho.-- 2016.
 69 f.; 30 cm

 Texto em Português com resumo em inglês
 Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade
Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto
Sensu em Genética, Goiânia, 2016
 Inclui referências

 1. Leucemia. 2. Neovascularização. 3. Inibidores de
neovascularização. I.Reis, Paulo Roberto de Melo.
II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 616.155.392(043)



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 124/2016

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: LUCIANA CARDOSO MARINHO

DEFENDIDA EM 10 DE AGOSTO DE 2016 E APROVADA COM CONCEITO B

O título foi alterado não () sim _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis
PUC Goiás (Presidente)

Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura
PUC Goiás

Prof. Dr. Rui de Sousa Lino Junior
Membro externo(UFG)

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir esta oportunidade ímpar.

A minha família por ter me auxiliado nas dificuldades ocorridas durante o curso.

Ao professor e orientador Paulo Roberto de Melo Reis pelas instruções, apoio e determinação durante a realização deste trabalho.

A todos os alunos da PUC e de outras instituições que cederam um tempo para contribuir na produção deste trabalho.

“Deus nunca perturba a alegria dos seus filhos se não for para lhes preparar uma mais certa e maior.” (Alessandro Manzoni)

RESUMO

As últimas pesquisas demonstram que os fatores angiogênicos desempenham um importante papel na modulação do processo da angiogênese tumoral. Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo a análise da influência deste processo no desenvolvimento de leucemias. Foi realizada uma revisão sistemática com base em artigos científicos que investigaram a interferência de fatores angiogênicos em casos de leucemias em estágios iniciais e avançados. As principais evidências indicam que estes fatores, em especial o VEGF, são expressos de forma intensa em células malignas e podem gerar, por exemplo, uma malignidade hematológica. A regulação de expressão de determinados genes também está envolvida na proliferação anormal, na diferenciação e apoptose destas células. A expressão, função e o mecanismo de regulação dos fatores angiogênicos foram elucidados gradualmente nesta revisão e como conclusão, salienta-se que alguns deles apresentam relação com o desenvolvimento e prognóstico de leucemias, além de fornecer possíveis estratégias para o tratamento de pacientes com leucemia.

Palavras – chave: Fatores angiogênicos, Leucemias, Revisão.

ABSTRACT

The latest research has shown that the angiogenic factors play an important role in the modulation of tumor angiogenesis process. Thus, this study aimed to analyze the influence of this process on the development of leukemias. A systematic review based on scientific articles that investigated the interference of angiogenic factors in cases of leukemia early and advanced stages was performed. The major evidence indicates that these factors, in special VEGF, are expressed intensely in malignant cells and may generate, for example, a hematologic malignancy. The regulation of expression of certain genes is also involved in abnormal proliferation, differentiation and apoptosis of these cells. The expression, function and regulation mechanism of angiogenic factors have been gradually elucidated in this review and in conclusion, it is noted that some of them have relation to the development and leukemias prognosis, and provide potential strategies for the treatment of patients with leukemia.

Key-words: Angiogenic factors, Leukemias, Review.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mielograma de paciente com LMA	8
Figura 2 - Principais alterações citogenéticas associadas com o bom e mau prognóstico no cariótipo da Leucemia Mielóide Aguda	9
Figura 3 - Distribuição de anormalidades cromossômicas em pacientes com LMA	10
Figura 4 - Modelo esquemático da translocação que gera o Cromossomo Filadélfia	12
Figura 5 - Incidência relativa das mutações no domínio da tirosina quinase associadas à resistência clínica ao Imatinibe	15
Figura 6 - Frequência de subtipos citogenéticos de LLA pediátrica	20
Figura 7 - Esfregaço de sangue periférico de um paciente com leucemia linfocítica crônica	22
Figura 8 - Envolvimento de ncRNAs em leucemias	26
Figura 9 - Esquematização do processo angiogênico	27
Figura 10 - Exemplo da ligação entre as moléculas de VEGF e seus receptores	30
Figura 11 - Esquematização do processo de angiogênese tumoral	31
Figura 12 - O papel do VEGF na progressão da leucemia	39
Figura 13 - Modelo esquemático da participação de HIF-1 na condução de diferentes processos sob condições anaeróbicas	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das Leucemias Mielóides Agudas segundo atualização OMS, 2016.	5
Tabela 2 - Classificação das Leucemias agudas de linhagem ambígua, segundo atualização OMS, 2016	6
Tabela 3 - Classificação prognóstica segundo anormalidades citogenéticas e moleculares	9
Tabela 4 - Classificação das Neoplasias de células linfóides precursoras , segundo atualização OMS, 2016	18
Tabela 5 - Estadiamento da LLC típica	23
Tabela 6 - Principais fatores angiogênico envolvidos nas leucemias.....	36

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

aFGB	Fator ácido de Crescimento de Fibroblastos
ANG	Angiopietina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Ataxia Telangiectasia
ATRA	Ácido All-Trans-Retinóico
bFGB	Fator básico de crescimento de fibroblastos
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
CHEs	Células Histaminais Hematopoiéticas
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CPEs	Células Progenitoras Endoteliais
ET	Endotelina
EFG	Fator de Crescimento Epidérmico
ERK	Quinase controlada pela Sinalização Extracelular
FAB	Franco - Americana - Britânica
FDA	Food and Drug Administration
FGFb	Fator de Crescimento de Fibroblasto básico
FISH	Hibridização Fluorescente In Situ
FPRL1	Receptor 1 de Formil Peptideo
HGF	Fator de Crescimento do Hepatocito
HIF1	Fator Indutor de Hipóxia
HDAC	Histona - Desacetilase
IGF	Fator de Crescimento semelhante à Insulina
IL	Interleucina
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MiRNA	Micro RNA
MMP	Metaloproteinase de Matriz
NF-Kb	Fator Nuclear <i>Kappa b</i>

NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PIGF	Fator de Crescimento Placentário
PI3K	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato-3-quinase
RUC	Região Ultraconservada
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TAM	Macrófagos Associados a Tumores
TKR	Tirosina Kinase
TGBb	Fator de Crescimento Transformante b
TGFa	Fator de Crescimento Transformante a
TIMP	Tecido de Metaloproteinases
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VPA	Ácido Valpróico

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIACÕES.....	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Leucemias.....	3
2.1.2. Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	4
2.1.3. Leucemia Mielóide Crônica (LMC)	11
2.1.4. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	16
2.1.5. Leucemia Linfocítica Crônica (LLC)	21
2.2 O processo de Angiogênese	26
2.2.1. Angiogênese tumoral	31
3 OBJETIVO.....	34
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 METODOLOGIA.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Fatores angiogênicos no desenvolvimento em leucemias	36
5.1.1 O papel do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) em leucemias	37

5.1.2. Gene <i>C-myc</i> : um importante fator angiogênico envolvido nas leucemias	42
5.1.3. Envolvimento de metaloproteinases de matriz (MMPs) em malignidades hematológicas	43
5.1.4. Relações entre VEGF e HIF-1 na malignidade hematológica	45
5.1.5. Relação entre o Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) e leucemias	48
6 CONCLUSÃO.....	50
7 REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

Os estudos sobre a angiogênese tumoral, indução ou a interrupção do processo angiogênico se tornou uma característica na investigação do câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2000). A angiogênese é um fenômeno essencial para o crescimento e sobrevivência de tumores sólidos. Sua ação ocorre através da indução da proliferação de vasos sanguíneos que penetram no tecido canceroso fornecendo a este, nutrientes e oxigênio. O processo angiogênico é um requisito não apenas para o crescimento contínuo do tumor, como também para a metástase (FOLKMAN, 2004; CARMELIET, 2005).

Há um importante destaque na influência do processo angiogênico sobre as leucemias as quais são consideradas doenças progressivas, neoplásicas malignas que acometem o sistema hematopoiético do ser humano e são consideradas na atualidade o 11º tipo mais comum de câncer em todo o mundo (HELMAN *et al.*, 2011; INCA, 2014; ZHENG *et al.*, 2016).

Praticamente todos os tipos de leucemia apresentam fatores prognósticos determinados pelo uso da citogenética; mais especificamente, por mutações adquiridas que, uma vez detectadas, tornam possível a definição do tratamento apropriado para um dado paciente (MROZEK *et al.*, 2004, 2007).

Uma série de fatores de indução da angiogênese tem sido investigada em casos de leucemias, tais como o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Transformante (FGF), Fator de Crescimento do Hepatócito (HGF), Fator de Crescimento de Fibroblasto (TGF), Fator de Necrose Tumoral (TNF), angiopoietina (Ang), fator de indução de hipóxia 1 (HIF-1), Metaloproteinase de Matriz (MMPs), o gene *c-myc*, a endotelina (ET), integrinas, Fator de Crescimento da Placenta (PIGF), dentre outros (RIBATTI, 2009; SONG *et al.*, 2012; SPENCER *et al.*, 2014).

Alguns estudos têm demonstrado que o processo angiogênico é regulado pelo equilíbrio de citocinas angiogênicas e anti-angiogênicas e este fenômeno pode ser induzido por intermédio de células leucêmicas na medula óssea. As pesquisas apontam que a leucemia apresente uma possível dependência da angiogênese, o que aumenta a probabilidade no uso de drogas anti-angiogênicas no tratamento desta doença (SPENCER *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2016).

Um importante fator envolvido na angiogênese tumoral é o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) o qual aumenta significativamente a permeabilidade vascular. Muitas linhagens celulares de leucemia e células primárias podem sintetizá-lo e secretá-lo, fato este que pode causar uma modulação do comportamento biológico maligno de células leucêmicas (DIAS *et al.*, 2000; FRAGOSO *et al.*, 2007).

O conhecimento dos fatores angiogênicos, como VEGF, MMPs e FGF, tem demonstrado que estes atuam não apenas na iniciação, como na progressão, metástase e apoptose de células de tumores sólidos e em leucemias.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leucemias

Em 1960, Peter C. Nowell e David Hungerford descreveram uma translocação dos cromossomos 9 e 22 (cromossomo Filadélfia). Esta translocação foi a primeira descrição de um causador de câncer e foi um elemento importante no desenvolvimento da droga imatinibe, a qual é utilizada no tratamento de leucemias (NOWELL & HUNGERFORD, 1960; HAMERSCHLAK, 2008).

Desde então, a genética passou a ter uma importância crescente no diagnóstico, prognóstico e tratamento da leucemia. Praticamente todos os tipos de leucemia têm fatores prognósticos que são determinados pela citogenética; mais especificamente, por mutações adquiridas que, uma vez detectadas, tornam possível a definição do tratamento apropriado para um dado paciente (MROZEK *et al.*, 2004, 2007).

As leucemias são doenças progressivas, neoplásicas malignas que acometem o sistema hematopoiético do homem e são consideradas na atualidade o 11º tipo mais comum de câncer em todo o mundo (CANCER FACTS & FIGURES, 2016). Na leucemia há perda do controle na proliferação de células precursoras da linhagem mieloide e/ou linfóide na medula óssea e no sangue periférico. As células neoplásicas malignas podem acometer toda a medula óssea, podendo impedir a produção de células normais do sangue, levando a quadros variáveis de sangramento, infecção e anemia (HELMAN *et al.*, 2011; POKHAREL, 2012).

Existem diferentes tipos de leucemia, e estas podem ser classificadas na forma “aguda” e “crônica”. Esta determinação baseia-se na fase de diferenciação celular, ou seja, no momento de origem da neoplasia. As leucemias agudas são oriundas de células progenitoras iniciais na medula óssea, caracterizadas por células neoplásicas imaturas (“blastos”); as crônicas também são oriundas de uma célula clonal precoce, “defeituosa”, porém estas possuem a capacidade de se diferenciar em células que se assemelham a células maduras (fase final de maturação), como vistas em sangue periférico (JAMIESON *et al.*, 2004).

A distinção entre formas agudas e crônicas pode ser realizada através da avaliação morfológica no sangue periférico e ou medula óssea. A sub-classificação é

realizada através da avaliação do perfil antigênico da célula (nuclear e/ou citoplasmático), definido assim a linhagem e estágio de diferenciação ou maturidade celular apresentada (O' DONELL *et al.*, 2014)..

Em relação a definição de linhagem celular, cada individuo possui as linhagens Mielóide e Linfóide, sendo esta última subclassificada em linhagem B, T ou NK (Natural Killer). A classificação é realizada através da citometria de fluxo de células do sangue periférico ou medula ossea, como também através da imunohistoquímica em tecido biológico (ROSS *et al.*, 2011)..

A distinção entre os vários subtipos de leucemia se torna de grande importância em decorrência dos diferentes regimes de tratamento disponível como também pela avaliação do prognóstico da doença em questão (GRIMWADE *et al.*, 2016).

Até a década de 1970 as Leucemias Agudas eram divididas em leucemias linfóides, não linfóides e monocíticas. Em 1976 foi lançada uma nova classificação Franco-americana-britânica (FAB) baseada na morfologia dos blastos e nas reações enzimáticas-citoquímicas. Na década de 90 surgiu uma classificação subsidiada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e atualizada em 2008, no qual as doenças foram estratificadas em diferentes grupos, definindo-as conforme a combinação morfológica, imunofenotípica, aspectos genéticos-moleculares, e síndromes clínicas (OMS, 2014).

Recentemente, julho de 2016, foi apresentada uma nova atualização relativa as Neoplasias Mieloproliferativas e Leucemias Agudas, visto que a incorporação de características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas, citogenética e da genética molecular, são de grande relevância para a diferenciação das patologias (ARBER *et al.*, 2016).

2.1.2. Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é a mais comum entre os adultos, representando cerca de até 80% dos casos (YAMAMOTO & GOODMAN, 2008). Esta forma é caracterizada pelo proliferação descontrolada de células indiferenciadas com características mielóides. Na maioria dos casos não há uma causa evidente para sua ocorrência. No entanto, em alguns pacientes, a doença pode estar relacionada com a exposição prévia ao benzeno, radiação ionizante ou

exposição à agentes quimioterápicos. Também existe uma correlação entre casos da anemia de Fanconi e síndrome de Down ao surgimento da LMA (CASHEN *et al.*, 2010).

Conforme as anormalidades citogenéticas, a OMS subdividiu a LMA, em 2008, em diversas entidades genético-clínicopatológicas (BRASIL, 2014).

A nova atualização (2016) relativa as Leucemias Mieloides Agudas segue abaixo objetivando atualização da quarta edição da OMS (2008) com a incorporação de novos conhecimentos (ARBER *et al.*, 2016).

Tabela 1. Classificação das Leucemias Mielóides Agudas segundo atualização OMS, 2016.

Leucemia Mielóide Aguda e Neoplasias de Células Precursoras Relacionadas

- LMA com anormalidades genéticas recorrentes

LMA com t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1

LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11

LPA com PML-RARA

LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A

LMA com t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214

LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM

LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1

Entidade provisória: LMA com BCR-ABL1

LMA com mutação NPM1

LMA com mutação bialélica de CEBPA

Entidade provisória: LMA com mutação RUNX1

- LMA com alterações mielodisplásicas relacionadas

- Neoplasia Mieloides relacionadas com terapia

- LMA não classificáveis

LMA com mínima diferenciação

LMA sem maturação

LMA com maturação

Leucemia Mielomonocítica Aguda

Leucemia Monoblástica e Leucemia Monocítica Aguda

Leucemia Eritroide Pura

Leucemia Megacarioblástica Aguda

Leucemia Basofílica Aguda

Panmielose aguda com mielofibrose

- Sarcoma mieloide

- Proliferações mieloides relacionadas com síndrome de Down

Mielopoesse anormal transitória (MAT)

Leucemia mielóide associada à síndrome de Down

- Neoplasias de células dendríticas plasmocitóides blásticas

Cerca de menos de 5% das Leucemias Agudas não apresentam evidências de diferenciação para uma linhagem específica e expressam antígenos associados a mais de uma linhagem. Estas são denominadas leucemias agudas de linhagem ambíguas.

A Leucemia Aguda indiferenciada é uma classificação utilizada quando não existem marcadores linhagem - específicos e os blastos expressam antígenos associados à imaturidade celular. As Leucemias Agudas anteriormente chamadas de bifenótípicas ou bilineares são designadas agora como Leucemia Aguda de Fenótipo Misto (LAFM) (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação das Leucemias agudas de linhagem ambígua, segundo atualização OMS, 2016

Leucemias agudas de linhagem ambígua

- Leucemia Aguda Indiferenciada
- Leucemia Aguda de Fenótipo Misto com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL 1
- Leucemia Aguda de Fenótipo Misto com t(v;11q23); rearranjo MLL
- Leucemia Aguda de Fenótipo Misto, B/mieloide, NOS
- Leucemia Aguda de Fenótipo Misto, T/mieloide, NOS

Esta nova versão lançada em 2016 se diferencia pela incorporação principalmente de novas informações genéticas. Na subclassificação de LMA com anomalias genéticas recorrentes, onze subtipos são adicionalmente delineados de acordo com a alteração cromossômica apresentada. As entidades: LMA com mutação *NPM1* e LMA com mutação *CEBPA* foram introduzidas como parte da revisão de 2008, já as LMA com BCR-ABL1 e LMA com mutação *RUNX1* foram introduzidas como parte da revisão de 2016.

A Incidência de novos casos de LMA no Brasil é de 5,20 em homens e 4,24 em por 100.000 indivíduos. Uma variedade celular pode ser observada no sangue e na medula óssea de pacientes com LMA. Se é possível, na maioria dos casos de Leucemias Agudas, se chegar a um possível diagnóstico após avaliação morfológica do esfregaço de medula óssea, aplicando-se a sub-classificação (FAB) composta de oito subtipos: M0 e M1, mieloblástica imatura; M2, mieloblástica com maturação; M3, promielocítica; M4, mielomonocítica; M5, monocítica; M6, eritroleucemia; e M7, megacariocítica (INCA, 2014).

A classificação morfológica e imunofenotípica têm implicações prognósticas, assim como a idade, condições clínicas e, principalmente, alterações citogenéticas (USVASALO *et al.*, 2009). As maiorias dos pacientes referem cansaço e falta de ar durante a atividade física e apresentam palidez cutâneo-mucosa. A presença de sinais de hemorragia como: petéquias, equimoses e hematomas, assim como sangramento de mucosa nasal, oral e hemorragias em trato gastrointestinal podem estar presentes. Além disso, a febre e infecções são achados comuns, juntamente com a sensação de dores nos ossos.

O diagnóstico da LMA pode ser efetuado através da avaliação microscópica (Figura 1) de esfregaço de medula óssea, a fim de se identificar aumento de proliferação celular e presença de células imaturas (HUTCHISON & SCHEXNEIDER, 2011).

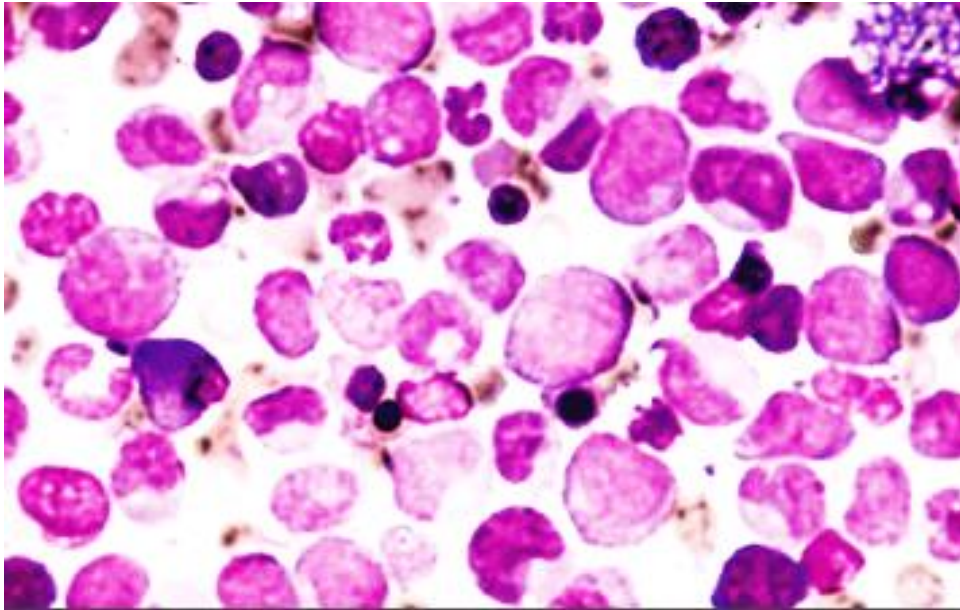


Figura 1. Mielograma de paciente com LMA. Observa-se medula óssea hipercelular com inúmeros blastos mieloides. **Fonte:** Komagome et al. (2000).

O material obtido a partir do sangue periférico e / ou medula óssea deve ser submetido a realização de imunofenotipagem, e a avaliação estrutural e quantificação do número de cromossomos devem ser realizados por testes citogenéticos. A análise cromossômica é importante para definição do tipo de tratamento e definição de prognóstico (KING *et al.*, 2011).

Atualmente, as mutações são identificadas pela Hibridização Fluorescente In Situ (FISH) e pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Tão logo definido o diagnóstico, os pacientes devem ser submetidos ao tratamento inicial de quimioterapia. O objetivo principal é destruir células leucêmicas da medula óssea, para que ela posteriormente, volte a produção de células normais (MANCINI *et al.*, 2005; MOORMAN *et al.*, 2007).

Existe um sistema de classificação citogenética de risco, que auxilia na definição do prognóstico do paciente em: favorável, intermediário ou baixo, tendo como base os achados de citogenéticos (Tabela 3 e figura 2). A maioria dos pacientes, em todo mundo, com LMA apresentam um cariótipo normal (Figura 3), (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011; VELLOSO *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2012; SAFAEI *et al.*, 2013).

Tabela 3. Classificação prognóstica segundo anormalidades citogenéticas e moleculares.

Risco prognóstico	Indicadores citogenéticos	Anormalidades moleculares
Prognóstico favorável	Inv(16) ou t(16;16) t(8;21) t(15;17)	Citogenética normal: com mutação NPM1 ou mutação CEBPA isolada na ausência de mutação FLT3-ITD
Prognóstico intermediário	Citogenética normal Trissomia do 8 t(9;11) Outros não definidos	t(8;21), inv(16), t(16;16): com mutação c-KIT
Prognóstico desfavorável	Cariótipo complexo (≥ 3 anormalidades clonais cromossômicas) -5. 5q-, -7.7q- 11q23 – sem t(9;11) Inv (3), t(3;3) t(6;9) t(9;22)	Citogenética normal: com mutação FLT3-ITD

Fonte: Machado et al (2012).

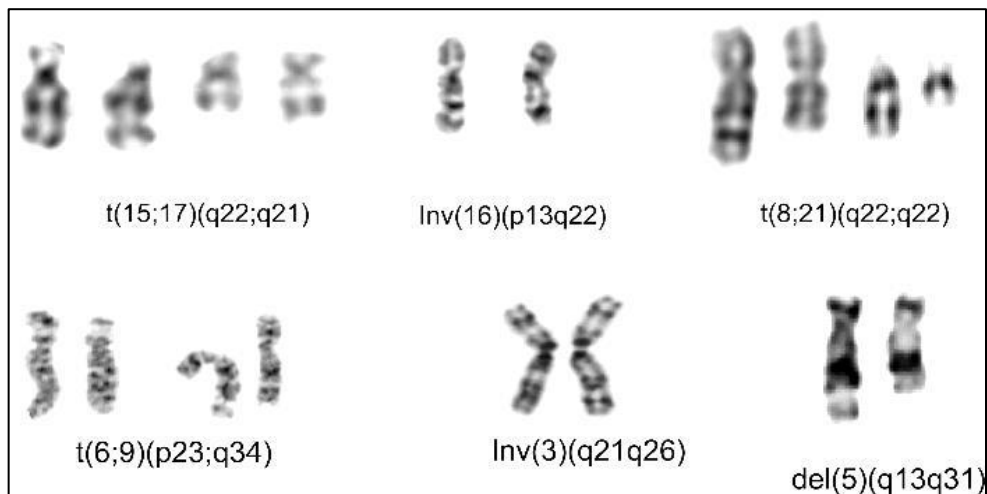


Figura 2. Principais alterações citogenéticas associadas com o bom e mau prognóstico no cariótipo da Leucemia Mielóide Aguda. Fonte: Hernández et al. (2011).

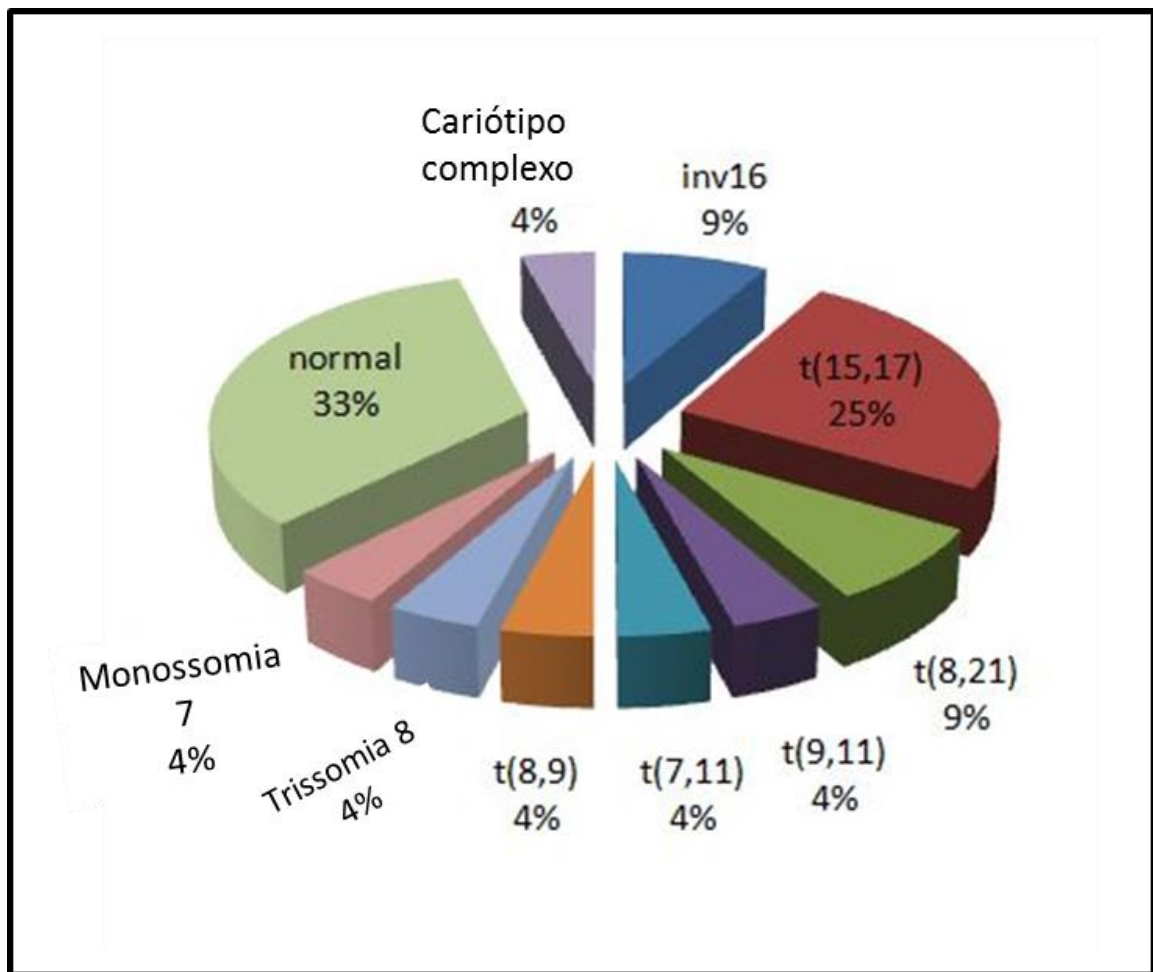


Figura 3. Distribuição de anormalidades cromossômicas em pacientes com LMA.
Fonte: Adaptado de Velloso et al. (2011).

Os pacientes com LMA que apresentam as alterações cromossômicas $t(15;17)$, $t(8;21)(q22;q22)$ e $inv(16)(p13;q22)$, as quais geram rearranjos gênicos *RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)* e *CBFB-MYH11*, pertencem ao grupo citogenético de prognóstico favorável (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

Casos de bom prognóstico não necessariamente serão encaminhados para o transplante de medula óssea. Contudo, existem outros casos onde a citogenética desfavorável sugere a sua indicação. Os pacientes com o cariótipo normal representam a maioria dos casos e são classificados como portadores de prognóstico intermediário. Estes indivíduos nem sempre irão apresentar resposta satisfatória ao tratamento quimioterápico proposto, mesmo com sua intensificação (VELLOSO *et al.*, 2011; SAFAEI *et al.*, 2013).

A provável razão para esta diversidade de resposta é a natureza molecular heterogênea de pacientes com LMA e aos pacientes com achados citogenéticos dentro da normalidade. Ao longo dos últimos 10 anos, vários diferentes estudos têm demonstrado que a presença ou ausência de mutações e alterações genéticas que levam a diferentes níveis de expressão de determinados genes, têm um efeito direto sobre o prognóstico (MACHADO *et al.*, 2012; RAO *et al.*, 2016).

Sabe-se que o fator prognóstico mais importante encontrado entre os pacientes com a citogenética normal é uma duplicação em tandem do gene *FLT3*. A presença desta mutação confere um pior prognóstico em relação a sua ausência. Outros marcadores moleculares também influenciam no progresso de indivíduos com LMA que apresentam citogenética normal. As anomalias genéticas que consistem em mutações em *NPM1* e *CEBPA* são consideradas favoráveis; e a alta expressão de *BAALC* e *ERG* são desfavoráveis (RUAN *et al.*, 2014).

Outro fator importante, particularmente nos casos em que existe t (8, 21), e a inversão do cromossomo 16, é que outras anomalias cromossômicas que são frequentemente encontradas em combinação com estas mutações parecem alterar o prognóstico. Por outro lado, estes pacientes com tal condição podem vir a apresentar mutações no gene *KIT* (PATSCKA *et al.*, 2006; MRÓZEK *et al.*, 2007).

Os estudos atuais têm estabelecido o verdadeiro papel desta anormalidade no prognóstico e demonstram, primeiramente em adultos, que a presença de mutações em *KIT* está associada com uma maior probabilidade de recaída. No entanto, estes resultados ainda requerem uma validação adicional em crianças (RAO *et al.*, 2016).

2.1.3. Leucemia Mielóide Crônica (LMC)

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é caracterizada pela presença de uma anormalidade genética adquirida, denominada (cromossomo Filadélfia) envolvendo os cromossomos 9 e 22. A nível molecular, a fusão destes diferentes cromossomos é chamada de BCR-ABL (Figura 4) (DREGER *et al.*, 2005; FLINN *et al.*, 2007).

As principais causas para esta anomalia são em geral, desconhecidas. Em uma pequena parcela dos casos, a doença pode estar relacionada com a exposição à radiação. Na LMC, em contraste com a LMA, as células anormais geralmente

funcionam adequadamente, permitindo um curso inicial mais suave da doença, em comparação com os casos agudos (SHANAFELT *et al.*, 2004; GRIBBEN, 2010).

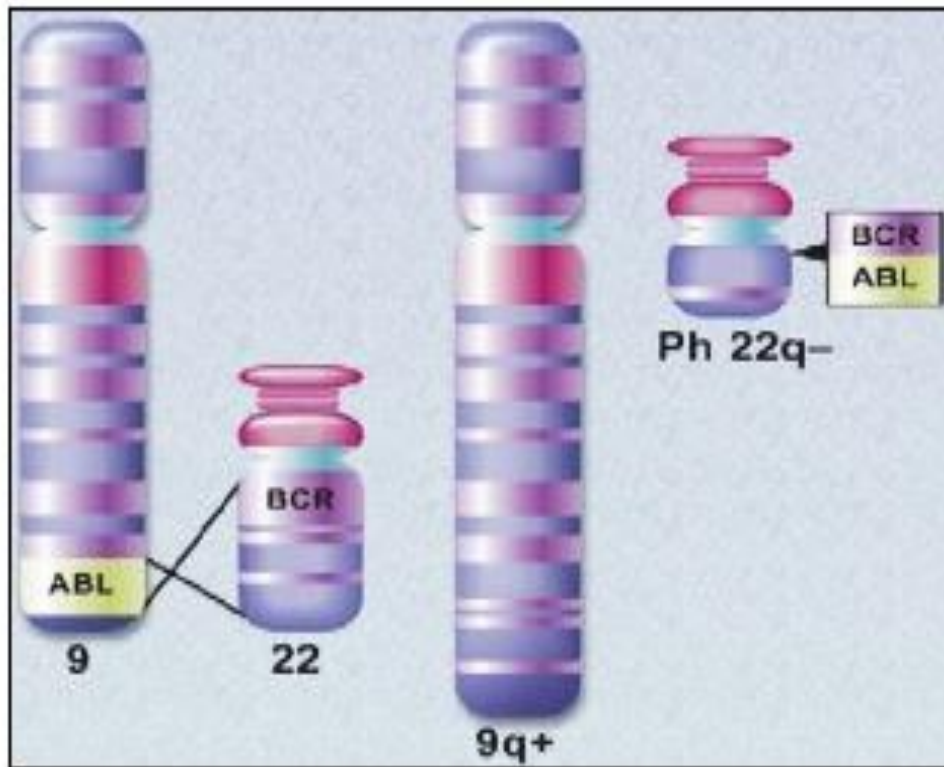


Figura 4. Modelo esquemático da translocação que gera o Cromossomo Filadélfia. Os genes ABL e BCR residem no braço longo dos cromossomos 9 e 22, respectivamente. Como resultado da translocação (9; 22), um gene BCR-ABL é formado no cromossomo 22 derivado ('Cromossomo Filadélfia'). **Fonte:** Patel *et al.* (2010).

A maioria dos casos de LMC ocorre em indivíduos adultos. A frequência deste tipo de leucemia no mundo é de 1 caso para 1 milhão de crianças até a idade de 10 anos. Entre os adultos, a frequência é de cerca de 1 caso para cada 100.000 indivíduos (SIEGEL *et al.*, 2014).

Os sinais e sintomas envolvem cansaço, palidez cutâneo-mucosa, sudorese, perda de peso e desconforto abdominal devido a esplenomegalia. Em muitos pacientes, ocorre a progressão da doença para fase acelerada. Fase esta caracterizada por resistência à terapêutica citorrredutora, aumento de esplenomegalia, da basofilia e do número de células blásticas. (GRIBBEN, 2010; HALLEK *et al.*, 2010).

A Crise blástica é considerada a última fase evolutiva da doença, onde o número de células blásticas é superior a 20% na medula óssea ou sangue periférico. Em aproximadamente 25% dos pacientes nesta fase, a manifestação clínica ocorre

de modo semelhante à LLA, enquanto que nos 75% restantes dos casos, a manifestação se assemelha a LMA (BYRD, 2015).

O diagnóstico da LMC é realizado através de exames de medula óssea, onde o mielograma, representado pela avaliação do esfregaço de medula, evidência hiperplasia predominante da série granulocitária. A confirmação diagnóstica se faz pela presença do cromossomo Filadélfia (90 a 95% dos casos), após realização de cariótipo de medula óssea, e restantes 5%, não diagnosticados, poderão ser confirmados com a presença de BCR-ABL por PCR. As técnicas de FISH ou PCR são mais sensíveis, e são importantes não apenas para o diagnóstico e avaliação da resposta ao tratamento, mas também para a diferenciação de outras neoplasias mieloproliferativas (DEWALD, 2002).

Nos últimos anos, houve uma revolução no tratamento da LMC pelo surgimento de inibidores de tirosina-quinase. O medicamento Imatinibe foi o primeiro deles a ser aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos, e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA) no Brasil (ENGEL *et al.*, 2007). Ele suscitou surpreendentes respostas hematológicas e citogenéticas, anteriormente demonstradas apenas no transplante de medula óssea. A medicação tem melhor eficácia durante a fase inicial da doença, apresentando resistência terapêutica com a progressão da mesma para fase acelerada (AULT *et al.*, 2006; PYE *et al.*, 2008; HOCHHAUS *et al.*, 2009).

A superexpressão de BCR-ABL, a evolução clonal e mutações pontuais do gene ABL têm sido descritas como mecanismos na resistência adquirida ao uso do imatinibe. Outros medicamentos, dasatinib e nilotinib, ambos aprovados pela FDA, são utilizados diante da refratariedade ou intolerância ao imatinibe. (SEYMOUR *et al.*, 2006), no Brasil.

As características genéticas relevantes para o prognóstico da LMC baseiam-se na evolução clonal, isto é, na possibilidade de que novos clones apareçam, o que geralmente determina a progressão das manifestações clínicas e as mutações que conferem resistência ao imatinibe. Ressalta-se que estas mutações não possuem indução pelo medicamento, mas antes, semelhante ao que ocorre na resistência de bactérias a antibióticos, os clones dotados de mutação, raros e pré-existentes, são selecionados em virtude do seu potencial de sobrevivência e expansão na presença do inibidor, sobrepondo-se gradativamente às células sensíveis à droga (AULT *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2008; OGASAWARA *et al.*, 2009).

As mutações se classificam em quatro grupos: (i) responsáveis por impedir a ligação direta ao imatinibe; (ii) presentes no sítio de ligação ao ATP; (iii) mutações do loop de ativação as quais impossibilitam que a quinase adquira a conformação física que promove a ligação do medicamento; e (iv) mutações no domínio catalítico. A substituição do aminoácido treonina pela isoleucina na posição 315 da proteína ABL, ou T315I, foi a primeira mutação detectada em doentes resistentes (MÜLLER *et al.*, 2009; DIAMOND & SILVA, 2013).

A fenilalanina 317 estabelece contato com o imatinibe, e sua mutação para leucina (F317L) também gera resistência. Outro local de agrupamento de mutações é o loop de ligação do ATP (Phosphate ou P-loop). Este interage com o medicamento através de ligações de hidrogênio e de Van der Waals (GORRE *et al.*, 2001; ÁDRIAN *et al.*, 2006). Tais mutações alteram a flexibilidade do P-loop e instabilizam a conformação necessária para a ligação do imatinibe. As mais comuns são as substituições G250, Q252, Y253 e E255. O loop de ativação da quinase ABL começa no aminoácido 381 e pode adquirir uma conformação fechada (inativa) ou aberta (ativa). O imatinibe se liga à conformação ativa forçando-a a se transformar em inativa (SOVERINI *et al.*, 2006).

Finalmente, a substituição de alguns aminoácidos se agrupa no domínio catalítico (aminoácido 350-363), próximo a base do loop de ativação. Deste modo, as mutações neste local influenciam a ligação ao medicamento. Cerca de 100 mutações pontuais resultam na substituição de aproximadamente 50 aminoácidos no domínio da tirosina quinase ABL; prevê-se que este número cresça em virtude do uso de tecnologias de detecção com maior sensibilidade (Figura 5) (BARNES *et al.*, 2005; DIAMOND & SILVA, 2013).

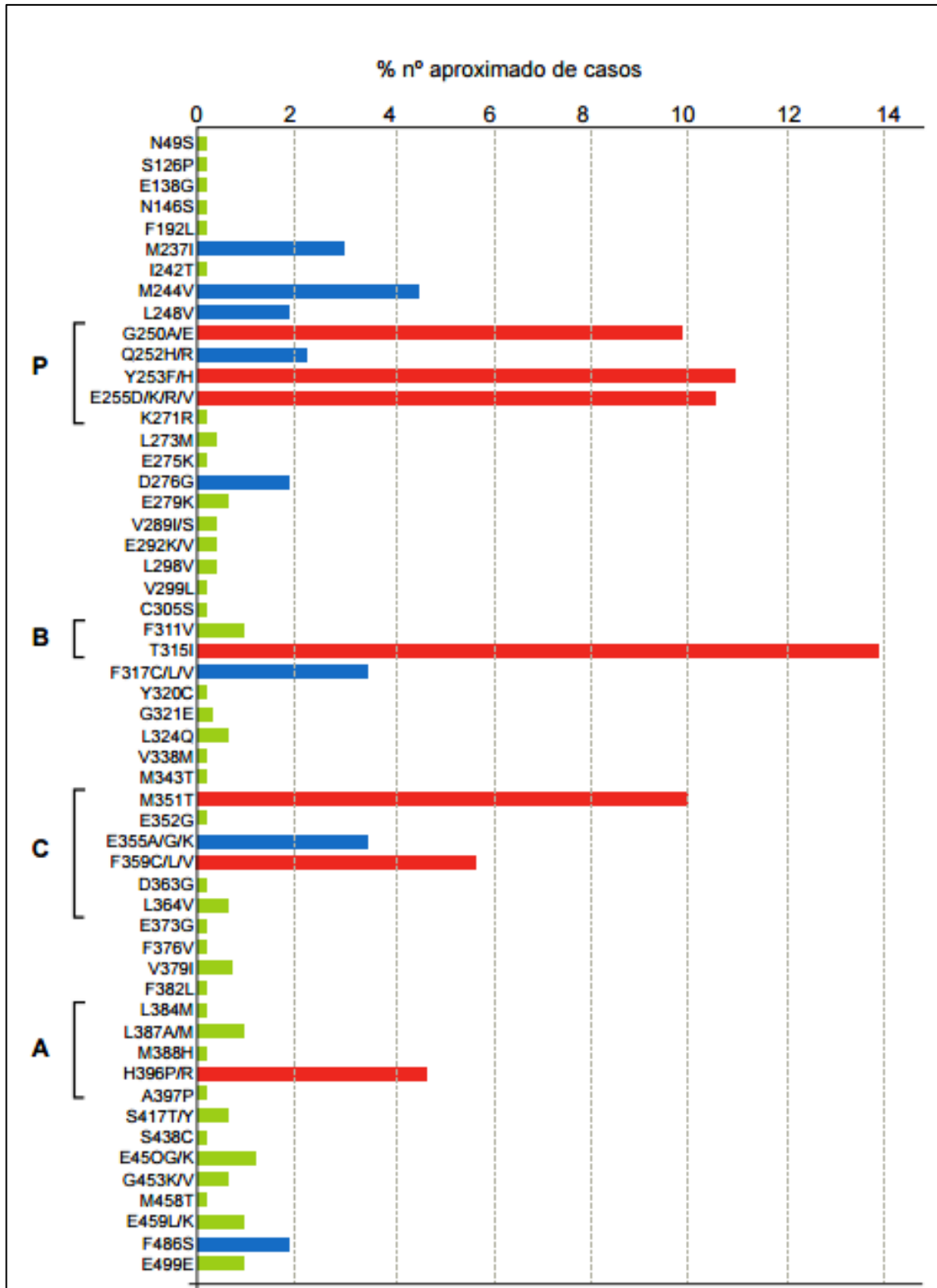


Figura 5. Incidência relativa das mutações no domínio da tirosina quinase associadas à resistência clínica ao Imatinibe. As sete mutações mais frequentes estão destacadas em vermelho e as oito que se seguem a azul. Os aminoácidos alterados se distribuem ao longo do domínio da quinase onde há uma tendência para se agruparem nas sub-regiões indicadas como B (binding site), P (ATP ou phosphate binding site), A (ativação loop) e C (domínio catalítico) 8-14. **Fonte:** Diamond & Silva (2013).



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 124/2016

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: LUCIANA CARDOSO MARINHO

DEFENDIDA EM 10 DE AGOSTO DE 2016 E APROVADA COM CONCEITO B

O título foi alterado não () sim _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis
PUC Goiás (Presidente)

Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura
PUC Goiás

Prof. Dr. Rui de Sousa Lino Junior
Membro externo(UFG)

Os pacientes com LMC devem ser monitorados através do estudo de cariótipo até o desaparecimento do cromossomo Filadélfia (resposta citogenética completa) e por meio de testes moleculares como a PCR. A recomendação da cariotipagem pode ser realizada ao menos uma vez por ano, a fim de detectar a evolução clonal que pode representar uma crise blástica iminente (MARIN *et al.*, 2010).

O isocromossomo (17q) é o mais comum (20% de crises blásticas), provocando a perda da *p53* (gene supressor tumoral) (CALABRETTA & PERROTTI, 2004). Acredita-se ainda que outros genes possam estar envolvidos neste mecanismo, que é ainda pouco compreendido. A trissomia do cromossomo 8, também foi descrita e relacionada com a sobre-expressão do gene *Myc*. As translocações são raras, mas ambas t (03:21) e t (07:11) foram descritas em LMC (STILGENBAUER *et al.*, 2014).

Estas anomalias também têm sido observadas no cromossomo Filadélfia. A duplicação deste cromossomo ocorre em mais de 30% das crises blásticas, e a perda do cromossomo 9 (der 9) ocorre entre 5 e 10% dos casos. Contudo, ainda não está claro se a anormalidade der 9 afeta o prognóstico de indivíduos tratados com imatinibe ou naqueles que receberam transplante de medula óssea (VAYDIA *et al.*, 2011; HALLEK, 2015).

2.1.4. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é uma doença heterogênea, caracterizada pela proliferação de células jovens (blastos), sendo considerada altamente agressiva. Mais propriamente na LLA ocorre proliferação descontrolada de linfoblastos (origem B ou T) na medula óssea, sangue periférico, e / ou em outros órgãos (JABBOUR *et al.*, 2005).

Apresenta uma taxa de incidência de 1,6 por 100.000 pessoas ao ano, com um mediana de 14 anos. Cerca de 60% dos pacientes são diagnosticados após 20 anos de idade. Pacientes adultos acima de 19 anos apresentam taxa de sobrevida inferior quando comparada com as crianças (PULTE *et al.*, 2009)

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o tipo de câncer infantil mais comum e, em adultos, possui uma importante causa de morbidade. Nos últimos anos, houve grandes avanços na compreensão da base genética da LLA. Os estudos de caracterização genômica, incluindo a análise de microarranjos e sequenciação do

genoma, ajudaram a identificar inúmeras mutações presentes na LLA, bem como a compreensão do desenvolvimento linfoide, detecção de alterações em genes supressores de tumor, receptores de citocinas, quinase e a via de sinalização RAS (MULLIGHAN, 2012; INABA *et al.*, 2013).

Esta doença é resultante do crescimento descontrolado e acúmulo de linfoblastos, que são incapazes de funcionar como células sanguíneas normais havendo um bloqueio na produção normal destas células na medula óssea, reduzindo deste modo, a produção de glóbulos vermelhos, plaquetas e glóbulos brancos na medula óssea. Na maioria dos casos não existe um fator claro de sua origem. Acredita-se que em alguns casos exista algum tipo de ligação com a exposição a radiação (PUI *et al.*, 2009).

A LLA se desenvolve a partir de linfócitos primitivos, os quais podem ser encontrados em vários estágios de desenvolvimento. O principal método de classificação é realizado pela imunofenotipagem. Os estudos citogenéticos também representam uma importante metodologia (PAPAEMMANUIL *et al.*, 2009; TREVINO *et al.*, 2009).

A LLA foi designada pela OMS em 2008 na classificação de malignidades hematológicas como Leucemia /Linfoma Linfoblástico, por ambas serem consideradas duas entidades biologicamente semelhantes (SWERDLOW *et al.*, 2008). No entanto, o Linfoma linfoblástico, pode ou não apresentar envolvimento de medula óssea, e esta uma vez com infiltração, a contagem de blastos na mesma será menor de 25% (BASSAN *et al.*, 2016)

A única manifestação clínica mais específica do Linfoma linfoblástico seria o aumento do timo, com presença de massa mediastinal em 90% dos casos, com ausência de acometimento de tecidos e órgão alvo (FENG *et al.*, 2010). Pode-se apresentar casos com características intermediárias, com posterior evolução, apresentando disseminação leucêmica (BASSAN *et al.*, 2016)

De acordo com a atualização da Classificação da OMS de Leucemias Agudas 2016, em se referindo as Linfoblásticas Agudas, duas novas entidades provisórias importantes com presença de anormalidades genéticas recorrentes foram reconhecidas e incorporadas na classificação: LLA-B com a amplificação intracromossômica do cromossoma e LLA-B com translocações envolvendo tirosina quinases ou receptores de citocinas ("BCR-ABL1-like all") (Tabela 4)..

Esta, se encontra relacionada com mal prognóstico , assumindo grande importância como nova entidade. Apresenta resposta terapêutica a associação com inibidores de tirosino-kinase (TKI) (DEN BOER et al, 2009).

Tabela 4. Classificação das Neoplasias de células linfóides precursoras , segundo atualização OMS, 2016

Leucemia / linfoma linfoblástico de células B

Leucemia / linfoma linfoblástico de células B, SOE

Leucemia / linfoma linfoblástico de células B com anormalidades genéticas recorrentes

Leucemia / linfoma linfoblástico de células B com t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1

Leucemia / linfoma linfoblástico de células B com t(v;11q23.3); rearranjo KMT2A

Leucemia / linfoma linfoblástico de células B com t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1

Leucemia / linfoma linfoblástico de células B com hiperdiploidia

Leucemia / linfoma linfoblástico de células B com hipodiploidia

Leucemia / linfoma linfoblástico de células B com t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH

Leucemia / linfoma linfoblástico de células B com t(1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1

Entidade provisória: Leucemia / linfoma de células B, BCR-ABL1 – like

Entidade provisória: Leucemia / linfoma de células B com iAMP21

Leucemia / linfoma linfoblástico de células T

Entidade provisória: Leucemia linfoblástica de célula T precursora

Entidade provisória: Leucemia / linfoma linfoblástico de células Natural killer (NK)

Os sinais e sintomas desta doença são muito semelhantes aos da LMA, tais como cansaço, falta de ar, sinais de hemorragia, infecções e febre. Além disso, pode haver infiltração testicular, vômitos e de dores de cabeça sugestivas de envolvimento também do sistema nervoso (NABHAN *et al.*, 2014).

Para este tipo de leucemia, o diagnóstico é realizado pela análise microscópica do sangue periférico e medula óssea, citometria de fluxo, imunohistoquímica e ensaios citogenéticos (PCR e FISH) (OLDE *et al.*, 2009).

Em muitos casos de LLA, as mudanças genéticas não são conhecidas e nem todos os casos apresentam as mesmas alterações cromossômicas. Outras

características importantes para abordagem terapêutica incluem: a idade do paciente, o nível de contagem leucocitária, o envolvimento do sistema nervoso central e dos gânglios linfáticos (HALLEK, 2013).

Alguns estudos correlacionam o surgimento da LLA com inúmeras causas. Há hipóteses de que a redução da exposição de crianças à infecções bacteriana durante o primeiro ano de vida pode aumentar risco de LLA infantil. Uma criança que passou por vários exames de raios-X também pode apresentar um risco ligeiramente aumentado para a LLA; a quimioterapia e radiação anterior ao tratamento pode ser uma causa desta doença em adultos (PUI *et al.*, 2009; Papaemmanuil *et al.*, 2009; DEMIR *et al.*, 2014)..

Os cientistas continuam a explorar possíveis relações desta doença com o estilo de vida ou exposição a agentes ambientais (BASSIL *et al.*, 2007; COCCO *et al.*, 2013). Estas investigações apoiam a ideia de que uma série de fatores complexos podem estar envolvidos na LLA. Um estudo detectou que crianças expostas a pesticidas agrícolas podem apresentar um aumento significativo do risco desta doença (BAILEY *et al.*, 2015).

O tratamento se dá pela quimioterapia. Os pacientes devem ser tratados assim que o diagnóstico é confirmado, e o objetivo inicial é a redução e restauração da produção normal dos hemácias, leucócitos e plaquetas. Em tratamentos quimioterápicos, uma combinação de drogas é utilizada para na tentativa de controle da doença (NABHAN *et al.*, 2014).

Cerca de 75% de todos os casos de LLA infantil apresenta uma alteração cromossômica detectável por cariotipagem, FISH ou técnicas moleculares (Figura 6). Em pacientes com LLA de precursores de células B existem casos que incluem hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos, hipodiploidia com menos de 44 cromossomos, e rearranjos cromossômicos incluindo t (12; 21) *ETV6-Runx1* (TEL-AML1), t (1; 19) *TCF3-PBX1* (E2A-PBX1), t (9; 22) *BCR-ABL1* e rearranjo *MLL* oriundo da translocação 11q23 (BURMEISTER *et al.*, 2009; OLDE *et al.*, 2009; INABA *et al.*, 2013).

A LLA de linhagem T é caracterizada por mutações ativadoras da proteína NOTCH1 e por rearranjos de fatores de transcrição como o *TLX1* (*HOX11*), *TLX3* (*HOX11L2*), *LYL1*, *TAL1* e *MLL* (AGNUSDEI *et al.*, 2014).

Embora estes rearranjos apresentem importância na iniciação de eventos da leucemogênese e sejam amplamente utilizados no diagnóstico e estratificação de

risco, eles não são suficientes para explicar a leucemogênese. Rearranjos, tais como *ETV6-RUNX1* estão presentes antes mesmo do desenvolvimento da leucemia, e muitos deles, em modelos experimentais, não resultam por si só no desenvolvimento desta doença (BASSAN & HOELZER, 2011).

Alguns estudos de mapeamento genético demonstraram que o genoma abriga, em geral, menos alterações estruturais em relação àquelas verificadas no genoma de inúmeros tumores sólidos, contudo algumas deleções recorrentes e ampliações gênicas foram identificadas, onde muitas delas envolvem um único gene (MULLIGHAN, 2012).

Muitos destes genes envolvidos codificam proteínas com funções-chave no desenvolvimento linfóide (por exemplo, *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1* e *LMO2*), regulação do ciclo celular e supressão de tumor (*CDKN2A / CDKN2B*, *PTEN* e *RB1*), sinalização linfóide (*BTLA*, *CD200*, *TOX*, receptor de glucocorticóide *NR3C1*) e a regulação da transcrição e coativação (*TBL1XR1*, *ETV6* e *ERG*) (ROBERTS *et al.*, 2012; GROSSMANN *et al.*, 2013).

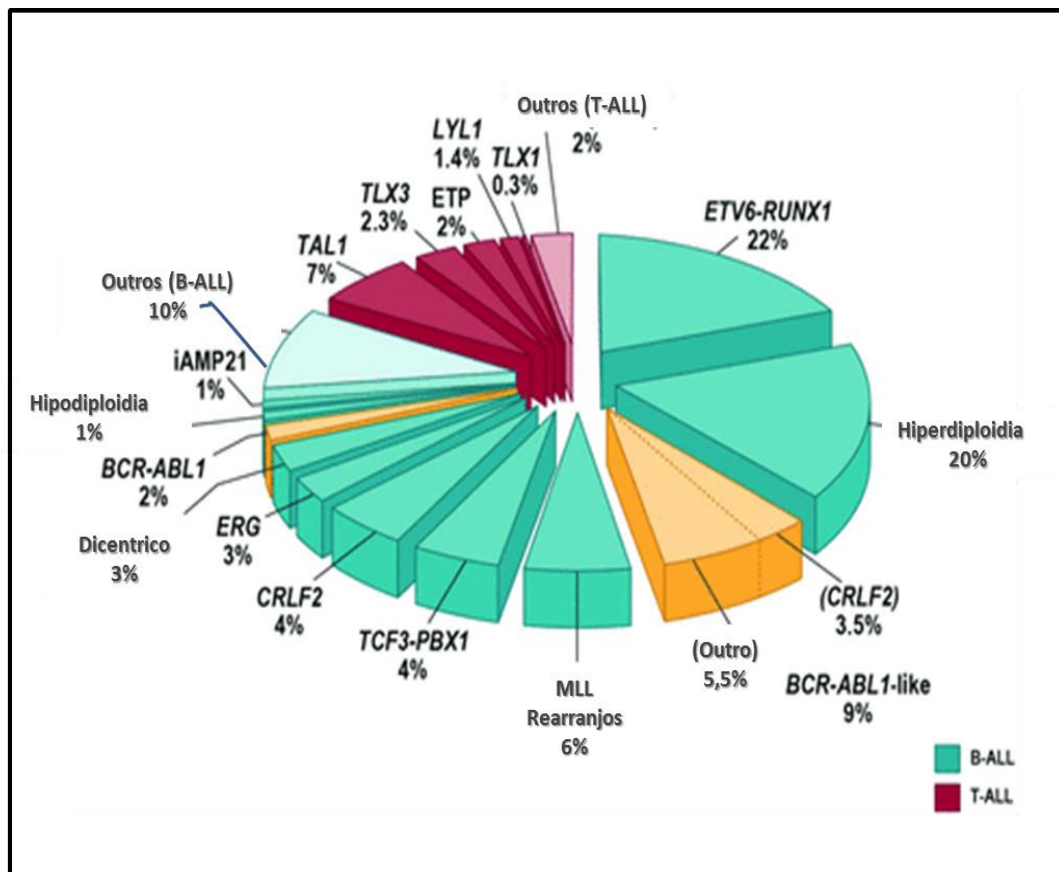


Figura 6. Frequência de subtipos citogenéticos de LLA pediátrica. Fonte: Adaptado de Inaba et al. (2013).

A presença de fatores prognósticos desfavoráveis, casos de refratariedade e ou recidiva da doença são indicativos de realização de transplante de medula óssea. Uma das causas do prognóstico desfavorável, que ocorre em 5% de crianças com LLA e 25% dos casos de adultos, é a presença do cromossomo filadélfia. Nestes casos, a utilização de inibidores de tirosina-quinase juntamente com a quimioterapia e o transplante podem ser úteis, uma vez que eles isoladamente apresentam resultados insuficientes (YAN *et al.*, 2008; HOF *et al.*, 2001).

O tratamento da LLA é complexo e alguns exemplos de medicamentos e tratamentos utilizados durante o início e pós-tratamento são: doxorrubicina intravenosa, asparaginase intravenosa, vincristina intravenosa, prednisona oral, metotrexato intravenoso ou intramuscular, citarabina intra-tecal, inibidores de tirosina-quinase em casos confirmados da presença do cromossomo Filadélfia, dentre outras drogas (CUNNINGHAM *et al.*, 2013).

2.1.5. Leucemia Linfocítica Crônica (LLC)

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) consiste em um distúrbio monoclonal caracterizado por uma acumulação progressiva de linfócitos funcionalmente incompetentes (Figura 7). Esta é a forma mais comum de leucemia em adultos nos países ocidentais. Alguns pacientes chegam a óbito rapidamente, dentro de 2-3 anos de diagnóstico, devido a complicações, no entanto a maioria dos pacientes apresentam expectativa de vida entre 5 e 10 anos após o diagnóstico (BYRD *et al.*, 2004; HALLEK, 2015).

Existem inúmeros sinais e sintomas desta doença, onde seu início é insidioso, e não é incomum na LLC que sua descoberta ocorra ao acaso após um exame de sangue ocorrido rotineiramente, visto que cerca de 25 a 50% dos pacientes são assintomáticos no momento de sua detecção (JANG *et al.*, 2013).

Em geral, os principais sintomas incluem aumento dos gânglios linfáticos, hepatomegalia, esplenomegalia, infecções recorrentes, perda de apetite ou saciedade precoce, presença de hematomas, fadiga e sudorese noturna (PARIKH *et al.*, 2013).

O diagnóstico ocorre através da contagem de glóbulos brancos, onde indivíduos com LLC cursam leucometria elevada. A citometria realizada com sangue periférico é o exame mais utilizado para confirmação diagnóstica em LLC. Outros

ensaios úteis incluem análise em biópsia de medula óssea e ultrassonografia de abdomen. Testes para avaliação da dosagem de imunoglobulinas podem ser realizados para aqueles pacientes que desenvolvem infecções de repetição. (TSIMBERIDOU *et al.*, 2006; MORENO *et al.*, 2010).

Existem dois sistemas de classificação usados na LLC: o sistema de estadiamento Rai modificado, que categoriza os pacientes em grupos de baixo, médio e alto risco e o sistema de estadiamento Binet que categoriza os pacientes de acordo com o quantidade de áreas de envolvimento linfoide acometidas (Tabela 5) (HILLMEN, 2011; MUHAMMAD *et al.*, 2016).

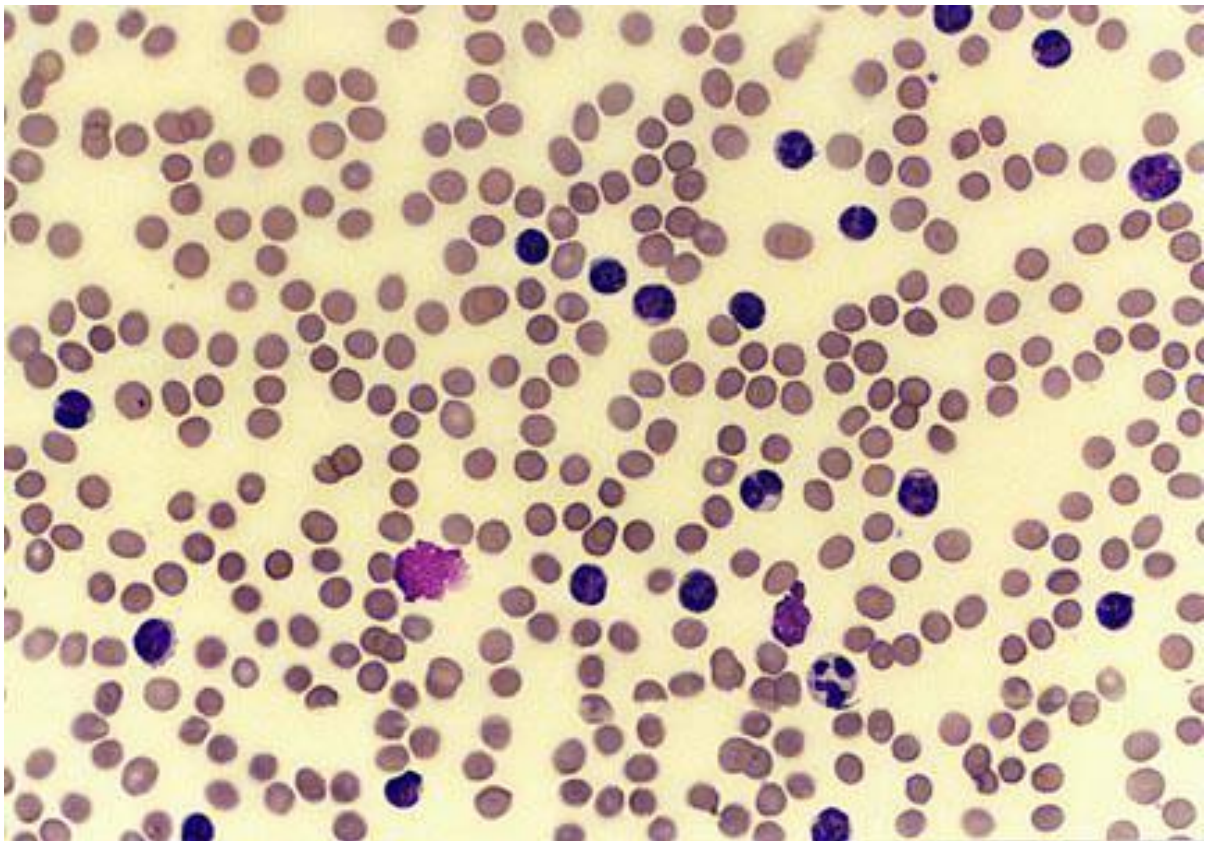


Figura 7. Esfregaço de sangue periférico de um paciente com leucemia linfocítica crônica. Observa-se citoplasma abundante e pequena variedade de linfócitos atípicos. **Fonte:** Muhammad et al. (2016).

Tabela 5. Estadiamento da LLC típica

Estágio	Características clínicas	Sobrevida média (anos)
0: baixo risco	Linfocitose apenas no sangue e na medula	>10
I: risco intermediário	Linfocitose + Linfadenopatia	5-7
II: risco intermediário	Linfocitose + hepatomegalia ou esplenomegalia com ou sem adenopatias	5-7
III: alto risco	Linfocitose + anemia	1-3
IV	Linfocitose + trombocitopenia	
A	Menos de 3 áreas de envolvimento linfóide; sem anemia ou trombocitopenia	>10
B	3 ou mais áreas de envolvimento linfóide ; sem anemia ou trombocitopenia	7
C	Hemoglobina \leq 10 g/ dLe /ou plaquetas < 100.000/ μ L	2

Fonte: Swerdlow et al. (2008).

Na LCC, as células são altamente resistentes à apoptose, e alguns pesquisadores têm sugerido que o excesso de células B tem maior relação à diminuição da apoptose e a desregulação do controle do ciclo celular do que necessariamente um aumento da taxa de proliferação destas células. Alterações em microRNAs afetam todas as linhagens celulares de LLC; os principais efeitos são a evasão de apoptose, a auto-suficiência no processo mitótico e, como estudos recentes sugerem, a estimulação da angiogênese e disseminação (GREVER *et al.*, 2007; ROSSI *et al.*, 2013).

Alguns estudos epidemiológicos demonstram que o risco de desenvolvimento da LLC pode estar relacionado com uma predisposição genética. Algumas

pesquisas de caso-controle e de coorte apontaram que familiares de indivíduos com LLC podem apresentar um risco de 5,7 vezes maior no desenvolvimento da doença (CHIGRINOVA *et al.*, 2013).

Estudos moleculares da LLC mostraram que existem inúmeras alterações genéticas consideradas essenciais ao processo tumorigênico. Tais alterações implicam duas grandes classes de genes: genes supressores de tumores, cujos produtos normalmente inibem diretamente o desenvolvimento neoplásico regulando negativamente o crescimento e diferenciação; e os oncogenes que contribuem positivamente para a transformação neoplásica quando ativados (HAFERLACH *et al.*, 2007; PALLASCH *et al.*, 2009).

A inativação dos genes supressores de tumor juntamente com a ativação de oncogenes leva à malignidade. As alterações genéticas envolvidas na transformação de células normais para o estado maligno podem ser herdadas na linhagem germinativa e surgirem somaticamente no tecido em que o tumor se estabelece (PARKER & STROUT, 2011; RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

A genética da LLC é concebivelmente semelhante à de cânceres da mama e do cólon, onde um subconjunto da doença ocorre em indivíduos que possuem na sua linha germinativa uma ou mais alterações genéticas causais requeridas para a transformação neoplásica. De acordo com o modelo de várias etapas da carcinogênese, o desenvolvimento do fenótipo neoplásico completo em modelos hereditários e não hereditários da LLC depende de múltiplas alterações genéticas (PALLASCH *et al.*, 2009; EICHHORST *et al.*, 2015).

A base genética da LLC é, em grande parte, desconhecida, contudo uma série de síndromes cromossômicas conhecidas pode estar associada a um risco aumentado no desenvolvimento das leucemias, incluindo doenças recessivas e a ataxia telangiectasia (AT). O mapeamento do cromossomo 11q23 em pacientes com AT demonstra que estes possuem um risco aumentado no desenvolvimento de cancer de mama, linfomas e leucemias. Outros estudos relatam que o gene ATM (mutante) ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes LLC. Este gene é responsável pela codificação de uma proteína do tipo quinase de ponto de checagem que harmoniza o reconhecimento de alterações no DNA oriundas de radiação ionizante (BOULTWOOD, 2001; STANKOVIC *et al.*, 2002; SIPAHIMALANIJ *et al.*, 2007).

Uma abordagem completamente diferente na identificação de genes é a tentativa de usar os ganhos e perdas genômicas identificadas em casos LLC, tanto esporádicos ou hereditários, para identificar os principais genes causadores desta condição. Estudos com alguns pacientes com LLC apontaram que estes apresentam mutações germinativas no microRNA (miR) precursor de miR15, miR16, miR 155, miR 92 e miR 21; e todos os pacientes apresentaram perda de heterozigossidade neste locus. Também existem evidências de que um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene ARLTS1 apresente relação com a LLC visto que alguns esta alteração já foi detectada em diferentes casos familiares com a presença da doença (HE *et al.*, 2007; CALIN *et al.*, 2008; CARDINAUD *et al.*, 2009; MRAZ & KIPPS, 2013).

Em virtude da constatação de que os *miRNAs* estão envolvidos na LLC, também existem estudos relativos ao envolvimento de RNAs não codificantes (ncRNAs) nesta doença. Algumas regiões ultraconservadas (RUCs) do genoma humano são de grande importância no desenvolvimento da LLC. Por exemplo, as moléculas ativas no cluster dos *miR-15a / miR-16-1* estão completamente conservadas em seres humanos e camundongos e altamente conservadas em 9 das 10 espécies de primatas com genoma já sequenciado. Alguns estudos apontam que as RUCs não são relíquias silenciosas da evolução, mas são altamente transcritas. Perfilando a expressão de 481 RUCs superiores a 200 pb em células de LLC (GALIN *et al.*, 2005; SAMPATH *et al.*, 2011; UNDERBAYEV *et al.*, 2014).

Os mecanismos reguladores da expressão das RUCs ainda são pouco conhecidos. No entanto, sabe-se que existe uma interação entre estas regiões e os miARNs, sugerindo a existência de uma rede de ncRNAs com funções de controle recíprocos (Figura 8) (CALIN & CROCE, 2009).

As alterações em genes candidatos e a expressão anormal de *miRNAs* pode representar uma nova forma de predisposição ao câncer visto que cada *miRNA* possui vários alvos e as pequenas variações herdadas que influenciam na expressão de *miRNAs* podem ter consequências importantes para a expressão de vários oncogenes ou genes supressores de tumor que codificam proteínas envolvidas na origem tumoral (CALIN *et al.*, 2007; WOJCIK *et al.*, 2010; UNDERBAYEV *et al.*, 2014).

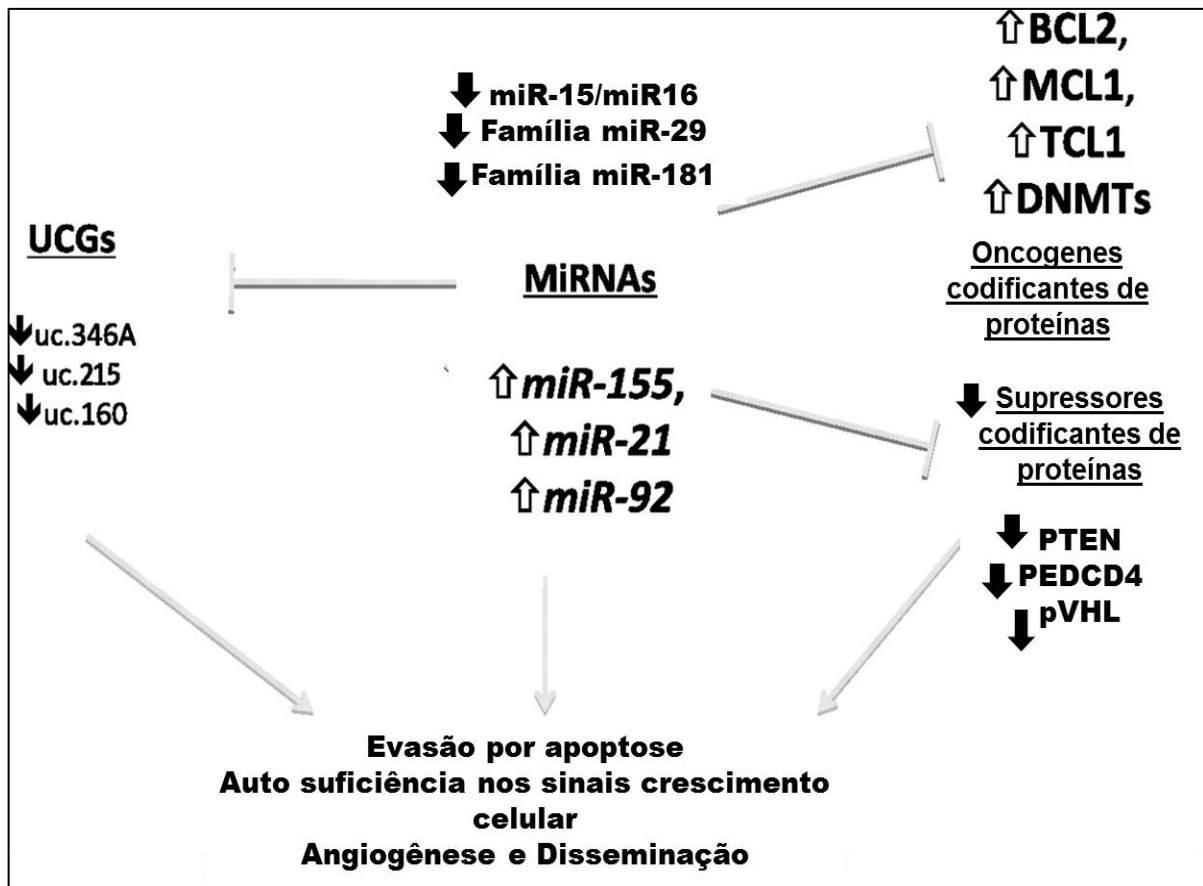


Figura 8. Envolvimento de ncRNAs em leucemias. Os *miRNAs* regulam a expressão de genes codificadores de proteínas e podem funcionar como oncogenes, supressores tumorais, ou ambos. Os UCGs, que são regulados por miARNs, atuam como oncogenes, ao passo que seu papel como supressores de tumor também tem sido implicado. Os principais exemplos de proteína codificadas por genes alvo por miARNs são apresentados. **Fonte:** Adaptado de Calin & Croce (2009)

2.2 O processo de Angiogênese

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de brotos endoteliais de vasos capilares preexistentes (FOLKMAN & INGBER, 1992). A angiogênese está presente em processos fisiológicos como a menstruação, ovulação, cicatrização de feridas e outros (SAFATLE *et al.*, 2002). Particularmente, no coração a angiogênese promove a ramificação vascular das coronárias, aumentando o fluxo sanguíneo e a sua força de contração, repercutindo favoravelmente durante o esforço físico. A angiogênese está presente também nos processos patológicos como artropatias crônicas, psoríase, retinopatia diabética, degeneração macular, crescimento tumoral e disseminação metastática (FOLKMAN, 1976; GONZALEZ *et al.*, 2003).

A angiogênese (Figura 9) é um mecanismo controlado por fatores ativadores e inibidores, que se desenvolve quando algum estímulo induz a mudança das células endoteliais de um estado de quiescência para um estado de replicação e migração, formando capilares (SAFATLE *et al.*, 2002). A angiogênese pode também levar ao crescimento e disseminação metastática do tumor maligno, o aumento da rede vascular aumenta a possibilidade de células tumorais entrarem na corrente sanguínea e muito provavelmente originar metástases (FOLKMAN, 1972; FOLKMAN, 1976; FOLKMAN, 2004).

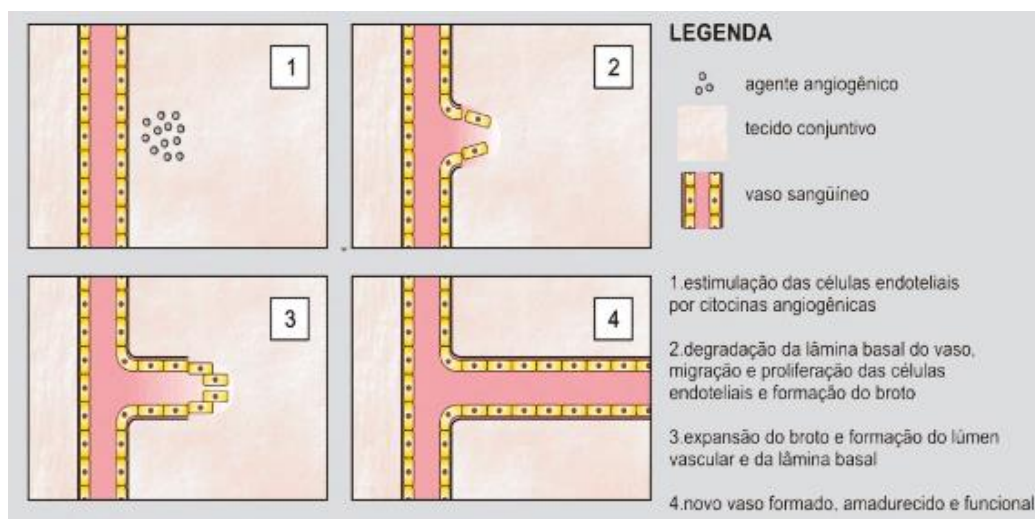


Figura 9. Esquematização do processo angiogênico. **Fonte:** LEMES, 2014.

Embora a maioria dos vasos sanguíneos em um organismo adulto permaneça em repouso, as células endoteliais possuem rápida capacidade de divisão em resposta a estímulos fisiológicos, o que pode resultar na ativação da angiogênese. Já se sabe que durante a resposta inflamatória os leucócitos (neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos T), e fibroblastos contribuem para formação de microambiente favorável a angiogênese (ZIJLSTRA *et al.*, 2006). As células endoteliais estimuladas pelos fatores angiogênicos liberam proteases que atuam favoravelmente na reparação do vaso sanguíneo lesado. As células endoteliais migram para o estroma perivascular, onde proliferam e iniciam o brotamento capilar. A migração das células segue em direção ao local de estimulação angiogênica. O broto endotelial expande, formando novos vasos sanguíneos (FERRARA, 2004; GOUGH, 2007).

Um grande número de moléculas que atuam na regulação da angiogênese é conhecido. Dentre elas se destacam: FGF (fator de crescimento fibroblástico), FCBb

(fator de crescimento de fibroblasto básico), TGF α (fator de crescimento α) e TGF- β (fator de crescimento β), fator de crescimento de hepatócito (HGF), fator de necrose tumoral (TNF α), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), metaloproteinases de matriz (MMP's), interleucina 8 e angiopoietinas (Ang). No entanto, nem todos estes fatores são específicos para células endoteliais e apenas alguns deles são capazes de influenciar diretamente as células endoteliais em cultura (GERHARDT & BETSHOLTZ, 2003; CARMELIET, 2005).

Assume-se que o acontecimento crítico na regulação da angiogênese é a cascata de sinalização que envolve o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Esta conclusão baseia-se em primeiro lugar sobre as propriedades biológicas deste fator de crescimento. O VEGF é uma proteína com atividade mitogênica e possui importante função na sobrevivência das células do endotélio vascular. O VEGF exerce sua atividade biológica através de receptores transmembrânicos com atividade tirosina quinase presente nas células endoteliais, e participa como principal mediador da angiogênese (DVORAK, 2002; LI *et al.*, 2003; FERRARA, 2004).

Em condições *in vitro*, o VEGF estimula o crescimento de células endoteliais que se originaram a partir de artérias, veias e vasos linfáticos através de uma ação direta sobre eles. Ele também é um grande indutor da angiogênese em diversos modelos experimentais *in vivo*. Além disso, em camundongos, este fator induz a resposta linfática (NAGY *et al.*, 2002; ALITALO & CARMELIET, 2002).

Estudos apontam que o efeito do VEGF *in vivo*, em organismos adultos, apresenta diferenças: a inibição do VEGF resulta em alterações apoptóticas intensas em camundongos jovens, enquanto que em ratos com idade superior a quatro semanas, a inibição deste fator não apresenta praticamente nenhum efeito. Isto pode ser devido à maturação insuficiente do sistema vascular de camundongos jovens, visto que, suas células endoteliais exibiram dependência significativa de VEGF. Supõe-se que um dos principais eventos que resultam na perda de dependência de VEGF é a formação da parede vascular com envolvimento de periquitos (DOR *et al.*, 2001; GERHARDT & BETSHOLTZ, 2003).

O VEGF é também conhecido como um fator de regulação da permeabilidade vascular. A capacidade deste elemento para melhorar a permeabilidade define o seu importante papel na inflamação e em outros processos patológicos. Em particular,

sabe-se que os vasos do tumor são caracterizados por apresentarem uma permeabilidade aumentada, e esta particularidade contribui para a penetração de células tumorais em redes vasculares e metástase (JIA *et al.*, 2004; SHIBUYA, 2006).

O gene que codifica o VEGF humano consiste em oito exóns separados por sete íntrons. O splicing alternativo do gene de VEGF produz quatro isoformas diferentes: VEGF121, VEGF165, VEGF189 e VEGF206 contendo, respectivamente, 121, 165, 189, e 206 aminoácidos. A isoforma mais frequente, VEGF165, não possui aminoácidos codificados pelo sexto exón, enquanto a isoforma VEGF121 não tem aminoácidos codificados pelos sexto e sétimo exóns. Há dados na literatura sobre a detecção de isoformas menos frequentes, tais como o VEGF145 e VEGF183. Em células que segregam VEGF, a isoforma mais frequente é VEGF165, um homodímero com massa molecular de 45 kD (KRUSSEL *et al.*, 2001; COULTAS *et al.*, 2005).

Uma característica importante de isoformas de VEGF está na sua capacidade para se ligarem a heparina, pois este apenas define se a proteína segregada será acumulada em matriz extracelular ou se será liberada e, assim, tornar-se acessível para interação com outras células. As isoformas VEGF189 e VEGF206 se ligam à heparina com elevada afinidade e estão praticamente acumuladas na matriz extracelular; o VEGF121 não se liga a heparina (é uma proteína livremente difusível) e a isoforma VEGF165 possui propriedades intermediárias (é uma molécula segregada, mas a maior parte da proteína permanece ligada à superfície celular e na matriz extracelular) (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2005).

As isoformas de VEGF associadas à matriz funcionam, para a célula, como um depósito peculiar deste fator de crescimento e, quando necessário, eles são capazes de serem liberados rapidamente devido à clivagem pela plasmina na região C – terminal, com a formação de um fragmento biologicamente ativo. Neste caso, a perda do domínio de ligação à heparina contribui na redução significativa da atividade mitogênica do VEGF. Deste modo, a isoforma VEGF165 é caracterizada por eficientes parâmetros de atividade biológica. Este também está apoiado por dados que demonstram que, em camundongos, a expressão exclusiva da isoforma VEGF120 é inviável (ZHOU *et al.*, 2007; CAI *et al.*, 2010).

A família de VEGF (Figura 10) apresenta seis membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PlGF. Destes, o VEGF-A apresenta maior atividade

no processo angiogênico. Estes fatores podem ativar um ou mais dos receptores conhecidos (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3). As proteínas transmembrânicas VEGFR-1 e VEGFR-2 são receptores de alta afinidade de VEGF com domínio tirosina-quinase e são expressas, talvez exclusivamente, no endotélio vascular (POURGHOLAMI & MORRIS, 2008).

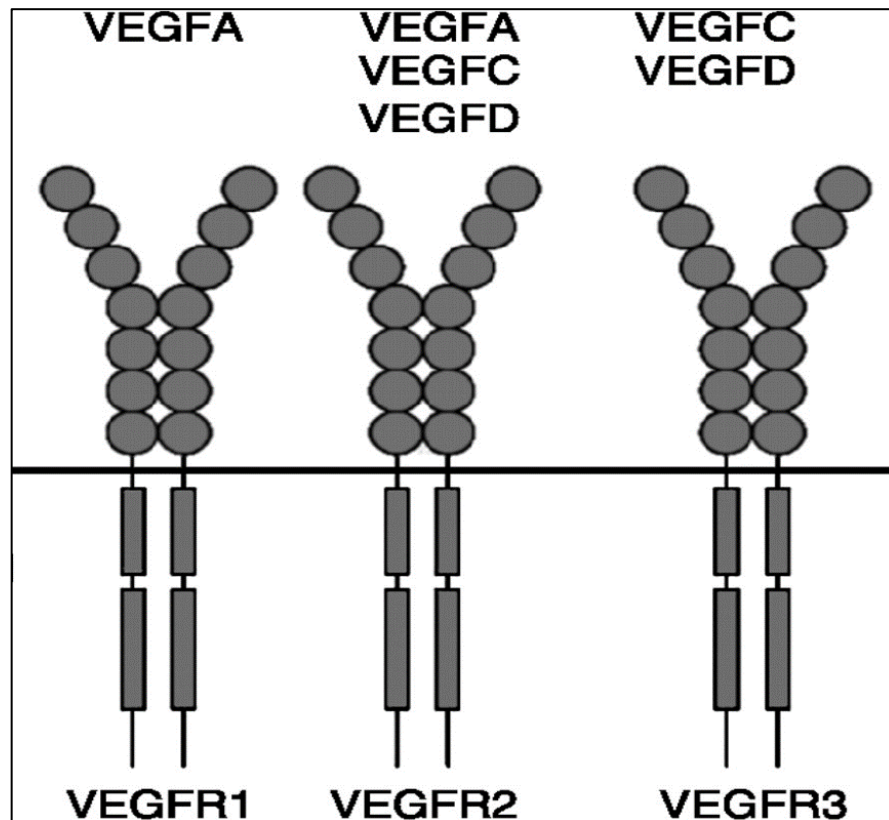


Figura 10. Exemplo da ligação entre as moléculas de VEGF e seus receptores. Fonte: ELLIS & HICKLIN (2008).

A ligação entre VEGF e seus receptores medeiam o processo angiogênico, conduzindo à dimerização do receptor e uma subsequente transdução de sinal (HICKLIN & ELLIS, 2005). Essa ligação inibe o fluxo de cálcio citoplasmático e aumenta sua concentração, altera a forma, e promove divisão e migração celular (FERRARA, 2004).

Com o aumento da permeabilidade venosa, as proteínas plasmáticas vão para o meio extravascular e deste modo, ocorre a coagulação do fibrinogênio e formação de gel de fibrina a qual é utilizada como matriz contingente para o crescimento de novos vasos sanguíneos (FOLKMAN, 1986; DVORAK, 1995).

2.2.1. Angiogênese tumoral

A angiogênese é um fenômeno essencial para o crescimento e sobrevivência de tumores sólidos. Na angiogênese tumoral ocorre a proliferação de vasos sanguíneos que penetram no tecido canceroso fornecendo a este, nutrientes e oxigênio (Figura 11). O processo angiogênico é um requisito não apenas para o crescimento contínuo do tumor, como também para a metástase (FOLKMAN, 2004). Em estágios iniciais, a resposta vascular é fundamental para a continuação do crescimento de tumores sólidos, e nesta fase há uma atenção focada na utilização de inibidores de angiogênese como um adjuvante de outras terapias para a prevenção do desenvolvimento de neoplasias malignas.

Folkman (1976) demonstrou que para um tumor sólido crescer além de 1-2 mm, é necessária a presença de vasos sanguíneos para um maior fornecimento de nutrientes e oxigênio uma vez que as células neoplásicas apresentam um metabolismo acentuado (FOLKMAN, 1976).

A angiogênese tumoral se inicia com a liberação de moléculas de células tumorais que enviam sinais para o tecido hospedeiro, ativando determinados genes que produzem proteínas relacionadas ao crescimento de novos vasos sanguíneos (DVORAK, 2002).

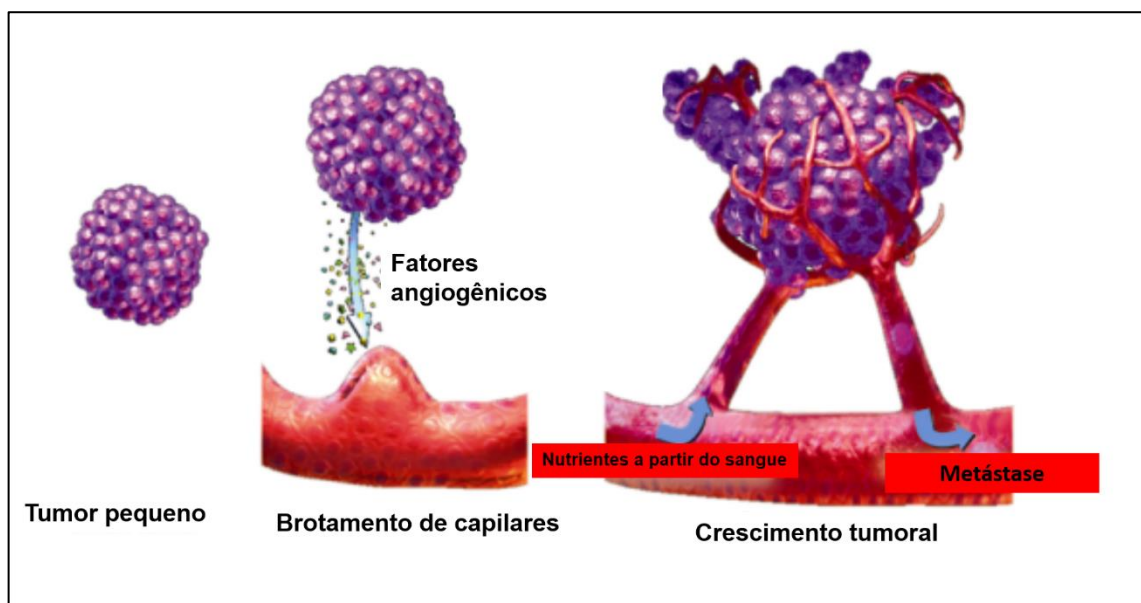


Figura 11. Esquematização do processo de angiogênese tumoral.

Fonte: Adaptado de Servan-Schreiber (2012).

O VEGF é um mediador-chave da angiogênese em cânceres, onde sua regulação é efetuada pela expressão de oncogenes como o *EGF*, pelos fatores TGFalfa e TGF-beta, IGF-1, FGF, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), etc. Estes dados apontam para a possibilidade da regulação autócrina ou parácrina da expressão de VEGF no processo de secreção de qualquer dos fatores acima mencionados pelas células (FOLKMAN, 1972; CARMELIET, 2005).

A hipoxia é também um dos fatores mais importantes na indução da expressão do VEGF. A expressão aumentada do RNAm de VEGF sob condições de baixo teor de oxigênio, causado por diferentes estados patológicos, foi demonstrada. Sabe-se que as células de muitos tumores sólidos em humanos expressam elevadas quantidades de VEGF, estimulando assim, o desenvolvimento de novos vasos no tecido do tumor em crescimento (FORSYTHE *et al.*, 1996; CARMELIET, 2000;).

Os vasos tumorais formados sob a influência de VEGF são estruturalmente e funcionalmente anormais. Eles estão dispostos de forma irregular, tortuosa, e não estão organizados em vênulas, arteríolas e capilares. Além disso, são permeáveis e hemorrágicos, o que leva a alta pressão intersticial (JAIN *et al.*, 2002; VIRREY *et al.*, 2008).

Estas características fazem com que o fluxo sanguíneo do tumor seja baixo, o que resulta em hipóxia e maior produção de VEGF. O papel central deste fator na produção de vasos tumorais se tornou um importante alvo na terapia anticâncer (CARMELIET, 2005; ALVARENGA *et al.*, 2014).

A ativação do fator VEGFR-3 tem sido observada em diferentes tipos de tumores, tais como o melanoma. Nestes casos, os elevados níveis de expressão de VEGFR-3 e seus ligantes (VEGF-C e VEGF-D) estão associados com metástases (KIRKIN *et al.*, 2001; PEPPER *et al.*, 2003). Nas células de melanoma M21, este fator ativa as integrinas $\alpha V\beta 3$, que estão envolvidas na adesão e migração celular (BYZOVA *et al.*, 2000).

Os receptores VEGFR são altamente expressos em casos de mesotelioma (STRIZZI *et al.*, 2001). Também, este fator estimula a proliferação e migração de células leucêmicas humana (DIAS *et al.*, 2000). A indução da ativação e crescimento de células MAPKs (Proteínas quinases ativadas por mitógenos) em linhagens celulares de câncer pancreático humano (VON MARSCHALL *et al.*, 2000). Em células de cancro da mama (T-47D), o VEGF estimula a CPAM (malformação

congénita das vias aéreas pulmonares) e enzimas PI3K (Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato-3-quinase) as quais participam de funções celulares, como o crescimento, proliferação, diferenciação, motilidade celular (PRICE *et al.*, 2001).

Deste modo, percebe-se que além de sua importante função no processo de angiogênese, o VEGF também atua na biologia de várias linhagens celulares tumorais (CARMELIET, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Revisar a influência do processo angiogênico em leucemias.

3.2 Específicos

- Revisar os principais fatores angiogênicos expressos em células leucêmicas;
- Revisar quais são as possíveis estratégias de prognóstico e tratamento de pacientes com leucemia utilizando a terapia angiogênica.

4. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo descritivo, quantitativo utilizando a revisão sistemática de literatura, entre Abril e Junho de 2016. Os principais descritores de busca, pesquisados tanto na língua portuguesa quanto inglesa, foram: angiogênese, leucemia, linfóide, aguda, crônica, mielóide, fatores angiogênicos, terapia antileucêmica e os operadores booleanos and e or.

Foram pesquisadas 482 manuscritos dos quais foram considerados 230 publicações originais, nacionais e internacionais, entre o período de 1960 até 2016, relativas a estudos de ensaio clínico envolvendo experimentos *in vitro* e *in vivo* (caso-controle, coorte) e revisões sobre o processo de angiogênese, tipos de leucemias e fatores angiogênicos envolvidos na origem de tumores. As buscas ocorreram nas seguintes bases de dados: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SciELO), Base de dados especializada em ciências biomédicas e ciências da vida (Medline), Scopus, Pubmed e Drugdex Medicamentos. Foram excluídos artigos que não relatavam a relação entre angiogênese e leucemias ou fatores angiogênicos e leucemias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fatores angiogênicos no desenvolvimento em leucemias

Conforme os dados obtidos nesta revisão, verificou-se que os principais fatores angiogênicos envolvidos nas leucemias são o VEGF, gene *C-myc*, MMPs de matriz, HIF-1 e FGF (Tabela 6).

Tabela 6. Principais fatores angiogênico envolvidos nas leucemias

Fator	Tipo de leucemia
VEGF	LMA linfomas Hodgkin (LH) e não Hodgkin (LNH)
Gene <i>C-myc</i>	LMA
MMPs de matriz	LLA LLC
HIF-1	LMA
FGF	LMA LMC LLC

Em 1997 Perez-Atayde et al., relatou pela primeira vez que o fenômeno angiogênese ocorria na medula óssea em casos específicos da LLA. Pesquisas posteriores relataram também que em determinados parâmetros hematológicos apresentando malignidade acompanhada de angiogênese, havia uma relação com o prognóstico da LLA infantil ou uma contribuição para o desenvolvimento e progressão de casos da LLC (PEREZ-ATAYDE *et al.*, 1997; RIBATTI, 2009).

Normalmente, o processo angiogênico é regulado pelo equilíbrio de citocinas angiogênicas e anti-angiogênicas, e este fenômeno pode ser induzido por intermédio de células leucêmicas na medula óssea. As pesquisas apontam que a leucemia apresente uma possível dependência da angiogênese, o que aumenta a

probabilidade no uso de drogas anti-angiogênicas no tratamento desta doença (SPENCER *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2016).

Existem algumas evidências indicando que diversas drogas antiangiogênicas, como as de segmentação de VEGF ou de seus receptores, são capazes de tratar pacientes com câncer. Além disso, a inibição do VEGF não é unicamente tão eficaz como se pensava. Por conseguinte, é imprescindível o desenvolvimento de alvos mais eficazes para o tratamento de pacientes com leucemia (BROGGINI *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015).

Uma série de fatores de indução da angiogênese tem sido investigados em casos de leucemias, tais como o VEGF, FGF, HGF, TGF, TNF, Ang, fator de indução de hipóxia 1 (HIF-1), MMPs, o gene *c-myc*, a endotelina (ET), integrinas, fator de crescimento da placenta (PIGF, dentre outros (RIBATTI, 2009; SONG *et al.*, 2012; SPENCER *et al.*, 2014). A combinação destes fatores à seus receptores pode promover a divisão de células do endotélio vascular e induzir a formação de novos vasos, o que proporciona condições favoráveis para a ocorrência e progressão de tumores. Somado a isso, a relação entre os fatores angiogênicos em casos de leucemia, tem evidenciado as funções de tais fatores na modulação dos eventos de proliferação, diferenciação e apoptose (WANG *et al.*, 2015).

5.1.1. O papel do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) em leucemias

O VEGF é o fator pró-angiogênico melhor caracterizado até o momento, e sua primeira purificação ocorreu a partir de cultura *in vitro* de células bovinas foliculo-estreladas (FERRARA *et al.*, 1989; JAIN, 2014).

Após a detecção de sua atividade mitogênica em células endoteliais vasculares, o VEGF foi considerado não apenas um coagente mitogênico altamente específico nas células do endotélio como também um fator de promoção da permeabilidade vascular (WANG *et al.*, 2015).

Na figura 12, verifica-se que o VEGF pode atuar com alta eficiência e especificidade sobre as células do endotélio vascular e promover a regeneração, além de aumentar a permeabilidade vascular através de três receptores da tirosina quinase (TKR): VEGFR-1 (ou Flt-1), VEGFR-2 (ou KDR / encontram predominantemente expressos no endotélio vascular. O receptor VEGFR-1 é

também expresso em outros tipos celulares, incluindo células estaminais hematopoiéticas (CEHs), células musculares lisas vasculares, monócitos e células leucêmicas (SATO, 2008). Contudo, o receptor VEGFR-2 é expresso, principalmente, em células progenitoras endoteliais (CPEs) e megacariócitos (LANUTI *et al.*, 2016).

A regulação da formação de vasos linfáticos (linfangiogênese) ocorre de modo dependente da ligação de homólogos aos receptores VEGF, VEGF-C, VEGF-D e VEGFR-3, que é largamente restrita a células endoteliais linfáticas (MEDINGER & PASSWEG, 2014). Além disso, a elevada expressão do receptor VEGF-D foi detectada tanto em linfomas Hodgkin (LH) e não Hodgkin (LNH), quanto em células Reed-Sternberg (RS) com um elevado número de microvasos tumorais, sugerindo um papel desta citoquina na angiogênese (BARDELLI *et al.*, 2007).

A indução da angiogênese tumoral bem como a interrupção do processo angiogênico se tornou uma característica na investigação do câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Como o inibidor da angiogênese tumoral, o VEGF pode aumentar significativamente a permeabilidade vascular. Muitas linhagens celulares de leucemia e células primárias podem sintetizar e secretar este fator, o qual modula o comportamento biológico maligno de células leucêmicas por loops de feedback positivo: sinalização parácrina e autócrina (DIAS *et al.*, 2000; FRAGOSO *et al.*, 2007).

O VEGF secretado por células leucêmicas interage com os receptores das células endoteliais as quais passam a produzir fatores de crescimento, tais como o fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) que atua sobre as células leucêmicas aumentando sua proliferação e resistência aos medicamentos, ou ainda sobre os receptores da superfície de células autólogas para aumentar a atividade de proliferação autóloga (DIAS *et al.*, 2001).

A interação funcional entre o receptor VEGF-A ao receptor de formil peptídeo (FPRL1) mediada pela secreção do fator de crescimento do tecido conjuntivo (GTGF) foi demonstrada por alguns pesquisadores (LEE *et al.*, 2015). O CTGF ativa de modo direto os sinais do FPRL1, gerando um aumento nos níveis de Ca²⁺ intracelular e no sinal da quinase controlada pela sinalização extracelular (ERK) fosforilada (BAGHERI *et al.*, 2015).

Pesquisas detectaram que o receptor VEGF-2 desempenha um papel importante na angiogênese induzida por VEGF e a ligação entre este fator e o

receptor Flt-1 pode ativar proteínas MAPKs, quinase C (PKC), RAS ou induzir a proliferação de células endoteliais vasculares (BREKKE *et al.*, 2000).

Até o momento foi provado que o VEGF é o único fator de crescimento para a angiogênese, enquanto outros fatores tais como FGF e PDGF podem atuar, com menor especificidade, em inúmeros tipos celulares concomitante às células do endotélio vascular. Este fator pode regular o desenvolvimento de células-tronco hematopoiéticas, na remodelação da matriz extracelular e na regeneração de citocinas inflamatórias (MADRIGAL *et al.*, 2014).

A ativação de VEGFR-2, também, desempenha uma função necessária e suficiente na mediação da angiogênese VEGF- dependente e na indução da permeabilidade vascular. Os receptores VEGF-A (VEGFR-1 e VEGFR-2) atuam na angiogênese patológica, incluindo a angiogênese tumoral. Os fatores VEGF-C e D, juntamente com seu receptor VEGFR-3, podem regular a angiogênese durante o processo embrionário, além de atuarem, principalmente na regulação da linfangiogênese (LEE *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2016)

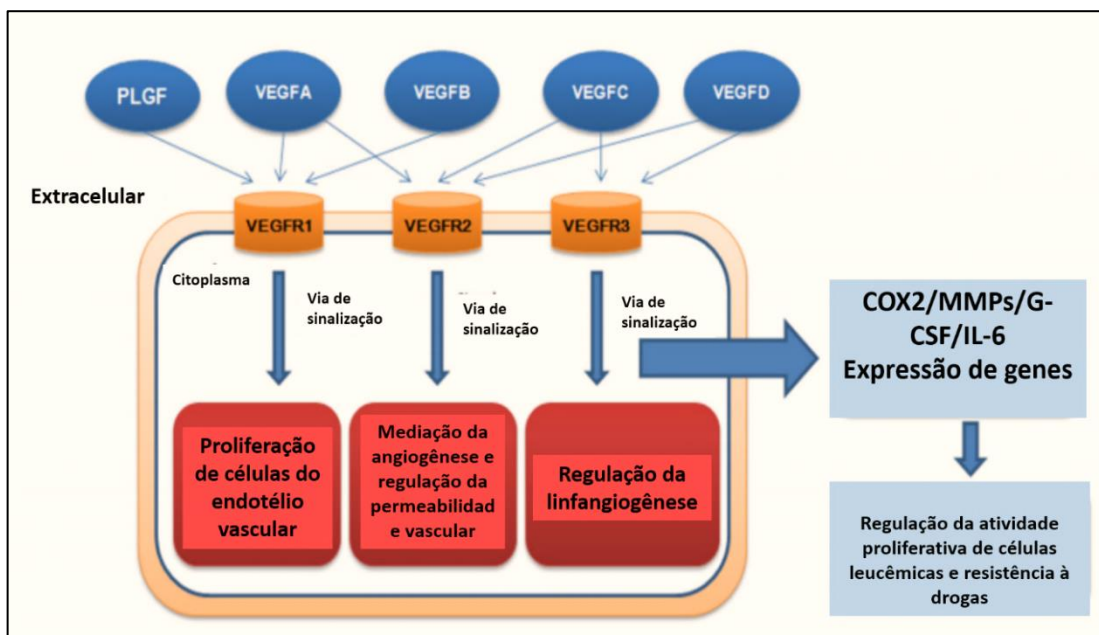


Figura 12. O papel do VEGF na progressão da leucemia. **Fonte:** Adaptado de HAN *et al.* (2016).

O VEGF está intimamente relacionado com as MMPs, através da complexidade deste fator como mediador da expressão regular da MMP-9 (WOENNE *et al.*, 2010). Em outras pesquisas, esta relação tem contribuição para a

angiogênese tumoral e metástases, com uma parcial associação no aumento da secreção de VEGF (WU *et al.*, 2015). Esta combinação de VEGF e MMPs tem sido utilizada em ensaios clínicos, sendo considerada como um possível alvo terapêutico. Algumas evidências sugerem que ela também está envolvida na proliferação, diferenciação anormal e no prognóstico da LMA (SONG *et al.*, 2012; HAOUAS, 2014). A regulação positiva destas citocinas pro-angiogênicas na densidade de microvasos, na medula e plasma também reforça esta teoria (MEDINGER & PASSWEG, 2014).

Simultaneamente, as citocinas representativas, VEGF e seus receptores, são expressas em células brancas informes (blastos) de LMA, em nichos de osteoblastos e na circulação periférica (LEE & KIM, 2014). Neste sentido, uma abordagem terapêutica focada na ação anti-angiogênica tem se tornando cada vez mais eficaz e promissora através do uso de imunomoduladores, por exemplo, anticorpos monoclonais anti-VEGF, inibidores de VEGFR e Histonas (MARINACCIO *et al.*, 2014; KON *et al.*, 2015). Devido a isso, a terapia com uso de fatores anti-angiogênicos baseada no princípio da inibição da função fisiológica de VEGF tornou-se o hotspot das oncoterapias. Para exemplo, o lloretib (ou ABT-348) é um novo inibidor de Aurora quinases (pode inibir a ação de VEGF, PDGF e famílias de receptores tirosina-quinase) (GARCIA-MANERO *et al.*, 2015).

A heparina sulfato de glucosamina 3B1 pode promover a angiogênese e a proliferação celular através de uma indução de VEGF em células de LMA. Este fato tem contribuído positivamente na progressão da LMA e tais atividades estão associadas com a indução na expressividade do VEGF (ZHANG *et al.*, 2015). O composto Genosídeo (Rg3) é usado não apenas como uma dorga antiangiogênica na terapia anticâncer, mas também exibe, em parte, um efeito anti-leucêmico, devido a sua atividade anti-angiogênica na inibição das vias PI3K, Akt e ERK1 as quais atuam na regulação da expressão de *HIF-1 α* e VEGF (ZHENG *et al.*, 2014). A histona-desacetilase (HDAC) também atua na inibição da angiogênese tumoral através de regulação negativa de fatores angiogênicos (31).

O mecanismo antiangiogênico induzido pelo ácido valproico (VPA) está associado com a supressão de VEGF e de seus receptores (ZHANG *et al.*, 2014). Além disso, o uso combinado da histona deacetilase, com o inibidor VPA, ácido all-trans-retinóico (ATRA), ácido desoxirribonucléico polimerase- α e do inibidor citarabina (Ara-C) é considerado atualmente o tratamento mais viável na

estabilização da LMA, visto que seus efeitos anti-proliferativos e a modulação na liberação de mediadores angiogênicos de células endoteliais são promissores (KVESTAD *et al.*, 2014).

Outro exemplo é o Foretinib o qual consiste em uma cinase de múltiplos inibidores e quando submetida a ensaios clínicos tem apresentado ação inibitória na atividade de VEGFR-2 (HUYNH *et al.*, 2012). Sua atividade pode ser capaz de inibir o VEGF-A, VEGF-C, angiopoetina-2, reduzindo a expressão de VEGFR-2, VEGFR-3 e a ativação de TIE-2 (CHEN *et al.*, 2015). No entanto, apesar dos receptores de VEGF apresentarem um potencial mecanismo de retardo da LMA, o inibidor de tirosina quinase endotelial, diranib (AZD2171) atua contra os receptores VEGF e nas respostas dos fatores KDR e FLT-1, e não pode ser confirmados em outros grupos (MATTISON *et al.*, 2015).

A compreensão dos componentes do complexo celular da medula óssea pode levar à descoberta de novos fatores extrínsecos que sejam responsáveis pela iniciação e progressão da leucemia. A ativação de células endoteliais pelo VEGF-A tem favorecido a proliferação de células leucêmicas em níveis elevados, além de aumentar a aderência de células do endotélio nos casos de leucemia. O desenvolvimento de drogas que têm por alvo a ativação do nicho vascular poderia provar ser uma terapia eficaz em combinação com outros agentes quimioterapêuticos (MARINACCIO *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2015).

Por outro lado, a alta expressão de VEGF-C está associada com a quimioresistência e indica um prognóstico adverso na LMA. O VEGF-C induz a expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), promovendo, deste modo, uma resistência a quimioterapia. Além disso, a ET1 induz a expressão do RNAm da COX-2. A regulação entre VEGF-C / COX-2 e ET-1 representa um potencial alvo para melhorar os casos de resistência à quimioterapia em pacientes com LMA (HUA *et al.*, 2014).

A lenalidomida (Revlimid®) é um agente imunomodulador clinicamente ativo em pacientes com LLC e seu efeito ant-iLLC é mediado pela alteração de elementos micro-ambientais, o que implica na modulação de vários fatores relacionados com a angiogênese e a interrupção da relação de células de LLC com células endoteliais (BLUMEL & BROADWAY-DUREN, 2014). Como efeito, o ambiente leucêmico se torna altamente enriquecido à estímulos linfangiogênicos, e a inibição de VEGFR-3 restaura a função das células NK. O bloqueio de VEGFR-3 modula a função destas

células, proporcionando a possibilidade de abordagens terapêuticas avançadas utilizando células imunitárias contra a leucemia mielóide (LEE *et al.*, 2014).

Compreender a caracterização funcional de fatores linfáticos na medula ossea e em LMA também pode apresentar um potencial alvo na interrupção do transplante de células-tronco, além de melhorar a função de células imunitárias através da modulação do microambiente dos tumores (LEE & KIM, 2014).

5.1.2. Gene *C-myc*: um importante fator angiogênico envolvido nas leucemias

O gene *c-myc* é um membro da família dos proto-oncogenes *Myc*, sendo um transcrito de regulação pleiotrópica. Ele pode induzir a instabilidade do genoma e afetar a ocorrência e progressão de tumores de forma direta ou indireta, por isso, desempenha um papel importante na proliferação e morte celular programada (WANG *et al.*, 2014). Sua sequência específica de DNA é responsável pela transcrição do Zíper de Leucina e da alça Hélice. Este gene pode se heterodimerizar mediante contato com a proteína correspondente, MAX, e estimula a transcrição de alguns genes que incluem *ODC*, *ECA39*, *eIF4E*, *CDC25*, *CAD*, *CDK4*, *eIF4G1*, *hTERT* e *CCND1* (LIN *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, descobriu-se que o gene *c-myc* também atua como um importante fator da angiogênese tumoral devido a sua relação com a expressão de VEGF (HAN *et al.*, 2016). Existe uma região de ligação deste gene, 271bp, a qual promove a expressão de VEGF. Esta região, após um processo de mutagênese, pode favorecer maior expressividade de VEGF em condições hipóxicas através de uma co-participação de *c-myc* e, posteriormente, promover a angiogênese e tumorigênese (MEZQUITA *et al.*, 2005).

Alguns estudos também esclarecem que a angiogênese tumoral pode ser promovida por *miRNAs* que induzem a ativação de *c-myc* e da IL-1 β , representando, deste modo, o afeito deste gene como indutor da iniciação de angiogênese (SHCHORS *et al.*, 2006). Além disso, este gene é altamente expresso em linhagens celulares HL-60 (células humanas de leucemia promielocítica) e está relacionado com a proliferação e a diferenciação de células leucémicas (CHIERI *et al.*, 2008).

O gene *c-myc* pode ser, incomumente, ativado pela amplificação do rearranjo de outros genes e seu nível de expressão está relacionado ao estado de crescimento de células, sendo altamente expresso em estágio indiferenciado. Este

gene é um alvo promissor no desenvolvimento de terapias, em virtude de suas atividades oncogênicas visto que sua hiperexpressão é verificada na maioria dos cânceres humanos (MISHRA *et al.*, 2015).

A tentativa de ligação de *c-myc* em determinados genes que inibem a ação de pequenas moléculas foi testada, e com isso se descobriu que alguns destes genes foram eficazes na interrupção de interações de proteínas essenciais ao DNA (RASKATOV *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013).

Estudos apontam que o aumento da expressão *c-Myc* desempenha um papel importante na leucomogênese. Em casos de LMA, este gene é responsável pelo controle direto na expressão do gene *EZH2* o qual participa do recrutamento de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) e localiza no DNA o ponto de metilação. Durante a diferenciação de células da LMA, ocorre uma indução simultânea na redução dos níveis de *c-Myc* e *EZH2*. Algumas variações em *EZH2*, presentes na LMA, dependem, principalmente, do controle transcricional de *c-Myc* (SALVATORI *et al.*, 2011).

Os macrófagos associados a tumores (TAM – tumor associated macrophages) também podem expressar o gene *c-myc*, regulando suas atividades pró-tumorais, *in vivo*, e fenóticas. A função de *c-myc* em TAM pode controlar, portanto, o crescimento tumoral o que indica que este gene se tornou um alvo ideal nas terapias genéticas de combate a tumores e leucemias (PELLO & ANDRES, 2013).

5.1.3. Envolvimento de metaloproteinases de matriz (MMPs) em malignidades hematológicas

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma série de proteinases de zinco-dependente do dedo com elevada homologia. Existem três domínios comuns nas MMPs: pro-péptido, domínio catalítico e hemopexina como domínio C-terminal (NAGASE *et al.*, 2006). De acordo com as características específicas das sequências de aminoácidos e substratos, as MMPs podem ser classificadas em quatro tipos principais: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-e 18), gelatinases (MMP-2, MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), matrilisinas (MMP- 7, MMP-26). As MMPs podem degradar a matriz central

extracelular o que pode representar um importante sinal na iniciação da angiogênese, invasão e metástases de tumores (DERYUGINA & QUILEY, 2006).

Alguns estudos têm relatado que a expressão MMPs está relacionada com o potencial metastático de vários tumores humanos e desempenham um papel essencial durante o desenvolvimento da Leuco-diapedese e da coagulação intravascular disseminada (DCI) (TSCHESCHE, 1997; RIES *et al.*, 1999). Para modulação das MMPs ocorrer, existem importantes fatores de transcrição, tais como o ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1). Os fatores de transcrição PEA3, NFkB e Transdutores de sinal e ativadores de transcrição (TSAT), e os demais fatores envolvidos na regulação da expressão de MMPs, podem regular, também, os níveis da transcrição de VEGF (YAN & BOYD, 2007).

A compreensão das propriedades invasivas de células tumorais em humano revela a relação com a baixa expressão de inibidores metaloproteinases de tecido (TIMP), incluindo os TIMP-1, 2, 3 e 4. Além disso, a expressão dos níveis de TIMP pode afetar diretamente o nível de atividade das MMPs (NAGASE *et al.*, 2006). A liberação das várias MMPs e TIMPs pode ocorrer por células primárias da LMA e afetar o comportamento das células leucemicas (REIKVAM *et al.*, 2010).

Quanto ao uso clínico, a quantidade de moléculas na matriz extracelular, incluindo os tipos IV, V, colágenos XI e laminina também são digeridas pelas MMPs que estão relacionadas com a angiogênese e metástases de tumores, por exemplo, a MMP-1, que atua como um fator de regulação negativa na angiogênese e desenvolvimento e a MMP-13 que promove a secreção de VEGF e induz a angiogênese tumoral *in vivo* (JOST *et al.*, 2006; KUDO *et al.*, 2012). As MMP-3, MMP-10 e MMP-11 podem ativar células tumorais (KREN *et al.*, 2006).

Devido à falta de domínio hemopexina, as matrilisinas (MMP-7 e -26) podem ser consideradas como MMPs, e a MMP-7 não só desempenha um papel importante na degradação de proteínas da matriz extracelular, como também participa da ativação, degradação, abscisão e outros processos bioquímicos de proteínas da matriz não-extracelular, as quais são essenciais para o desenvolvimento de angiogênese tumoral (DERYUGINA & QUILEY, 2006).

As MMPs são, em geral, hiperexpressas em tumores e a superexpressão das gelatinases, incluindo MMP-2 e MMP-9 está sempre acompanhada pelo crescimento, metástase e angiogênese do tumor (PATTERSON *et al.*, 2001).

Alguns estudos sobre as funções de MMP-2 e MMP-9 em malignidades hematológicas estão disponíveis. As MMP-9 presentes no plasma podem contribuir na evolução clínica de pacientes com LLC, auxiliando no prognóstico deste tipo de leucemia (AMIGO-JIMEZEZ *et al.*, 2014). Em pacientes com a Síndrome Mielodisplásica (MDS), as MMPs constituem uma ferramenta útil para o diagnóstico e podem ser um possível alvo no tratamento da doença (CHAUDHARY *et al.*, 2016).

As células de LMA geralmente apresentam uma alta secreção de diversas MMPs (MMP-2 e MMP-9, TIMP1 e VEGF) (MARINACCIO *et al.*, 2014). Além disso, a liberação proteolítica do VEGF a partir da matriz tumoral pela MMP-9, desempenha um importante papel na modulação da proliferação de células de leucêmicas (CHAUDHARY *et al.*, 2016). É possível que o fator HIF-1 esteja intimamente relacionado com a expressão de VEGF e MMP-9 (SEMENZA, 2013). O VEGF pode reduzir significativamente a produção de MMP-9 e a produção de MMP-9 em células de leucemia e do tipo B (WOENNE *et al.*, 2010).

O bloqueio das MMPs pode inibir por completo a produção de VEGF e reduzir significativamente o volume da vasculatura. Foi confirmado em alguns estudos que a ativação de MMP-2 é dependente do inibidor TIMP-2, visto que, quando a concentração de TIMP-2 aumenta, ele se combina com TIMP-1 e ativa a MMP-2, o que leva a uma possível origem do evento de ativação tumoral (FRIEHS *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2015). Devido ao papel das MMPs no desenvolvimento de leucemias, os inibidores específicos de sua atividade podem ser constituintes da terapia anticancer (FINGLETON, 2007).

Mais atenção deve ser dada sobre as MMPs como uma estratégia anti-leucêmica devido à importância do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. As MMPs influenciam direta e indiretamente no desenvolvimento da vasculatura mediada pelo VEGF (HATFIELD *et al.*, 2010).

5.1.4. Relações entre VEGF e HIF-1 na malignidade hematológica

O fator 1 induzido por hipóxia (HIF-1) é o regulador central da resposta à mudanças na concentração de oxigênio e tem um papel fundamental nos processos fisiológicos e patológicos em humanos. Ele é capaz de formar um heterodímero com o translocador nuclear do receptor de aril hidrocarbono, ARNT, e se ligar ao

elemento responsivo a hipóxia (HRE) da eritropoietina humana. Este fator ativa a expressão de inúmeros genes em resposta a hipóxia (PENG *et al.*, 2015).

Em condições de hipóxia, o fator HIF-1 se torna estável e pode interagir com o fator auxiliar de co-estimulação CBP / P300 para regular a atividade de oncogenes (LANDO *et al.*, 2002). Este fator atua na regulação de uma variedade de genes que atuam no metabolismo anaeróbico da glicose, além de promover a angiogênese em tecidos sujeitos a isquemia pelo aumento da expressividade de VEGF (Figura 13) (KIRITO *et al.*, 2005).

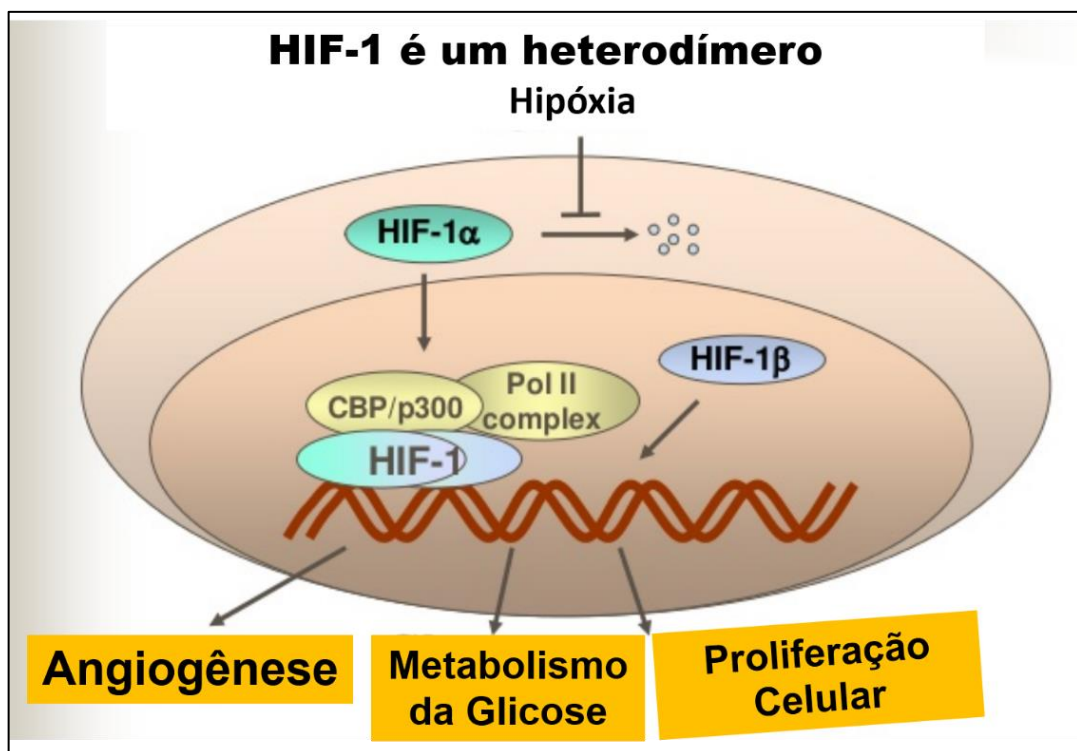


Figura 13. Modelo esquemático da participação de HIF-1 na condução de diferentes processos sob condições anaeróbicas. **Fonte:** Adaptado de Wang *et al.* (2012).

O fator HIF-1 pode ser regulado pela Proteína inibitória com domínio (PAS), apresentando uma atividade pró-apoptótica através de outras proteínas que interagem com membros da família Bcl-2. Em condições aeróbicas, os resíduos de prolina presentes no HIF-1 α podem ser hidroxilados de modo que ocorre um reconhecimento pela enzima E3 ubiquitina ligase, contendo o gene supressor de tumor VHL, o qual sofre degradação proteossômica (WANG *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2012).

O HIF-1 não só estimula a produção de angiopoietinas (ang), mas também regula o nível de expressão dos receptores de Ang. Este fator também desempenha um papel importante no metabolismo da matriz extracelular e apresenta outros efeitos após ativação, tais como a promoção de mudanças adaptativas no metabolismo celular e a estimulação de células renais na produção de eritropoietina que irá agir como o regulador principal na indução da angiogênese em tumores malignos (NOGUERA *et al.*, 2009; O HIF-1 também influencia o crescimento e desenvolvimento de células tumorais através do aumento da expressividade de genes alvo, incluindo o de expressão de VEGF (QUAIL & JOYCE, 2013; SPENCER *et al.*, 2014).

Uma característica marcante do nicho hematopoiético é o baixo nível de oxigênio onde se torna necessária a condição de hipóxia para a manutenção a longo prazo de células estaminais / progenitoras hematopoiéticas. Sabe-se hoje que em tumores sólidos, a hipóxia provoca alterações metabólicas intrínsecas e modificações no microambiente tumoral, tais como a estimulação da angiogênese, pela ativação de do fator HIF-1 (BENITO *et al.*, 2013; QUAIL & JOYCE, 2013)

Considerando que a leucemia não se trata de um tumor "sólido", o papel de oxigênio nesta condição é pouco investigado. No entanto, estudos recentes apontam que a hipóxia influencia a proliferação e diferenciação de células leucêmicas, além da resistência à quimioterapia. O papel das proteínas HIF permanece, contudo, controverso visto que os HIFs podem ser considerados tanto como oncogenes ou genes supressores tumorais, dependendo do estudo e modelo (ELIASSON *et al.*, 2010; SEMENZA, 2013).

Outras pesquisas evidenciam que o HIF-1 promove o desenvolvimento da angiogênese e metástase, podendo apresentar sua concentração aumentada por hipóxia em células primária de LMA. Da mesma forma, a baixa expressão de HIF-1 α e a liberação de diversas citocinas pró-angiogênicas, por células leucêmicas, pode ser induzida por uma concentração reduzida de oxigênio (YAMAKUCHI *et al.*, 2010; TABE & KONOPLEVA, 2014).

Em algumas pesquisas foi relatado que o fator HIF-1 pode favorecer a diferenciação de células de LMA através de um mecanismo independente de transcrição, inibindo o progresso deste tipo de leucemia (GAO *et al.*, 2015). Estudos mostraram que a supressão de HIF-1, através da expressão de miR-17 e miR-20a, pode paralisar a diferenciação induzida por este fator em condições de hipóxia em

células de LMA. Além disso, o miR-17 e miR-20 inibem imediatamente a expressão da p21 e STAT3 (HE *et al.*, 2013).

Algumas observações indicaram que o HIF-1, desempenha um importante papel na sobrevivência de todas as células brancas informes, podendo ser um condutor no mecanismo de quimioresistência (SPENCER *et al.*, 2014).

5.1.5. Relação entre o Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) e leucemias

O fator de crescimento fibroblástico, FGF, está envolvido em diferentes etapas do desenvolvimento de um organismo, como na proliferação e diferenciação, de tecidos. Seu envolvimento no processo angiogênico e na reparação de tecidos, apresenta grande relevância nos estudos clínicos. A família proteica FGF é composta ao menos 23 membros, tais como o FGF ácido (aFGF ou FGF1) e FGF básico (bFGF ou FGF2) os quais são amplamente estudados em virtude de suas variadas funções (NIES *et al.*, 2015). Eles se ligam à heparina, a qual aumenta sua atividade biológica e os protegem da proteólise. Tanto o FGF1 quanto FGF2 atuam sobre o mesmo receptor, no entanto a afinidade de aFGF é cerca de 30 a 100 vezes maior do que a de bFGF (MOHAMMADI *et al.*, 2005).

O FGF é um forte indutor da síntese de DNA em diferentes tipos celulares nas linhagens do mesoderma e neuroectoderma. Ele também possui atividades de quimiotaxia e mitogênicas. Vários estudos têm demonstrado que o bFGF pode estimular e regular a proliferação e diferenciação de vários inúmeros tipos de células derivadas da mesoderme e neuroectoderme, tais como células epiteliais, mioblastos, osteoblastos e células da glia que desempenham um importante papel na embriogênese e cicatrização tecidual, além de regular a expressão de VEGF (NIES *et al.*, 2015; BRYAN *et al.*, 2008; SCHNEIDER *et al.*, 2011).

Considerado como um fator mitogênico de quimiocinas (citocinas pró-inflamatórias) e de células do endotélio vascular, o bFGF é liberado extracelularmente e pode se ligar à diferentes receptores da superfície de células endoteliais incluindo TKR, moléculas de adesão celular (CAMs) e proteoglicanos de heparam sulfato para ativar sua atividade vasculogênica (HARMER *et al.*, 2004).

O bFGF também pode ativar a sinalização da via P13K onde ocorre a inibição a apoptose de células do endotélio vascular e promoção da angiogênese (NAKASHIO *et al.*, 2002). Tal como uma quimiocina, o bFGF pode atrair diferentes

tipos de células por quimiotaxia e induzi-las a produzir colagenases (enzimas proteolíticas) favorecendo a proliferação e migração de células do endotélio vascular, e a degradação de proteínas de matriz extracelular para induzir a angiogênese (PRESTA *et al.*, 2005).

A regulação positiva de bFGF é verificada em casos de LMA, LMC e LLC, envolvendo, na maior parte dos casos, um prognóstico ruim. As mutações no domínio quinase são um mecanismo comum de resistência na LMC, por exemplo, contudo, o mecanismo de resistência na ausência de mutações ainda não está elucidado (KREJCI *et al.*, 2001; SCHNEIDER *et al.*, 2011). Alguns ensaios apontam que o FGF2 promove a resistência ao imatinibe *in vitro*, através da ativação de proteínas-quinases ativadas por mitógenos pelo receptor FGF 3/RAS/c-RA. Além disso, este fator é encontrado em porções significativamente reduzidas em indivíduos que fazem uso do Ponatinibe, sugerindo que a inibição dos receptores de FGF podem interromper a resistência mediada por FGF-2 (TRAER *et al.*, 2014).

6. CONCLUSÃO

O conhecimento dos fatores angiogênicos, como VEGF, MMPs e FGF, tem demonstrado que estes atuam não apenas na iniciação, como na progressão, metastase e apoptose de células de tumores sólidos e em leucemias. Neste sentido, a melhor compreensão das funções destes fatores na atualidade, tem apontado que estes podem favorecer a terapia-alvo com base no processo de angiogênese em leucemias. O desenvolvimento de inibidores da angiogênese tumoral para restringir o crescimento e metástase tornou-se uma nova abordagem terapêutica eficaz para a oncoterapia.

Nos últimos anos, a oncoterapia envolvendo a combinação de múltiplos alvos forneceu a direção de novas pesquisas com agentes anti-angiogênicos. Embora tais pesquisas ainda estejam confinadas à base de experimentos e ensaios clínicos sem uma reflexão de seu real valor na prática clínica, através do desenvolvimento de agentes anti-angiogênicos, o aprofundamento e desenvolvimento de terapias oncológicas com compostos anti-angiogênicos poderá abrir uma nova área no tratamento de doenças hematológicas

7. REFERÊNCIAS

ADRIÁN, F.J.; DING, Q.; SIM, T.; VELENTZA, A.; SLOAN, C.; LIU, Y. 2006. Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. *Nat Chem Biol* 2:95-102.

AGNUSDEI, V.; MINUZZO, S.; FRASSON, C.; GRASSI, A.; AXELROD, F.; SATYAL, S. 2014. Therapeutic antibody targeting of Notch1 in T-acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Leukemia* 28(2): 278-88.

ALITALO, K.; CARMELIET, P. 2002. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*, 1, 219-227.

ALVARENGA, E. C.; CAIRES, A.; LADEIRA, L. O.; GAMERO, E. J. P.; ANDRADE, L. M.; PAZ, M. T. L.; LEITE, M. de F. 2014. Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. *Ciência e Cultura*, 66(1).

AMIGO-JIMÉNEZ, I.; BAILÓN, E.; UGARTE-BERZAL, E.; AGUILERA-MONTILLA, N.; GARCÍA-MARCO, J.A.; GARCÍA-PARDO, A. 2014. Matrix metalloproteinase-9 is involved in chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine and arsenic trioxide. *PLoS One* 9(6):e99993.

ARBER, D.A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J.; BOROWITZ, M.J. 2016. Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127: 2391–2405.

AULT, P.; KANTARJIAN, H.; O'BRIEN, S. 2006. Pregnancy among patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinibe. *J Clin Oncol*. 24:1204–1208.

BAGHERI, A.; SOHEILI, Z.S.; AHMADIEH, H.; SAMIEI, S.; SHEIBANI, N.; ASTANEH, S.D.; KANAHI, M.R. 2015. Simultaneous application of bevacizumab and anti-CTGF antibody effectively suppresses proangiogenic and profibrotic factors in human RPE cells. *Mol Vis*. 21:378-90.

BAILEY, H.D.; INFANTE-RIVARD, C.; METAYER, C.; CLAVEL, J.; LIGHTFOOT, T.; KAATSCH, P.; ROMAN, E. 2015. Home pesticide exposures and risk of childhood leukemia: Findings from the childhood leukemia international consortium. *Inter J Cancer* 137(11):2644-63.

BARDELLI, M.; LEUCCI, E.; SCHÜRFFELD, K.; BELLAN, C.; PASSIATORE, G.; ROCCHIGIANI, M.; BARTOLOMMEI, S.; ORLANDINI, M.; ZAGURSKY, J.; LAZZI, S. 2007. De Falco G, Tosi P, Oliviero S, Leoncini L. VEGF-D is expressed in activated lymphoid cells and in tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Leuk Lymphoma*. 48: 2014-2021.

BARNES, D.J.; PALAIOLOGOU, D.; PANOUSOPOULOU, E.; SCHULTHEIS, B.; YONG, A.S.; WONG, A. 2005. Bcr-Abl expression levels determine the rate of

development of resistance to imatinibe mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* 65:8912-9.

BASSAN, R.; HOELZER, D. 2011. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 29:532–43.

BASSAN, R.; MAIANO, E.; CORTELAZZO, S. 2016. Lymphoblastic lymphoma: an updated review on biology, diagnosis, and treatment. *Eur J Haematol.* 96 (5): 447-60.

BASSIL et al. 2007. Cancer health effects of pesticides: Systematic review. Cancer health effects of pesticides: Systematic review. *Can Fam Physician.* 53(10): 1704–1711.

BENITO, J.; ZENG, Z.; KONOPLEVA, M.; WILSON, W.R. 2013. Targeting hypoxia in the leukemia microenvironment. *Int J Hematol Oncol* 2(4):279–88.

BLUMEL, S.; BROADWAY-DUREN, J. 2014. Approaches to Managing Safety With Lenalidomide in Hematologic Malignancies. *J Adv Pract Oncol.* 5(4):269-79.

BOULTWOOD, J. 2001. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and LYMPHOMA. *J CLIN PATHOL* 54:512–516.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria N° 705, de 12 de Agosto de 2014. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2014/prt0705_12_08_2014.html>.

BREKKE, R.A.; OVERHOLSER, J.P.; STASTNY, V.A.; WALTENBERGER, J.; MINNA, J.D.; THORPE, P.E. 2000. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Fik- 1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res.* 60:5117-5124.

BROGGINI, M.; MARCHINI, S.V.; GALLIERA, E.; BORSOTTI, P.; TARABOLETTI, G.; ERBA, E.; SIRONI, M.; JIMENO, J.; FAIRCLOTH, G.T.; GIAVAZZI, R.; D'INCALCI, M. 2003 Aplidine, a new anticancer agent of marine origin, inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and blocks VEGF-VEGFR-1 (flt-1) autocrine loop in human leukemia cells MOLT-4. *Leukemia* 17:52–59.

BROWN, L.F.; DETMAR, M.; TOGNAZZI, K., ABU-JAWDEH, G., IRUELA-ARISPE, M.L. 1997. Uterine smooth muscle cells express functional receptors (flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest.* 76:245–255.

BRYAN, B.A.; WALSH, T.E.; MITCHELL, D.C; HAVUMAKI, J.S.; SAINT-GENIEZ, M.; MAHARAJ, A.S.; MALDONADO, A.E.; D'AMORE, P.A. 2008. Coordinated vascular endothelial growth factor expression and signaling during skeletal myogenic differentiation. *Molecular biology of the cell.* 19:994-1006.

- BURMEISTER, T.; GOKBUGET, N.; SCHWARTZ, S.; FISCHER, L.; HUBERT, D. 2009. Clinical features and prognostic implications of TCF3-PBX1 and ETV6-RUNX1 in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologic* 95(2):241-6.
- BYRD, J.C. 2015. Introduction to a series of reviews on chronic lymphocytic leucemia. *Blood* 126:427.
- BYZOVA, T. V.; GOLDMAN, C. K.; PAMPORI, N.; THOMAS, K. A.; BETT, A.; SHATTIL, S. J.; PLOW, E. F. 2000. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell*, 6(8): 51-860.
- CAI, C.; BÖTTCHER, M.C.; WERNER, J.A.; MANDIC, R. 2010. Differential expression of VEGF121, VEGF165 and VEGF189 in angiomas and squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Anticancer Res.* 30(3): 805-810.
- CALABRETTA, B.; PERROTTI, D. 2004. The biology of CML blast crisis. *Blood* 103:4010–22.
- CALIN, G.A.; CIMMINO, A.; FABBRI, M. 2008. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(13): 5166–5171.
- CALIN, G.A.; CROCE, C.M. Chronic lymphocytic leukemia: interplay between noncoding RNAs and protein-coding genes. *Blood* 114:4761-4770.
- Calin, G.A.; Liu, C.G.; Ferracin, M. 2007. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell.* 12(3):215–229.
- CARDINAUD, B.; MOREILHON, C.; MARCET, B. 2009. miR-34b/miR-34c: a regulator of TCL1 expression in 11q- chronic lymphocytic leukaemia? *Leukemia* 114(23): 4761–4770.
- CARMELIET, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 6(3).
- CARMELIET, P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncol.* 69(3): 4-10.
- CASHEN, A.F.; SCHILLER, G.J.; O'DONNELL, M.R.; DIPERSIO, J.F. 2010. Multicenter, phase II study of decitabine for the first-line treatment of older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 28: 556-561.
- CHAUDHARY, A.K.; CHAUDHARY, S.; GHOSH, K.; SHANMUKAIAH, C.; NADKARNI, A.H. 2016. Secretion and Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and 9 from Bone Marrow Mononuclear Cells in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 17(3):1519-29.
- CHEN, HM.; TSAI, C.H.; HUNG, W.C. 2015. Foretinib inhibits angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor growth of pancreatic cancer *in vivo* by decreasing VEGFR-2/3 and TIE-2 signaling. *Oncotarget.* 6: 14940-14952.

CHIERI, I.D.A.; OGATA, S.; OKUMURA, K.; TAGUCHI, H. 2008. Changes in the Gene Expression of *C-myc* and *CD38* in HL-60 Cells during Differentiation Induced by Nicotinic Acid-Related Compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(3): 868-871.

CHIGRINOVA, E.; RINALDI, A.; KWEE, I. 2013. Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood* 122:2673–2682.

COCCO, P.; SATTA, G.; DUBOIS, S.; PILI, C.; PILLERI, M.; ZUCCA, M.; BECKER, N. BENAVENTE, Y. 2013. Lymphoma risk and occupational exposure to pesticides: results of the Epilymph study. *Occup Environ Med* 70(2): 91-8.

COULTAS, L.; CHAWENGSAKSOPHAK, K.; ROSSANT, J. 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 438, 937-945.

CUNNINGHAM, D.; HAWKES, E.A.; JACK, A.; QIAN, W.; SMITH, P.; MOUNCEY, P.; POCOCK, C. 2013. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet* 381(9880):1817-26.

DEMIR, H A.; BAYHAN, T.; ÜNER, A.; KURTULAN, O.; KARAKUS, E. 2014. Chronic lymphocytic leukemia in a child: a challenging diagnosis in pediatric oncology practice. *Pediatr Blood Cancer* 61(5): 933-5.

DEN BOER, M. L.; VAN SLEGTENHORST, M.; DE MENEZES, R.X. 2009. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol.* 10 (2): 125-134.

DERYUGINA, E.I.; QUIGLEY, J.P. 2006. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metast Rev* 25(1): 9-34.

DEWALD, G.W. 2002. Cytogenetic and FISH studies in myelodysplasia, acute myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia and lymphoma. *Int J Hemotol.* 76(2): 65-74.

DIAMOND, J.; GOMES M.S. 2013 Mechanisms of Resistance to BCR-ABL Kinase Inhibitors . *Acta Med Port* 26(4): 402-408.

DIAS, S.; HATTORI, K.; ZHU, Z.; HEISSIG, B.; CHOY, M.; A PISTA W.; WU, Y.; CHADBURN, A.; HYJEK, E.; GILL, M.; HICKLIN, D. J.; WITTE, L.; MOORE, M. A.; RAFII, S. 2000. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest.* 106: 511-521.

DIAS, S.; HATTORI, K.; HEISSIG, B.; ZHU, Z.; WU, Y.; WITTE, L.; HICKLIN, D.J.; TATENO, M.; BOHLEN, P.; MOORE, M.A.; RAFII, S. 2001 Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/ VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10857-10862.

DOR, Y.; PORAT, R.; KESHET, E. 2001. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280, C1367-C1374.

DREGER, P.; RITGEN, M.; BÖTTCHER, S.; SCHMITZ, N.; KNEBA, M. 2005. The prognostic impact of minimal residual disease assessment after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 19(7):1135-1138.

DVORAK, H. F. 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 20(21): 4638-80.

DVORAK, H. F.; BROWN, L. F.; DETMAR, M.; DVORAK, A. M. 1995. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 146(5): 1029-1039.

EICHHORST, B.; ROBAK, T.; MONTSERRAT, E. 2015. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 26(5) 50–v54.

ELIASSON, P.; REHN, M.; HAMMAR, P.; LARSSON, P.; SIRENKO, O.; FLIPPIN, L.A. 2010. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp Hematol* 38(4):301–310.

ELLIS, L. M.; HICKLIN, D. J. 2008. VEGF-targeted therapy: Mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 8, 579-591.

ENGEL, M.; MALTA, M.F.; GOMES, M.M.S.; MELLO, I.M.V.G.C.; PINHO, J.R.R.; ONO-NITA, S.K.; CARRILHO, F.J. 2007. Acute hepatitis C virus infection assessment among chronic hemodialysis patients in the Southwest. *BMC Public Health* 7: 50.

FERRARA, N. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Review.* 25(4): 581-611.

FERRARA, N.; HENZEL, W.J. 1989 Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:851-858.

FINGLETON, B. 2007. Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr Pharm Des.* 13: 333-346.

FLINN, I.W.; NEUBERG, D.S.; GREVER, M.R. 2007. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 25(7):793-798.

FOLKMAN, J. & SHING, T. 1992. Angiogenesis. *J. Biol. Chem,* 267, 10931-34.

FOLKMAN, J. 1976. The Vascularization of Tumors. *Sci Am.* 234(5): 58-64.

FOLKMAN, J. 1972. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 175:400-408.

FOLKMAN, J. 2004. A novel anti-vascular therapy for cancer. *Cancer Biol Ther.* 3(3): 338-9.

FOLKMAN, J. 1986. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Research*, 46(2): 467-73, 1986.

FORSYTHE, J. A.; JIANG, B. H.; IYER, N. V.; AGANI, F.; LEUNG, S. W.; KOOS, R. D.; SEMENZA, G. L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* v. 16, n. 9, p. 4604, 4613, 1993.

FOUCAR, K. 2015. Leukemia Classification 2016: What, When, "Who". California Society of Pathologists. Disponível em: <<http://csp.societyhq.com/2015annual/guide/syllabus/lectures/2015-CA-1447810538-8879.pdf>>

FRAGOSO, R.; ELIAS, A.P.; DIAS, S. 2007. Autocrine VEGF loops, signaling pathways, and acute leukemia regulation. *Leuk Lymphoma* 48(3):481-8.

FRIEHS, I.; MARGOSSIAN, R.E.; MORAN, A.M.; CAO-DANH, H.; MOSES, M.A.; DEL NIDO, P.J. 2006. Vascular endothelial growth factor delays onset of failure in pressure-overload hypertrophy through matrix metalloproteinase activation and angiogenesis. *Basic research in cardiology.* 101:204-213.

GAO, XN.; YAN, F.; LIN, J.; GAO, L.; LU, X.L.; WEI, S.C. 2015 AML1/ETO cooperates with HIF1 α to promote leukemogenesis through DNMT3a transactivation. *Leukemia* 29(8):1730–40.

GARCIA-MANERO, G.; TIBES, R.; KADIA, T.; 2015. Phase 1 dose escalation trial of ilorasertib, a dual Aurora/VEGF receptor kinase inhibitor, in patients with hematologic malignancies. *Invest New Drugs.* 33:870-880.

GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. 2003. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.*, 314, 15-23.

GONZALEZ, R. P.; LEYVA, A. M.; RAMON, A. B.; MOREIRA, R.D.M.; PESSOA, C.; FARIAS, R.F.; MORAES, M.O. 2000. Método para o estudo in vivo da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. *Acta Cir. Bras.* 15(3).

GORRE, M.E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K.; HSU, N.; PAQUETTE, R.; RAO, P.N. 2001. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293:876-80.

GOUGH, N. R. 2007. Excessive Angiogenesis Inhibits Tumor Growth. *Sci. STKE*, (367): tw3

GREVER, M.R.; LUCAS, D.M.; DEWALD, G.W. 2007. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol* 25:799–804.

GRIBBEN, J.G. 2010. How I treat CLL up front. *Blood* 115(2):187-197.

GRIMWADE, L.F.; FULLER, K.A.; ERBER, W.N. 2016. Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of acute leukaemia. *Methods* S1046-2023(16): 30198-0.

GROSSMANN, V.; HAFERLACH, C.; WEISSMANN, S.; ROLLER, A.; SCHINDELA, S.; POETZINGER, F. 2013. The molecular profile of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: mutations in RUNX1 and DNMT3A are associated with poor prognosis in T-ALL. *Genes Chromos Cancer* 52(4):410-22.

HAFERLACH, C.; DICKER, F.; SCHNITTGER, S.; KERN, W.; HAFERLACH, T. 2007. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* 21:2442–2451.

HALLEK, M. 2015. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 90(5): 446-60.

HALLEK, M.; FISCHER, K.; FINGERLE-ROWSON, G. 2010. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 376(9747): 1164-1174.

HAMERSCHLAK, N. 2008. Leukemia: genetics and prognostic factors. *Jornal de Pediatria* 84(4): 52-56.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. 2000 The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70.

HAOUAS, H. 2014. Angiogenesis and acute myeloid leukemia. *Hematology*. 19:311-323.

HARMER, N.J.; ILAG, L.L.; MULLOY, B.; PELLEGRINI, L.; ROBINSON, C.V.; BLUNDELL, T.L. 2004. Towards a resolution of the stoichiometry of the fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor-heparin complex. *J Mol Biol* 339:821–34.10.

HATFIELD, K.J.; REIKVAM, H.; BRUSERUD, O. 2010. The crosstalk between the matrix metalloprotease system and the chemokine network in acute myeloid leukemia. *Current medicinal chemistry*. 17: 4448-4461.

HE, M.; WANG, Q.Y.; YIN, Q.Q.; TANG, J.; LU, Y.; ZHOU, C.X.; 2013. HIF-1 α downregulates miR-17/20a directly targeting p21 and STAT3: a role in myeloid leukemic cell differentiation. *Cell Death Differ* 20(3):408–18.

- HE, L.; HE, X.; LIM, L.P. 2007. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447(7148):1130–1134.
- HELMAN, R. et al. 2011. Acute myeloid leukemia: update in diagnosis and treatment in Brazil. *Einstein* 9(2): 179-183.
- HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. 2005. Reprinted with permission from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 23: 1011-1027.
- HILLMEN, P. 2011. Using the biology of chronic lymphocytic leukemia to choose treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 104–109.
- HOCHHAUS, A.; O'BRIEN, S.G.; GUILHOT, F. 2009. Six year follow-up of patients receiving imatinibe for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 213:1054–1061.
- HOF, J.; KRENTZ, S.; SCHEWICK, C. 2011. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 29(23):3185–3193.
- HOLLINGSWORTH, S.J.; DRYE, E.R.; TOU, S.I.; BOULOS, P.B. 2005. Expression of angiogenic VEGF-A (soluble isoforms 121, 165) and lymphangiogenic VEGF-C in colorectal cancers with micro-satellite instability. *J Surg Oncol.* 92(4): 317-325.
- HUA, K.T.; LEE, W.J.; YANG, S.F.; CHEN, C.K.; HSIAO, M.; KU, C.C.; WEI, L.H.; KUO, M.L.; CHIEN, M.H. 2014. Vascular endothelial growth factor-C modulates proliferation and chemoresistance in acute myeloid leukemic cells through an endothelin- 1-dependent induction of cyclooxygenase-2. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1843:387-397.
- HUTCHISON, R.E.; SCHEXNEIDER, K.I. 2011. Leukocyte disorder. In: McPherson RA, Pincus MR, editors, editors. Henrey's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 22th ed. *Elsevier Saunders* pp. 632–3.
- HUYNH, H.; ONG, R.; SOO, KC. 2012. Foretinib demonstrates anti-tumor activity and improves overall survival in preclinical models of hepatocellular carcinoma. *Angiogenesis.* 15: 59-70.
- INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C.G. 2013. Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Lancet* 381(9881):1943-55.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014. 124 p. il. col., mapas.
- JABBOUR, E.J., FADERL, S., KANTARJIAN, H.M., 2005. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clin Proc.* 80, 1517–1527.
- JAIN, R. K.; MUNN, L. L.; FUKUMURA, D. 2002. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat Rev Cancer.* 2(4): 266-276.

JAIN, R.K. 2014. Antiangiogenesis strategies revisited: From starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell*. 26: 605-622.

JAMIESON, C.H.; WEISSMAN, I.L.; PASSEQUÉ, E. 2004. Chronic versus acute myelogenous leukemia: a question of self-renewal. *Cancer Cell* 6(6):531-3.

JANG, M.A.; YOO, E.H.; KIM, K. 2013. Chronic lymphocytic leukemia in Korean patients: frequent atypical immunophenotype and relatively aggressive clinical behavior. *Int J Hematol* 97:403–408.

JIA, H.; BAGHERZADEH, A.; BICKNELL, R.; DUCHEN, M. R.; LIU, D.; ZACHARY, I. 2004. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and VEGF-A differentially regulate KDR-mediated signaling and biological function in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 279, 36148-36157.

JOST, M.; FOLGUERAS, A.R.; FRERART, F. PENDAS, A.M.; BLACHER, S.; HOUARD, X.; BERNDT, S.; MUNAUT, C.; CATALDO, D.; ALVAREZ, J.; MELEN-LAMALLE, L.; FOIDART, J.M.; LOPEZ-OTIN, C.; NOEL, A. 2006. Earlier onset of tumoral angiogenesis in matrix metalloproteinase-19-deficient mice. *Cancer Res*. 66: 5234-5241.

KAMAGONE, C.M.; SOUSA, L.B.; PINHEIRO, M.C.; RIGUEIRO, M.; GIL, I.C.P.; FREITAS, D. 2000. Infiltração conjuntival como primeira manifestação de leucemia mielóide aguda $\frac{3}{4}$ relato de caso. *Arq Bras Oftalmol* (63): 1.

KING, R.L.; NAGHASHPOUR, M. 2011. Watt CD, Morrissette JJ, Bagg A. A comparative analysis of molecular genetic and conventional cytogenetic detection of diagnostically important translocations in more than 400 cases of acute leukemia, highlighting the frequency of false-negative conventional cytogenetics. *Am J Clin Pathol* 135:921–8.

KIRITO, K.; FOX, N.; KOMATSU, N.; KAUSHANSKY, K.; TPO, T. 2005. Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1 α . *Blood* 105(11):4258–63.

KON, K.T.; GORE, S.D.,; ZEIDAN, A.M. EPIGENETIC Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current and Future Directions .2015. *Semin Hematol*. 52:172-183.

KREJCI, P.; DVORAKOVA, D.; KRAHULCOVA, E.; PACHERNIK, J.; MAYER, J.; HAMPL, A. 2001. FGF-2 abnormalities in B cell chronic lymphocytic and chronic myeloid leukemias. *Leukemia* : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK. *FEB*;15(2):228–37.

KREN, L.; GONCHARUK, V.N.; KRENOVÁ, Z.; HERMANOVÁ, M.; SKRICKOVÁ, J. 2006. Expression of matrix metalloproteinases 3, 10 and 11 (stromelysins 1, 2 and 3) and matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) by cancer cells in non-small cell lung neoplasms: Clinicopathologic studies. *Cesk Patol* 42(1):16-9.

KRUSSEL, J.S.; BEHR, B.; MILKI, A.A.; HIERCHENHAIN, J.; WEN, Y.; BIELFELD, P.; LAKE POLAN, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. 2001. *Mol Hum Reprod.* 7(1): 57-63.

KUDO, Y.; IIZUKA, S.; YOSHIDA, M.; TSUNEMATSU, T.; KONDO, T.; SUBARNBHESAJ, A.; DERAZ, E.M.; SIRIWARDENA, S.B.; TAHARA, H.; ISHIMARU, N.; OGAWA, I.; TAKATA, T. 2012. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) directly and indirectly promotes tumor angiogenesis. *J Biol Chem.* 287:38716-38728.

KVESTAD, H.; EVENSEN, L.; LORENS, J.B.; BRUSERUD, O.; HATFIELD, K.J. 2014 *In Vitro* Characterization of Valproic Acid, ATRA, and Cytarabine Used for Disease-Stabilization in Human Acute Myeloid Leukemia: Antiproliferative Effects of Drugs on Endothelial and Osteoblastic Cells and Altered Release of Angioregulatory Mediators by Endothelial Cells. *Leuk Res Treatment.* 2014:143479.

LANDO, D.; PEET, D.J.; GORMAN, J.J.; WHELAN, D.A.; WHITELAW, M.L.; BRUICK, R.K. 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16(12):1466–71.

LANUTI, P.; ROTTA, G.; ALMICI, C.; AVVISATI, G.; BUDILLON, A.; DORETTO, P. 2016. Endothelial progenitor cells, defined by the simultaneous surface expression of VEGFR2 and CD133, are not detectable in healthy peripheral and cord blood. *Cytometry A.* 89(3): 259-70.

LEE, J.Y.; KIM, H.J. 2014. (Lymph)angiogenic influences on hematopoietic cells in acute myeloid leukemia. *Exp Mol Med.* 46:e122.

LEE, J.Y.; PARK, S.; MIN, W.S.; KIM, H.J. 2014. Restoration of natural killer cell cytotoxicity by VEGFR-3 inhibition in myelogenous leukemia. *Cancer Lett.* 354:281-289.

LEE, K.E.; SIMON, M.C. 2012, From stem cells to cancer stem cells: HIF takes the stage. *Curr Opin Cell Biol* 24(2): 232–5.

LEE, M.S.; GHIM, J.; KIM, S.J.; YUN, Y.S.; YOO, S.A.; SUH, P.G.; KIM, W.U.; RYU, S.H. 2015 Functional interaction between CTGF and FPRL1 regulates VEGF-A-induced angiogenesis. *Cell Signal.* 27: 1439-1448.

LI, J.; ZHANG, Y.P.; KIRSNER, R.S. 2003. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc. Res. Tech.* 60(1): 107-14.

LIAO, D.; JOHNSON, R.S. 2007. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 26:281-290.

LIN, C.J.; CENCIC, R.; MILLS, J.R.; ROBERT, F.; PELLETIER, J. 2008. c-Myc and eIF4F are components of a feedforward loop that links transcription and translation. *Cancer Res.* 68: 5326-5334.

- MADRIGAL, M.; RAO, K.S.; RIORDAN, N.H. 2014. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine* 12:260.
- MANCINI, M.; SCAPPATICCI, D.; CIMINO, G.; NANNI, M.; DERME, V.; ELIA, L. 2005. A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood* 105:3434–41.
- MARIN, D.; BAZEOS, A.; MAHON, F.X.; ELIASSON, L.; MILOJKOVIC, D.; BUA, M.; 2010. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinibe. *J Clin Oncol* 28:2381-8
- MARINACCIO, C.; NICO, B.; MAIORANO, E.; SPECCHIA, G.; RIBATTI, D. 2014. Insights in Hodgkin Lymphoma angiogenesis. *Leuk Res.* 38:857-861.
- MARTIN, H. 2008. van der Kuip Heiko, Walter EA. Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinibe. *Ther Clin Risk Manag* 4:163–187.
- MATTISON, R.; JUMONVILLE, A.; FLYNN, P.J.; MORENO-ASPITIA, A.; ERLICHMAN, C.; LAPLANT, B.; JUCKETT, M.B. 2015. A phase II study of AZD2171 (cediranib) in the treatment of patients with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia & lymphoma.* 56: 2061-2066.
- MEDINGER, M.; PASSWEG, J. 2014. Role of tumour angiogenesis in haematological malignancies. *Swiss Med Wkly.* 144: w14050.
- MEZQUITA, P.; PARGHI, S.S.; BRANDVOLD, K.A.; RUDDELL, A. 2005. Myc regulates VEGF production in B cells by stimulating initiation of VEGF mRNA translation. *Oncogene* 24(5):889-901.
- MISHRA, R.; WATANABE, T.; KIMURA, M.T. 2015. Identification of a novel E-box binding pyrrole-imidazole polyamide inhibiting MYC-driven cell proliferation. *Cancer Sci.* 106:421-429.
- MOHAMMADI, M.; OLSEN, SK.; IBRAHIMI, O.A. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:107–37.
- MOORMAN, A.V.; HARRISON, C.J.; BUCK, G.A.; RICHARDS, S.M.; SECKER-WALKER, L.M.; MARTINEAU, M. 2007. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood* 109:3189–97.
- MORENO, C.; HODGSON, K.; FERRER, G. 2010 Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance. *Blood* 116:4771–4776.
- MRAZ, M.; KIPPS, T.J. 2013. MicroRNAs and B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 54(8):1836-9.

MRÓZEK, K.; DOHNER, H.; BLOOMFIELD, C.D. 2007. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol* 14:106-14.

MROZEK, K.; HEEREMA, N.A.; BLOOMFIELD, C.D. 2004. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* 18:115-36.

MROZEK, K.; MARCUCCI, G.; PASCHKA, P.; WHITMAN, S.P.; BLOOMFIELD, C.D. 2007. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 109:431-48.

MÜLLER, MC.; CORTES, J.E.; KIM, D.W.; DRUKER, B.J.; ERBEN. P.; PASQUINI, R. 2009. Chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood* 114:4944-53.

MULLIGHAN, C.H. 2012. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leucemia. *Hematology* 2012(1): 389-396.

NABHAN, M.D.; STEVEN, T.; ROSEN, MD. 2014. Chronic Lymphocytic Leukemia: A Clinical Review. *JAMA.* 312(21):2265-2276.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 69(3):562-573.

NAGY, J. A.; VASILE, E.; FENG, D.; SUNDBERG, C.; BROWN, L. F.; DETMAR, M. J.; LAWITTS, J. A.; BENJAMIN, L.; TAN, X.; MANSEAU, E. J.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med.* 196, 1497-1506.

NAKASHIO, A.; FUJITA, N.; TSURUO, T. 2002. Topotecan inhibits VEGF- and bFGF-induced vascular endothelial cell migration *via* downregulation of the PI3K-Akt signaling pathway. *Int J Cancer.* 98: 36-41.

NIES, V.J.; SANCAR, G.; LIU, W.;VAN ZUTPHEN, T.; STRIK, D.; YU, R.T.; ATKINS, A.R.; EVANS, R.M.; JONKER, J.W.; DOWNES, M.R. 2016. Fibroblast Growth Factor Signaling in Metabolic Regulation. *Front Endocrinol* 6:193.

NOGUERA, R.; FREDLUND, E.; PIQUERAS, M.; PIETRAS, A.; BECKMAN, S.; NAVARRO, S. 2009. HIF-1 α and HIF-2 α are differentially regulated *in vivo* in neuroblastoma: high HIF-1 α correlates negatively to advanced clinical stage and tumor vascularization. *Clin Cancer Res* 15(23):7130–6.

NOWELL, P.; HUNGERFORD, D. 1960. Aminute chromosome in human chronic granulocytic leucemia. *Science* 132:1497.

O' DONELL, M.R.; TALLMAN, M.S.; ABBOUD, C.N. 2014. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Myeloid Leukemia (Version 2.2014).

OGASAWARA, M.; MATSUKAWA, T.; KATSURA, Y. 2009. Imatinibe impairs the function of human regulatory T cells (Tregs) and reverses the inhibition of immune responses to imatinibe-resistant CML cells by Tregs. *ASH Meeting Proceedings* Dec;1114:4728.

OLDE, N.L.; MELLINK, C.; VAN DER SCHOOT, E.; VAN DEN BERG, H. 2009. Karyotyping, FISH, and PCR in acute lymphoblastic leukemia: competing or complementary diagnostics? *J Pediatr Hematol Oncol* 31(12): 930-935.

OMS. ACUTE MYELOGENOUS LEUKEMIA AND ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA. Union for International Cancer Control. Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines. Disponível em: <http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/20/applications/AML_AP L.pdf>.

PALLASCH, C.P.; PATZ, M.; PARK, Y.; 2009. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 114(15): 3255–3264.

PAPAEMMANUIL, E.; HOSKING, F.J.; VIJAYAKRISHNAN, J. 2009. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11. 2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 41:1006–10.

PARIKH, S.A.; RABE, K.G.; CALL, T.G. 2013. Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. *Br J Haematol* 162:774–782.

PARKER, T.L.; STROUT, M.P. 2011. Chronic lymphocytic leukemia: prognostic factors and impact on treatment. *Discovery Medicine* 11(57):115–123.

PATEL, D.; SUTHAR, M.P.; PATEL, V.; SINGH, R. 2010. BCR ABL Kinase Inhibitors for Cancer Therapy. *IJPSDR*, 2(2): 80-90.

PATSCKA, P.; MARUCCI, G.; RUPPERT, A.S. 2006. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8:21): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 24:3904-11.

PATTERSON, M.L.; ATKINSON, S.J.; KNAUPER, V.; MURPHY, G. 2001. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett.* 503:158-162.

PELLO, O.M.; ANDRES, V. Role of c-MYC in tumor-associated macrophages and cancer progression. *Oncoimmunology*. 2:e22984.

PENG, G.; LIU, Y. 2015. Hypoxia-inducible factors in cancer stem cells and inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 36(6): 374–83.

PEREZ-ATAYDE, A.R.; SALLAN, S.E.; TEDROW, U.; CONNORS, S.; ALLRED, E.; FOLKMAN, J. 1997. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 150(3):815-21.

- POKHAREL, M. 2012. Leukemia : A Review Article. *IJARBP* 2(3):397-407.
- POURGHOLAMI, M. H.; MORRIS, D. L. 2008. Inhibitors of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 6: 343-347.
- PRESTA, M.; DELL'ERA, P.; MITOLA, S.; MORONI, E.; RONCA, R.; RUSNATI, M. 2005 Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews.* 16:1 59-178.
- PRICE, D. J.; MIRALEM, T.; JIANG, S.; STEINBERG, R.; AVRAHAM, H. 2001. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell growth differ,* 12: 129-135.
- PUI, C.H.; CAMPANA, D.; PEI, D. 2009. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med.* 360:2730–41.
- PULTE, D., GONDOS, A., BRENNER, H., 2009. Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980 to the early 21st century. *Blood* 113, 1408–1411.
- PYE, S.M.; CORTES, J.; AULT, P. 2008. The effects of imatinibe on pregnancy outcome. *Blood* 111: 5505–5508.
- QUAIL, D.; JOYCE, J. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 19(11): 1423–37.10.1038/nm.3394.
- RANO, U.N.; CIEPLY, K.; SHERER, C.; SURTI, U.; GOLLIN, S.M. 2016. Correlation of Classic and Molecular Cytogenetic Alterations in Soft-Tissue Sarcomas: Analysis of 46 Tumors With Emphasis on Adipocytic Tumors and Synovial Sarcoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*
- RASKATOV, J.A.; NICKOLS, N.G.; HARGROVE, A.E.; MARINOV, G.K.; WOLD, B.; DERVAN P.B. 2012. Gene expression changes in a tumor xenograft by a pyrrole-imidazole polyamide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:16041-16045.
- REIKVAM, H.; HATFIELD, K.J.; OYAN, A.M.; KALLAND, K.H.; KITTING, A.O.; BRUSERUD, O. 2010. Primary human acute myelogenous leukemia cells release matrix metalloproteases and their inhibitors: release profile and pharmacological modulation. *Eur J Haematol* 84(3):239-51.

RIBATTI, D. 2009. Is angiogenesis essential for the progression of hematological malignancies or is it an epiphenomenon? *Leukemia* 23, 433–434.

RIES, C.; LOHER, F.; ZANG, C.; ISMAIR, M.G.; PETRIDES, P.E. 1999. Matrix metalloproteinase production by bone marrow mononuclear cells from normal individuals and patients with acute and chronic myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res.* 5: 1115-1124.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis.1997. *Nature.* 386:671-74.

ROBERTS, K.G.; MORIN, R.D.; ZHANG, J. 2012. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 22(2): 153–166.

RODRIGUEZ, A.E.; HERNANDEZ, J.A.; HERNANDEZ, M. 2013. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) with a high number of losses in 13Q is associated with different biological features. *Laboratory Investigation* 93.

ROSSI, D.; RASI, S.; SPINA, V. 2013. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121:1403–1412.

RUAN, M.; ZHANG, L.; HAN, C.; AI, X.; ZHANG, J.; LIU, T.; YANG, W.; CHEN, X. 2014. NPM1 and CEBPA mutations in pediatric cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Chinese Journal of pediatric* 52(4):303-7.

SAFAEI, M.D.; JAHANBAANOO, S.; FARNANEH, M. R.; TABIBI, N.; HOSSEINI, M. 2013. Cytogenetic Findings of Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in Fars Province. *Iran J Med Sci.* 38(4): 301–307.

SAFATLE, A. M. V., BARROS, P. S.M., MALUCELLI, B., & GUERRA, J. L. 2002. Implante de duas membranas biológicas em microbolsa corneana como modelo experimental de angiogênese. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39(4), 189-195.

SALVATORI, B.; LOSUE, I.; DAMAS, N.D.; MANGIAVACCHI, A.; CHIARETTI, S. 2011. Critical Role of c-Myc in Acute Myeloid Leukemia Involving Direct Regulation of miR-26a and Histone Methyltransferase EZH2. *Genes Cancer* 2(5): 585-92.

SAMPATH, D.; LIU, C.; VASAN, K.; SULDA, M.; PUDUVALLI, V.K.; WIERDA, W.G. 2012. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119: 1162–1172.

SANTOS, I.M.; FRANZON, C.M.R.; KOGA, A.H. 2012. Laboratory diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia and progression to acute leukemia in association with chronic lymphocytic leukemia: morphological features and immunophenotypic profile. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 34(3): 242–244.

SATO, Y. 2008. VEGFR1 for lymphangiogenesis an alternative signaling pathway? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:604-605.

SCHNEIDER, P.; DUBUS, I.; GOUEL, F.; LEGRAND, E.; VANNIER, J.P.; VASSE, M. 2011. What Role for Angiogenesis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia? *Adv Hematol* 2011: 274628.

SEMENZA, GL. 2013. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 123(9): 3664–71

SEYMOUR, J.F.; GRIGG, A.; REYNOLDS, J. 2006. Two year data from a prospective safety study analyzing the consequences of imatinibe mesylate inhibition of sensitive kinases other than bcr-abl in patients with previously untreated chronic phase CML. *Blood* 108:2147a.

SHANAFELT, T.D.; GEYER, S.M.; KAY, N.E. 2004. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 103(4): 1202-1210.

SHCHORS, K.; SHCHORS, E.; ROSTKER, F.; LAWLOR, E.R.; BROWN- SWIGART, L.; EVAN, GI. 2006. The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1beta. *Genes Dev.* 20: 2527-2538.

SHIBUYA, M. 2006. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 39, 469-478.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. 2014. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64(1): 9-29.

SIPAHIMALANI, P.; SPINELLI, J.J.; MACARTHUR, A.C.; 2007. A systematic evaluation of the ataxia telangiectasia mutated gene does not show an association with non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 121:1967–1975.

SONG, G.; LI, Y.; JIANG, G. 2012. Role of VEGF/VEGFR in the pathogenesis of leukemias and as treatment targets (Review). *Oncol Rep.* 28:1935-1944.

SOVERINI, S.; COLAROSSO, S.; GNANI, A.; ROSTI, G.; CASTAGNETTI, F.; POERIO, A. 2006. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinibe resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 12:7374-9.

SPENCER, J.A.; FERRARO, F.; ROUSSAKIS, E., KLEIN, A.; WU, J. RUNNELS, J.M. 2012. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 508(7495): 269–73.

STANKOVIC, T.; STEWART, G.S.; FEGAN, C. 2002. Ataxia telangiectasia mutated-deficient B-cell chronic lymphocytic leukemia occurs in pregerminal center cells and results in defective damage response and unrepaired chromosome damage. *Blood* 99:300–309.

STILGENBAUER, S.; SCHNAITER, A.; PASCHKA, P.; ZENZ, T.; DÖHNER, K.; BÜHLER, A. 2014. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood* 123(21):3247-54.

STRIZZI, L.; CATALANO, A.; VIANALE, G.; ORECCHIA, S.; CASALINI, A.; TASSI, G.; PUNTONI, R.; MUTTI, L.; PROCOPIO, A. 2001. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. *J Pathol*, 193: 468-475.

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L.; JAFFER, E.S.; PILERI, S.A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J.W. 2008. WHO Classification of Tumours, vol. 2.

TABE, Y.; KONOPLEVA, M. 2014. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br J Haematol* 164(6):767–78.

TRAER, E.; JAVIDI-SHARIFI, N.; AGARWAL, A.; DUNLAP, J.; ENGLISH, I.; MARTINEZ, J.; TYNER, J.W.; WONG, M.; DRUKER, B.J. 2014 Ponatinib overcomes FGF2-mediated resistance in CML patients without kinase domain mutations. *Blood*. 123:1516- 1524.

TREVINO, L.R.; YANG, W.; FRENCH, D. 2009. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 41:1001–05.

TSCHESCHE, H. 2013. Leukodiapedes is, function, and physiological role of leucocyte matrix metalloproteinases. *Adv Exp Med Biol*. 421:285-301.

TSIMBERIDOU, A.M.; O'BRIEN, S.; KHOURI, I. 2006. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 24:2343–2351.

UNDERBAYEV, C.; KASAR, S.; DEGHEIDY, H.; MARTI, G.; LIGHTFOOTE, M.; RAVECHE, E. 2014. The role of microRNA-15a/16 in early B1 cell development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Research* 74(19 Supplement):4791-4791.

USVASALO, A.; RÄTY, A.; HARILA-SAARI, A.; KOISTINEN, P.; SAVOLAINEN, E.R. 2009. Acute lymphoblastic leukemias with normal karyotypes are not without genomic aberrations. *Cancer Genet Cytogenet* 192:10–7.

VAIDYA, S.; MADKAIKAR, M.; GHOSH, K.; VUNDINTI, B. R. 2011. Deletion of ABL/BCR on der(9) associated with severe basophilia. *Indian J Hum Genet*. 17(2): 100–103.

VELLOSO, E.D.R.P.; MOTTA, C.H.A.; FURTADO, J.B. 2011. Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies. *Eistein* (São Paulo), 9(2).

VIRREY, J. J.; DONG, D.; STILES, C.; PATTERSON, J. B.; PEN, L.; NI, M.; SCHONTHAL, A. H.; CHEN, T. C.; HOFMAN, F. M.; LEE, A. S. 2008. Stress

Chaperone GRP78/BiP Confers Chemoresistance to Tumor-Associated Endothelial Cells. *Mol Cancer Res*, 6(8): 1268- 1275.

VON-MARSCHALL, Z.; CRAMER, T.; HOCKER, M.; BURDE, R.; PLATH, T.; SCHIRNER, M.; HEIDENREICH, R.; BREIER, G.; RIECKEN, E. O.; WIEDENMANN, B.; ROSEWICZ, S. 2000. De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop. *Gastroenterology*, 119: 1358-1372.

WANG, F.; CHAN, L.W.; CHO, W.C.; TANG, P.; YU, J.; SHYU, C.R.; TSUI, N.B.; WONG, S.C.; SIU, P.M.; YIP, S.P.; YUNG, B.Y. 2014. Novel approach for coexpression analysis of E2F1-3 and MYC target genes in chronic myelogenous leukemia. *Biomed Res Int*. 2014:439840.

WANG, G.L.; JIANG, B.H.; RUE, E.A.; SEMENZA, G.L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12):5510–4.

WANG, H.; CHAUHAN, J.; HU, A.; PENDLETON, K.; YAP, J.L.; SABATO, P.E.; JONES, J.W.; PERRI, M.; YU, J.; CIONE, E.; KANE, M.A.; FLETCHER, S.; PROCHOWNIK, E.V. 2013. Disruption of Myc- Max heterodimerization with improved cell-penetrating analogs of the small molecule 10074-G5. *Oncotarget*. 4:936-947.

WANG, L.; ZHANG, W.; DING, Y.; XIU, B.; PING, L.; DONG, Y.; ZHU, Q.; LIANG A. 2015. Up-regulation of VEGF and its receptor in refractory leukemia cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 8(5): 5282–5290.

WOENNE, E.C.; LEDERLE, W.; ZWICK, S.; PALMOWSKI, M.; KRELL, H.; SEMMLER, W.; MUELLER, M.M.; KIESSLING, F. 2010 MMP inhibition blocks fibroblast-dependent skin cancer invasion, reduces vascularization and alters VEGF-A and PDGF-BB expression. *Anticancer Res*. 30:703-711.

WOJCIK, W. E.; ROSSI, S.; SHIMIZU, M.; NICOLOSO, M.S.; CIMMINO, A. 2010. Non-codingRNA sequence variations in human chronic lymphocytic leukemia and colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31(2): 208–215.

WU, X.; LIU, B.J.; JI, S.; WU, J.F.; XU, C.Q.; DU, Y.J.; YOU, X.F.; LI, B.; LE, J.J.; XU, H.L.; DUAN, X.H.; DONG, J.C. 2015. Social defeat stress promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating vascular endothelial growth factor/extracellular signal-regulated kinase/matrix metalloproteinase signaling in a mouse model of lung carcinoma. *Mol Med Rep*. 12:1405-1412.

YAMAKUCHI, M.; LOTTERMAN, CD.; BAO, C.; HRUBAN, R.H.; KARIM, B.; MENDELL, J.T. 2010. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(14):6334–9.

YAMAMOTO, J.F.; GOODMAN, M.T. 2008. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control* 19: 379–390.

YAN, C.; BOYD, D.D. 2007. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Journal of cellular physiology*. 211:19-26.

YAN, L.; PING, N.; ZHU, M. 2012. Clinical, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular genetic features in 117 adult patients with mixed-phenotype acute leukemia defined by WHO-2008 classification.

ZENG, D.; WANG, J.; KONG, P.; CHANG, C.; LI, J.; LI, J. 2014. Ginsenoside Rg3 inhibits HIF-1 α and VEGF expression in patient with acute leukemia *via* inhibiting the activation of PI3K/Akt and ERK1/2 pathways. *J Cell Biochem*. 7:2172-2178

ZHANG, J.; CHEN, G.Q. 2009. Hypoxia-HIF-1 α -C/EBP α /Runx1 signaling in leukemic cell differentiation. *Pathophysiology* 16(4):297–303.

ZHANG, L.; SONG, K.; ZHOU, L.; XIE, Z.; ZHOU, P.; ZHAO, Y.; HAN, Y.; XU, X.; LI, P. 2015. Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3B1 (HS3ST3B1) promotes angiogenesis and proliferation by induction of VEGF in acute myeloid leukemia cells. *Journal of cellular biochemistry* 116:1101-1112.

ZHENG, ZH.; HAO, C.L.; LIU, P.; TIAN, X.; WANG, L.H.; ZHAO, L.; ZHU, C.M. 2014, Valproic acid inhibits tumor angiogenesis in mice transplanted with Kasumi1 leukemia cells. *Mol Med Rep*. 9: 443-449.

ZHENG, Y.; SUN, Y.; YU, X.; SHAO, Y.; ZHANG, P.; DAI, G.; FU, J. 2016. Angiogenesis in Liquid Tumors: An In Vitro Assay for Leukemic-Cell-Induced Bone Marrow Angiogenesis. *Adv Healthc Mater* 5(9):1014-24.

ZHOU, Z.; REDDY, K.; GUAN, H.; KLEINEMAN, E.S. 2007. VEGF(165), but not VEGF(189), stimulates vasculogenesis and bone marrow cell migration into Ewing's sarcoma tumors in vivo. *Mol Cancer Res*. 5(11): 1125-1132.

ZIJLSTRA, A.; SEANDEL, M.; KUPRIYANOVA, T.A.; PARTRIDGE, J.J.; MADSEN, M.A.; HAHN-DANTONA, E.A.; QUIGLEY, J.P & DERYUGINA, E.I. 2006. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood*, 107(1): 317-327.