

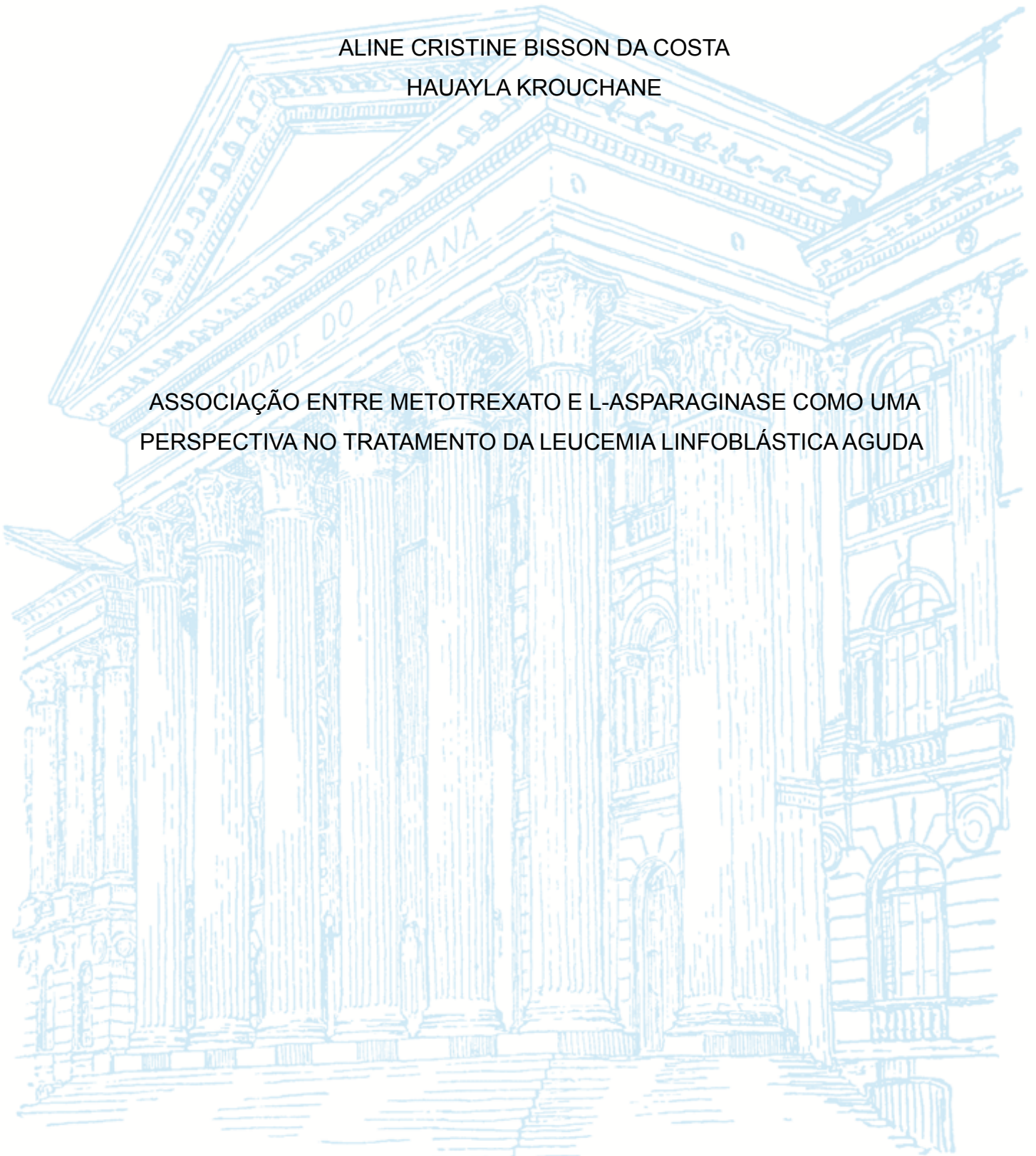
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE CRISTINE BISSON DA COSTA
HAUAYLA KROUCHANE

ASSOCIAÇÃO ENTRE METOTREXATO E L-ASPARAGINASE COMO UMA
PERSPECTIVA NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

CURITIBA

2023



ALINE CRISTINE BISSON DA COSTA
HAUAYLA KROUCHANE

ASSOCIAÇÃO ENTRE METOTREXATO E L-ASPARAGINASE COMO UMA
PERSPECTIVA NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, Curso de Graduação em Farmácia, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Amanda Rabello Crisma.

CURITIBA

2023

AGRADECIMENTOS

À Deus, por nos conceder força, coragem e saúde para enfrentar todos os obstáculos no decorrer desses anos e por acompanhar e iluminar a nossa caminhada.

À Universidade Federal do Paraná, por ter nos proporcionado um estudo excepcional, além das oportunidades disponibilizadas no decorrer da graduação.

À Prof^ª. Dr^ª. Amanda Rabello Crisma, por ter aceitado orientar este trabalho, pela paciência, ensinamentos e por estar sempre disposta a sugerir melhorias.

Aos nossos pais e familiares, pelo incentivo e motivação durante todo esse período, pela compreensão nos momentos de ausência, por acreditarem no nosso potencial e serem o nosso porto seguro.

Agradecemos também uma à outra, pelo companheirismo durante TODOS os momentos, pela paciência, amizade, encorajamento e pelas lembranças que levaremos por toda a vida.

E a todos que contribuíram de alguma forma com a nossa jornada.

“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele tudo fará.”

Salmos 37:5

RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda é um câncer que apresenta alta incidência em crianças, podendo atingir também indivíduos adultos. O aparecimento da doença é dado por alterações genéticas que resultam no surgimento de um linfoblasto com mutações em seu DNA. Essa célula não se desenvolve para as próximas etapas de maturação e apresenta a capacidade de continuar se dividindo, levando ao acúmulo de blastos leucêmicos. A quimioterapia constitui uma forma fundamental de tratamento, na qual há a combinação de medicamentos com diferentes mecanismos de ação, incluindo o metotrexato e a L-asparaginase. A associação de ambos os medicamentos pode ser benéfica; no entanto, há pesquisas que demonstram que pode existir um antagonismo decorrente da sua combinação, quando ocorre a administração da L-asparaginase antes do metotrexato. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito da combinação do metotrexato e da L-asparaginase no tratamento da leucemia linfoblástica aguda. A pesquisa foi desenvolvida por meio de uma revisão bibliográfica consultando-se publicações depositadas nas bases de dados Pubmed, ScienceDirect e Scielo, com o emprego dos descritores: “metotrexato e L-asparaginase”, “leucemia linfoblástica aguda”, “sinergismo e metotrexato e L-asparaginase”, “antagonismo e metotrexato e L-asparaginase”, “metotrexato e L-asparaginase e leucemia linfoblástica aguda” e por meio da leitura de livros-textos presentes na base de dados Minha Biblioteca UFPR. Observou-se, a partir dos dados obtidos *in vitro*, que com a utilização prévia da L-asparaginase ao metotrexato, pode existir um antagonismo, dado que a L-asparaginase causa um bloqueio da conversão do metotrexato em poliglutamatos. Por outro lado, pesquisas *in vivo* mostram que não há relevância na ordem de administração, contudo, não há estudos *in vivo* suficientes que demonstrem se existe ou não interferência na associação desses medicamentos. Portanto, existe a necessidade da realização de mais ensaios clínicos para obter-se maiores informações acerca do efeito terapêutico dessa combinação no tratamento de pacientes com leucemia linfoblástica aguda.

Palavras-chave: leucemia linfoblástica aguda; metotrexato; L-asparaginase; associação; tratamento.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia is a cancer that has a high incidence in children, with incidence in adults too. Disease starts due to genetic alterations that result in the emergence of a lymphoblast with DNA mutations. This cell does not undergo maturation and can continue dividing, leading to the accumulation of leukemic blasts. Chemotherapy is a fundamental form of treatment, in which there is a combination of drugs with different mechanisms of action, including methotrexate and L-asparaginase. Association of both drugs can be beneficial; however, there are studies that demonstrate that there may be an antagonism resulting from their combination when L-asparaginase is administered before methotrexate. Therefore, the aim of this study was to analyze the effect of the combination of methotrexate and L-asparaginase in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. Research was developed through a bibliographic review of publications in the Pubmed, ScienceDirect and Scielo databases, using the descriptors: "methotrexate and L-asparaginase", "acute lymphoblastic leukemia", "synergism and methotrexate and L-asparaginase", "antagonism and methotrexate and L-asparaginase", "methotrexate and L-asparaginase and acute lymphoblastic leukemia" and by consulting textbooks in the Minha Biblioteca UFPR database. It was observed, from *in vitro* data obtained, that previous use of asparaginase to methotrexate leads to an antagonism, given that L-asparaginase causes an inhibition of methotrexate conversion into polyglutamates. On the other hand, *in vivo* research shows that there is no relevance in the order of administration; however, there are not enough *in vivo* studies that demonstrate if there is or not an interference in the association of these drugs. Thus, there is a need for more clinical trials to obtain more information about this combination in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia.

Key-words: acute lymphoblastic leukemia; methotrexate; l-asparaginase; association; treatment.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 7 |
| 1.1 METODOLOGIA..... | 8 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 9 |
| 2.1 LEUCEMIA..... | 9 |
| 2.2 HISTÓRICO DO ESTUDO DAS LEUCEMIAS..... | 10 |
| 2.3 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA..... | 11 |
| 2.3.1 Classificação..... | 12 |
| 2.3.1.1 Classificação morfológica..... | 12 |
| 2.3.1.2 Classificação imunofenotípica..... | 14 |
| 2.3.1.3 Classificação citogenética..... | 15 |
| 2.3.2 Sintomas e manifestações clínicas..... | 16 |
| 2.3.3 Diagnóstico laboratorial..... | 17 |
| 2.3.3.1 Hemograma..... | 17 |
| 2.3.3.2 Mielograma..... | 17 |
| 2.3.3.3 Citoquímica..... | 18 |
| 2.3.3.4 Citogenética..... | 18 |
| 2.3.3.5 Imunofenotipagem..... | 19 |
| 2.3.4 Tratamento..... | 20 |
| 2.4 METOTREXATO..... | 23 |
| 2.5 L-ASPARAGINASE..... | 26 |
| 2.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE METOTREXATO E L-ASPARAGINASE..... | 29 |
| 3 CONCLUSÃO..... | 34 |
| REFERÊNCIAS..... | 35 |

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de mutação no DNA de uma célula linfóide imatura leva ao surgimento de uma célula maligna que permanece nas fases iniciais do seu desenvolvimento. Essa célula não é capaz de apresentar funcionalidade, além de adquirir a vantagem de proliferação contínua. Assim sendo, ocorre um acúmulo de células neoplásicas na medula óssea, bem como no sangue periférico, substituindo as células saudáveis. Essa condição representa a leucemia linfoblástica aguda (LLA), que pode ser classificada como LLA de linhagem B e LLA de linhagem T (ABRALE, 2019; HARRISON; JOHANSSON, 2015).

Entre os tratamentos de escolha para a LLA pode-se citar o metotrexato e a L-asparaginase. O metotrexato, análogo do ácido fólico, apresenta ação antitumoral por meio da inibição da enzima dihidrofolato redutase, o que interfere na redução do dihidrofolato à tetrahydrofolato, molécula necessária para a síntese do material genético e replicação celular (NUCCI, 2021).

Em relação a L-asparaginase, o seu mecanismo de ação consiste na conversão da L-asparagina em ácido aspártico e amônia indisponibilizando esse aminoácido para captação e uso por parte das células tumorais, visto que estas, por não serem capazes de produzir tal aminoácido, necessitam de fontes exógenas da L-asparagina para seu metabolismo. Como a L-asparaginase realiza a depleção da L-asparagina extracelular, as células leucêmicas apresentam carência da L-asparagina resultando na sua eliminação (NUCCI, 2021).

Ambos os medicamentos são incluídos nos esquemas de quimioterapia para LLA, sendo associados a fármacos de outras classes e que apresentam outros mecanismos de ação. Entre as associações estabelecidas, existe a possibilidade de efetuar-se a administração do metotrexato em combinação com a L-asparaginase, uma vez que existem evidências mostrando sinergismo na ação antitumoral entre esses dois medicamentos, em pacientes com LLA (ABRALE, 2019; KLOOS *et al.*, 2019). No entanto, há estudos *in vitro* que apontam o estabelecimento de ação antagônica decorrente dessa associação, quando a administração da L-asparaginase precede a do metotrexato (VADLAMUDI *et al.*, 1973). Por fim, trials clínicos que mostram o efeito dessa associação em pacientes com LLA são escassos. Dessa forma, torna-se necessária a ampliação desses estudos clínicos com o intuito de se esclarecer o possível efeito terapêutico da associação de

metotrexato a L-asparaginase em pacientes com LLA, incluindo a elucidação da influência da ordem de administração desses fármacos. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo avaliar se a associação do metotrexato a L-asparaginase seria uma possibilidade promissora no tratamento da leucemia linfoblástica aguda.

1.1 METODOLOGIA

Realizou-se uma revisão bibliográfica pesquisando-se artigos científicos depositados nas bases de dados Pubmed, ScienceDirect e Scielo, e utilizando-se os seguintes descritores: “metotrexato e L-asparaginase”, “leucemia linfoblástica aguda”, “sinergismo e metotrexato e L-asparaginase”, “antagonismo e metotrexato e L-asparaginase”, “metotrexato e L-asparaginase e leucemia linfoblástica aguda”. Além disso, foi consultada a base de dados Minha Biblioteca UFPR para a pesquisa de livros-textos que apresentassem a temática envolvida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEUCEMIA

Leucemia corresponde a um conjunto de doenças malignas e clonais caracterizadas por anormalidades que acometem células progenitoras do sistema linfo-hematopoiético (SACHS, 1996 *apud* RIBEIRO, 2005), alterando a diferenciação celular e originando um clone maligno que perde o controle da divisão celular e adquire potencial de adentrar outros tecidos. Isso proporciona uma vantagem proliferativa do clone maligno sobre as células do tecido hematopoiético que não apresentam alterações, resultando na substituição destas por células tumorais (GILLILAND, 1998; LOOK, 1995; ROWLEY, 2000 *apud* RIBEIRO, 2005). As modificações que causam a malignidade são resultantes da amplificação do DNA, de alterações cromossômicas ou de mutações somáticas (SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

A leucemia é o câncer mais observado em indivíduos abaixo dos 15 anos, no entanto, mostra-se mais prevalente em adultos com mais de 55 anos. A estimativa de novos casos de leucemias para o Brasil para cada ano do triênio 2020-2022 é de 4.890 casos em mulheres e 5.920 em homens (INCA, 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2020), o número de novos casos de leucemia em todo o mundo no ano de 2020 foi de 474.519, enquanto que o número de mortes, para o mesmo ano, foi de 311.594.

A classificação das leucemias é complexa e leva em consideração critérios como apresentação clínica, características morfológicas, contagem de blastos no sangue periférico, colorações citoquímicas, imunofenotipagem e citogenética (LICHTMANN *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2009 *apud* SILVA *et al.*, 2016). De acordo com a análise desses parâmetros, uma das formas de classificar as leucemias é conforme as células envolvidas e seu grau de maturação. São denominadas agudas quando apresentam progressão rápida por meio da proliferação clonal associada à anaplasia (ANJOS; ALVARES-SILVA; BORELLI, 2000). Neste tipo de leucemia, a célula que apresenta alteração não exibe capacidade de diferenciação e permanece se proliferando, havendo como consequência um crescimento acelerado e o acúmulo de células imaturas no sangue periférico (VILLELA; WISINTEINER, 2001). Já as leucemias crônicas progridem de forma lenta e não resultam de um bloqueio

maturativo, ou seja, nesse tipo de leucemia as células mantêm sua capacidade de diferenciação e maturação (ANJOS; ALVARES-SILVA; BORELLI, 2000).

De acordo com o INCA (2022), tanto as leucemias crônicas como as agudas podem ser divididas em mieloide e linfóide de acordo com o tecido afetado. As leucemias mieloides consistem em uma categoria na qual as células envolvidas são os mieloblastos e demais etapas maturativas do tecido mieloide, enquanto as leucemias linfóides resultam de alterações em linfoblastos. Dessa forma, as leucemias podem ser classificadas em: linfoblástica aguda, linfocítica crônica, mieloide aguda e mieloide crônica (HAMERSCHLAK, 2008).

2.2 HISTÓRICO DO ESTUDO DAS LEUCEMIAS

Em 1827, o médico Alfred Velpeau (1795-1867) publicou um relato de caso acerca de um homem de 63 anos que apresentou sintomas como febre, fraqueza, inchaço abdominal e litíase renal (VELPEAU, 1827 *apud* KAMPEN, 2011). Em sua autópsia, foi percebido um aumento no fígado e baço, além de alteração no aspecto do sangue, com uma alta viscosidade (VELPEAU, 1825 *apud* KAMPEN, 2011). Dessa forma, Velpeau forneceu a primeira descrição dos sintomas que estão relacionados à leucemia e que até hoje são utilizados para um diagnóstico precoce da doença (KAMPEN, 2011).

O médico Alfred Donné (1801-1878) foi o primeiro a analisar sob o microscópio as alterações da composição do sangue de indivíduos com leucemia. Donné suspeitava que antes do desenvolvimento da doença existia o aparecimento de uma grande quantidade de glóbulos brancos no sangue. O médico propôs que esse aumento dos glóbulos brancos acontecia em razão do bloqueio da maturação e diferenciação celular (KAMPEN, 2011).

No ano de 1845, o médico John Hughes Bennett (1812-1875) publicou um relato de caso em que foi observado em um corpo de um homem de 28 anos, o aumento do tamanho do fígado e do baço (BENNETT, 1845, 1860 *apud* KAMPEN, 2011). Além do mais, na análise microscópica do sangue, visualizou-se uma grande quantidade de glóbulos brancos. Bennett intitulou a doença como leucocitemia (KAMPEN, 2011).

Também, em 1845, Rudolf Virchow (1821-1902) publicou seu relato de caso sobre uma paciente de 50 anos com edema nas pernas, aumento do baço, diarreia e

sangramento nasal. Após sua morte, Virchow observou que o sangue da paciente parecia conter pus. Da mesma forma, através da análise microscópica, o médico percebeu que havia um aumento dos glóbulos brancos e redução de glóbulos vermelhos. Entretanto, foi somente em 1847 que Virchow nomeou a doença como leucemia (VIRCHOW, 1856a, 1856b *apud* KAMPEN, 2011).

A classificação das leucemias em aguda ou crônica e linfóide ou mieloide foi definida apenas em 1913, e a partir de 1917, constatou-se que a leucemia linfoblástica aguda (LLA) é prevalente em crianças entre 1 e 5 anos de idade (RESCHAD; SCHILLING-TORGAU, 1913; WARD, 1917 *apud* LARSON, 2016). Nesta época, iniciou-se a utilização de aminopterina, um análogo 4-amino do ácido fólico, para o tratamento de leucemias, uma vez que constatou-se que essa vitamina acelera a proliferação das células tumorais. A partir da adoção desse tratamento, foi observada pela primeira vez remissão completa da doença em crianças durante meses (FARBER *et al.*, 1948 *apud* LARSON, 2016). Posteriormente, Elion e colaboradores introduziram os antimetabólitos (mercaptopurina, 6-tioguanina e alopurinol) na terapêutica da LLA por ter sido identificada sua influência na síntese de purinas e pirimidinas (ELION; HITCHINGS; PINKEL *et al.*, 1971; VANDERWERFF, 1951 *apud* LARSON, 2016). Outro avanço terapêutico foi a utilização da tipagem do antígeno leucocitário humano (HLA) para possibilitar o transplante de células-tronco hematopoiéticas em pacientes com recaídas (RIEHM *et al.*, 1980 *apud* LARSON, 2016).

2.3 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

A ocorrência de mutações somáticas em apenas uma célula progenitora linfóide ao longo das etapas de diferenciação celular leva ao desenvolvimento da leucemia linfoblástica aguda. Uma característica das células leucêmicas, quando comparadas a células não tumorais, é de se dividirem de forma mais lenta, necessitando de um maior período de tempo para a síntese de DNA (fase S); entretanto, em função das modificações nas respostas aos sinais de proliferação e apoptose, estas adquirem a capacidade de acumularem-se devido à proliferação constante e a inibição de mecanismos de morte (PUI; RELING; DOWNING, 2004; PUI; ROBISON; LOOK, 2008 *apud* LARSON, 2016). Logo, células leucêmicas apresentam uma vantagem competitiva sobre as células não tumorais,

substituindo-as na medula óssea e difundindo-se para outros locais, bem como acarretando no desenvolvimento de anemia, neutropenia e trombocitopenia (LARSON, 2016).

A leucemia linfoblástica aguda representa 20% de todos os casos de leucemia em indivíduos adultos, sendo mais observada em pessoas de 30 a 40 anos (LICHTMANN *et al.*, 2006 *apud* SILVA *et al.*, 2016). Segundo Yi *et al.* (2020), nos anos de 1990 e 2017, a taxa de incidência da LLA no mundo foi mais elevada em crianças abaixo de cinco anos e em idosos, além disso, indivíduos do sexo masculino apresentaram uma maior quantidade de casos do que pessoas do sexo feminino. Também, uma taxa de mortalidade mais alta foi observada em idosos. No caso de crianças, a taxa de mortalidade reduziu em 2017 quando comparada com a taxa exibida em 1990.

2.3.1 Classificação

As leucemias são classificadas de acordo com características morfológicas, imunológicas e citogenéticas, sendo essa classificação de grande relevância para o estabelecimento do tratamento, uma vez que, dependendo da origem da leucemia, são planejadas terapias diferentes, condizentes com cada tipo diagnosticado (SILVEIRA; ARRAES, 2008). Além disso, a genética molecular também contribui para a classificação das leucemias, permitindo a disposição de informações relevantes para o diagnóstico (STASI *et al.*, 1995).

A classificação da leucemia linfoblástica aguda é dada de acordo com parâmetros morfológicos, imunofenotípicos e citogenéticos, que se complementam de forma a auxiliar no diagnóstico e prognóstico, além de serem importantes na detecção precoce de recaídas (MARTINS; REGO; FALCÃO, 2005).

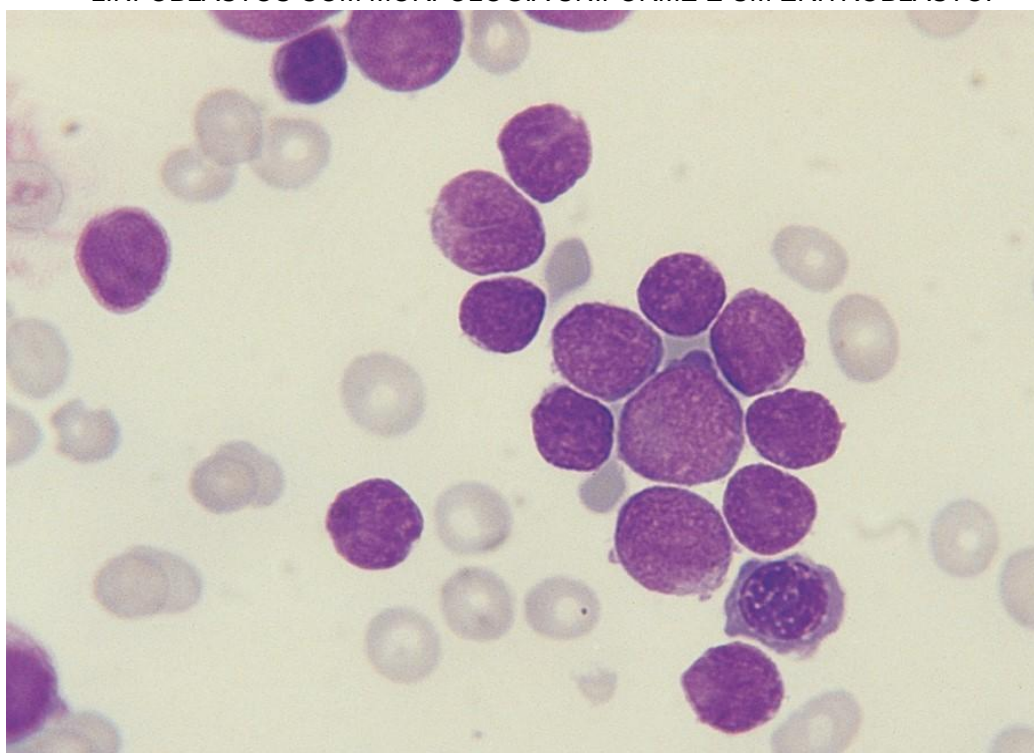
2.3.1.1 Classificação morfológica

O grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) classifica a LLA morfológicamente dividindo os linfoblastos em três subtipos, sendo eles L1, L2 e L3. Estima-se que, em crianças, a maior frequência seja do subtipo L1, representando 85% dos casos de LLA, enquanto o subtipo L2 corresponde a 14% dos casos e o L3 representa somente 1% do total. Por outro lado, em adultos, o subtipo L2

corresponde a 50-60% dos casos, seguido do L1, que representa 30-40%, enquanto o L3 é o subtipo com menor frequência, representando apenas 2-5% do total (MARTINS; REGO; FALCÃO, 2005).

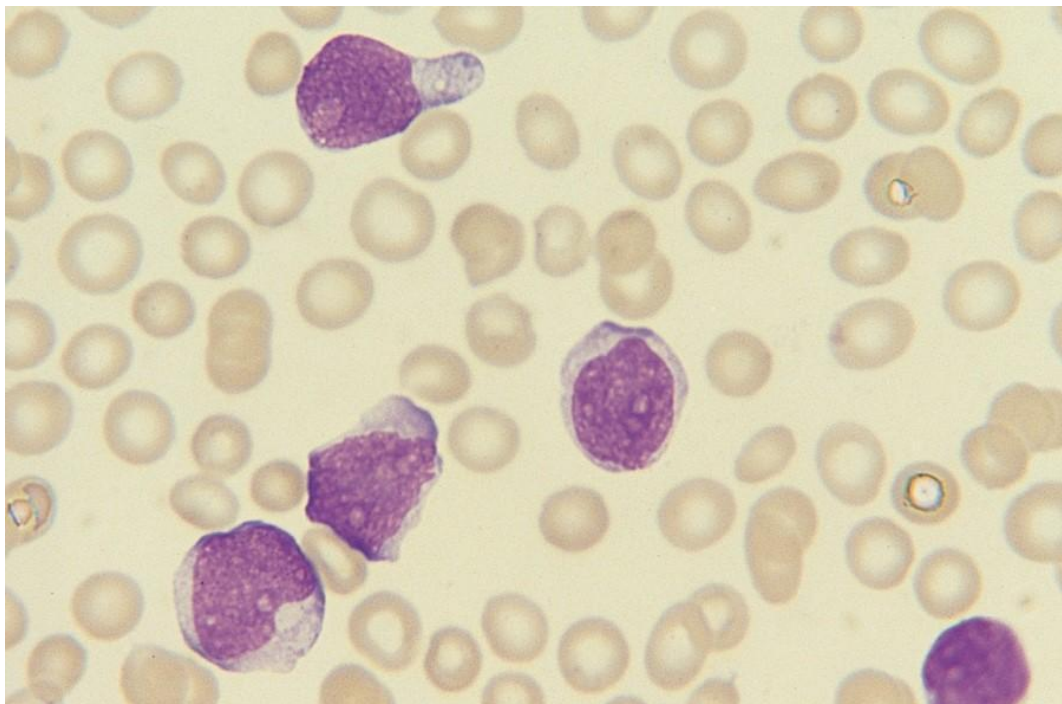
No subtipo L1 (FIGURA 1), as células blásticas apresentam aspecto homogêneo e diâmetro pequeno, enquanto que no subtipo L2 (FIGURA 2) as células blásticas possuem diâmetro maior e um aspecto heterogêneo. Já no subtipo L3 (FIGURA 3), as células blásticas apresentam diâmetro grande, porém com aspecto homogêneo. Em todos os subtipos, os blastos apresentam cromatina fina, podendo estar densa no subtipo L1. Neste subtipo, o núcleo apresenta-se regular com indentação, sem nucléolos visíveis. Já no subtipo L2, o núcleo é irregular com indentação, possuindo diversos nucléolos proeminentes. Por fim, o subtipo L3 apresenta núcleo redondo/oval regular com nucléolos múltiplos e proeminentes. Ademais, é observado que o volume citoplasmático das células do subtipo L1 é escasso, diferente dos subtipos L2 e L3, que apresentam citoplasma mais abundante. Além disso, verifica-se a presença de vacúolos citoplasmáticos nos blastos, sendo mais evidentes no subtipo L3 (LEE *et al.*, 1998 *apud* FARIAS; CASTRO, 2004).

FIGURA 1 - EXTENSÃO SANGUÍNEA DE LLA SUBTIPO L1 EXIBINDO LINFOBLASTOS COM MORFOLOGIA UNIFORME E UM ERITROBLASTO.



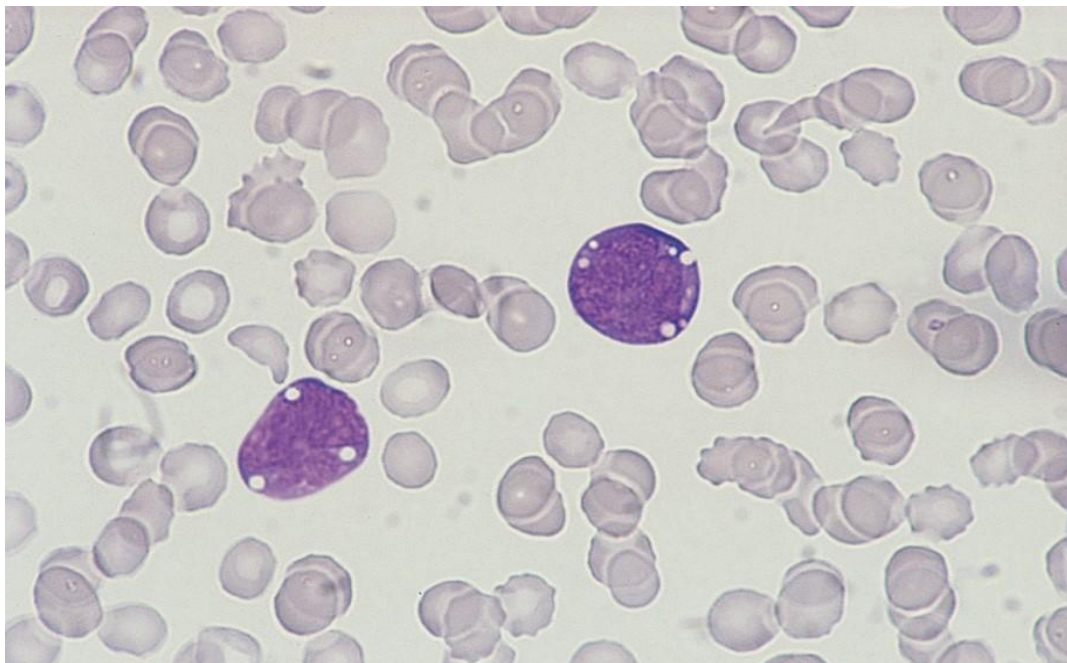
FONTE: Bain (2016).

FIGURA 2 - EXTENSÃO SANGUÍNEA DE LLA SUBTIPO L2 MOSTRANDO CÉLULAS BLÁSTICAS MAIORES E PLEOMÓRFICAS.



FONTE: Bain (2016).

FIGURA 3 - EXTENSÃO SANGUÍNEA DE LLA SUBTIPO L3 EXIBINDO CÉLULAS BLÁSTICAS DE TAMANHO MÉDIO E CITOPLASMA COM VACÚOLOS.



FONTE: Bain (2016).

2.3.1.2 Classificação imunofenotípica

A imunofenotipagem consiste na investigação dos antígenos celulares que são expressos pelos linfoblastos, possibilitando classificar a LLA em linhagens T e B. A LLA-B corresponde a 70-75% de casos em adultos e 80-85% em crianças, sendo o subtipo de maior ocorrência. Nessa linhagem, os blastos expressam HLA-DR, CD19 e/ou CD22 e/ou CD79a, sendo que o CD22 intracitoplasmático é um dos antígenos iniciais expresso pela linhagem B. Em relação aos linfócitos B maduros, os antígenos expressos são CD24, CD10, CD20, CD22, cadeias intracitoplasmáticas de imunoglobulina, CD21, cadeias de imunoglobulina de superfície (slg) e CD23, os quais são expressos sequencialmente conforme a maturação da célula (MARTINS; REGO; FALCÃO, 2005).

Os blastos da linhagem T representam aproximadamente 25% dos casos de LLA em adultos e 15% em crianças, sendo que, para a identificação da linhagem T, o principal critério é a expressão do antígeno CD3 tanto no citoplasma quanto na membrana celular. Com o CD3, há a expressão dos antígenos CD2, CD1a, CD5, CD4 ou CD8. Também observa-se que o antígeno CD7 é encontrado em aproximadamente todos os casos (MARTINS; REGO; FALCÃO, 2005).

A leucemia linfoblástica aguda de linhagem T em crianças possui um pior prognóstico quando comparada à linhagem B, necessitando de tratamento mais intenso, diferente do observado em adultos, no qual, a linhagem B é o subtipo que apresenta pior prognóstico (PUI; BEHM; CRIST, 1993; PUI *et al.*, 1999 *apud* SILVEIRA; ARRAES, 2008).

2.3.1.3 Classificação citogenética

As anormalidades cromossômicas na LLA estão presentes em 90% dos pacientes pediátricos e 60-80% dos adultos, sendo um dos principais parâmetros que exerce influência na resposta do paciente ao tratamento. Além do mais, constata-se que modificações cromossômicas numéricas são mais comuns que as estruturais (MARTINS; REGO; FALCÃO, 2005).

As translocações t(9;22), t(4;11) e t(1;19) correlacionam-se com um mau prognóstico da LLA de células B; já a translocação t(12;21) está relacionada à hiperdiploidia, possuindo um bom prognóstico e sendo encontrada em 20-30% das LLA de linhagem B. Em relação à LLA de linhagem T, a translocação mais comumente observada é a t(11;14) (MARTINS; REGO; FALCÃO, 2005).

O cromossomo Philadelphia é uma translocação entre os cromossomos 9 e 22, t(9;22), representando 3-5% dos casos de LLA da linhagem B em crianças e até 30% dos casos em pacientes adultos. Quando presente, consiste em um elemento de grande importância, representando um mau prognóstico (MARTINS; REGO; FALCÃO, 2005).

Com o avanço da citogenética e da imunofenotipagem, foi possível obter uma classificação da OMS baseada nessas duas metodologias. Dessa forma, a revisão realizada pela OMS em 2008, permitiu a classificação das leucemias linfoblásticas em leucemia linfoblástica de células B e leucemia linfoblástica de células T, sendo que a de linhagem B é dividida em subgrupos (VARDIMAN *et al.*, 2009 *apud* SILVA *et al.*, 2016). A alteração citogenética das células leucêmicas observada por meio do imunofenótipo contribui para o estabelecimento da causa, além de ser um método que apresenta sensibilidade e especificidade. Dessa forma, é de grande valia a associação entre imunofenotipagem e citogenética para o reconhecimento das leucemias linfoblásticas (SILVA *et al.*, 2016).

2.3.2 Sintomas e manifestações clínicas

Com o conhecimento de que na LLA ocorre a multiplicação e, conseqüentemente, um aumento dos linfoblastos na medula óssea, é observada uma diminuição das outras células hematológicas devido à alteração da hematopoiese normal (RIBEIRO, 2005). Dessa forma, observa-se nos pacientes com LLA a presença de anemia e neutropenia, além de plaquetopenia, que resulta no aparecimento de manifestações hemorrágicas, incluindo petéquias e epistaxe. Da mesma forma, notam-se alterações teciduais decorrentes da disseminação extramedular, entre as quais destacam-se a linfadenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia (COPELAN; MCGUIRE, 1995 *apud* BARRIOS; LAKSA, 2005).

As manifestações clínicas estão relacionadas com a intensidade de insuficiência medular e a infiltração extramedular. A sintomatologia é variável, na qual pode ser observada a presença de febre provocada pela infecção decorrente da neutropenia ou devido às citocinas liberadas pelas células tumorais. Além do mais, pode ocorrer anemia levando à fadiga, letargia e dispnéia, além de dores nos ossos ou articulações. Um fato a destacar é que crianças podem apresentar dor óssea proeminente com contagem de células sanguíneas normais, o que pode ter como

consequência um diagnóstico tardio (BASSAN; HOELZER, 2011; PUI, 2006; FREEDMAN; ASTER, 2015; LARSON *et al.*, 1995 *apud* LARSON, 2016).

Existem sintomas menos comuns, nos quais, destacam-se a cefaléia, vômitos, oligúria, anúria, assim como alterações nas funções mentais. Pacientes com contagem inicial de leucócitos acima de $400 \times 10^9/L$ podem apresentar hemorragia intracraniana (LOWE, *et al.*, 2005 *apud* LARSON, 2016). Em meninos, uma manifestação rara que pode ocorrer é o aumento não dolorido de um dos testículos. Eventualmente, os pacientes podem apresentar dificuldade na respiração ou síndrome da cava superior em consequência da infiltração das células tumorais no mediastino (RIBEIRO, 2005).

2.3.3 Diagnóstico laboratorial

2.3.3.1 Hemograma

No hemograma de um paciente com LLA, geralmente observa-se anemia normocítica normocrômica, além da contagem de plaquetas abaixo dos valores de referência. A contagem de leucócitos pode estar dentro dos valores de referência, reduzida ou elevada, podendo chegar a $200 \times 10^3/uL$ ou mais (HOFFBRAND; MOSS, 2018). Quando é observada leucopenia, os pacientes podem exibir linfoblastos ausentes ou em pequenas quantidades. Em contrapartida, nas situações em que há leucocitose, os linfoblastos são as células em maior número, além de expressarem sombras nucleares ou manchas de Gumprecht (NAOUM, F. A.; NAOUM, P. C., 2006). Segundo Margolin e Poplack (1997 *apud* IKEUTI; BORIM, LUPORINI, 2006), em 80% dos casos de LLA, os níveis de hemoglobina encontrados foram abaixo de 10 g/dL, enquanto Cornacchioni e Filho (2006 *apud* PEZZINI; CASTRO, 2014) relataram hemoglobina inferior a 7,5 g/dL em 51% dos casos. Dessa forma, pode-se perceber que as concentrações de hemoglobina na LLA tendem a oscilar entre 7,5 e 10 g/dL.

2.3.3.2 Mielograma

Na maioria dos pacientes com LLA, o mielograma evidencia uma medula óssea hiperclular com infiltração acentuada por linfoblastos (NAOUM, F. A.;

NAOUM, P. C., 2006). A presença de uma quantidade superior a 20% de linfoblastos confere o diagnóstico da LLA (SEKINE, 2016).

No mielograma são observadas células leucêmicas devido à substituição dos espaços adiposos e elementos medulares normais, além da presença de precursores mieloides e eritróides residuais sem alteração, assim como a diminuição dos megacariócitos ou sua ausência (LEE *et al.*, 1998 *apud* FARIAS; CASTRO, 2004). Em alguns casos, não é possível adquirir o aspirado de medula óssea, uma vez que pode haver necrose ou fibrose, além da presença de um excesso de células leucêmicas (RIBEIRO, 2005).

2.3.3.3 Citoquímica

Na coloração de May-Grunwald-Giemsa, os linfoblastos normalmente exibem tamanho pequeno, com citoplasma escasso de uma basofilia azul clara e núcleo arredondado. Porém, em alguns casos, também podem exibir um tamanho maior, com nucléolos proeminentes. Da mesma forma, na análise dos linfoblastos de alguns pacientes com LLA, pode ser possível a observação de grânulos citoplasmáticos que se coram de fúcsia (LARSON, 2016).

A citoquímica, por meio das reações de Sudan Black e mieloperoxidase, apresenta marcação negativa na leucemia linfoblástica aguda, permitindo sua distinção em relação à leucemia mieloide aguda, que apresenta marcação positiva para ambas as colorações (LARSON, 2016).

Já na coloração com ácido periódico de Schiff, os linfoblastos apresentam positividade na forma de anéis concêntricos formados por grânulos grosseiros de coloração rosa, ao passo que os mieloblastos, quando apresentam-se positivos, não apresentam esses grânulos (LEE *et al.*, 1998; LORENZI, 1999 *apud* FARIAS; CASTRO, 2004).

2.3.3.4 Citogenética

Algumas alterações citogenéticas são frequentemente encontradas na LLA e, conforme as anormalidades detectadas, podem refletir um bom ou mau prognóstico. Em torno de 90% das crianças, além de 60 a 80% de indivíduos adultos com LLA exibem alterações cromossômicas (SIMÕES, 2013). Em situações em que

se observa uma normodiploidia ou uma hiperdiploidia, pode-se prever que há um bom fator prognóstico (LORENZI, 2006). Ademais, um mau prognóstico é observado quando há 47 a 50 cromossomos, além de casos de hipodiploidia (SIMÕES, 2013).

A translocação t(9;22), encontrada mais frequentemente em pacientes adultos, está relacionada a um prognóstico desfavorável. Da mesma forma, as t(4;11) e t(1;19) também estão associadas a um mau prognóstico em todas as faixas etárias. Já a translocação t(12;21) (p13;q22), encontrada em aproximadamente 20 a 25% de crianças com LLA de linhagem B, está correlacionada a hiperdiploidia e a um bom prognóstico. O deslocamento do MYC para próximo das regiões promotoras do gene da cadeia pesada da imunoglobulina, que ocorre por conta da translocação t(8;14), relacionada com a LLA-B, leva a uma expressão exacerbada desse proto-oncogene (SIMÕES, 2013). Essa alteração está relacionada a um prognóstico favorável quando associado a prescrição de agentes quimioterápicos em altas doses (CHAUFFAILLE; ZACCHI, 2021).

Na LLA de linhagem T, podem ser visualizadas translocações nos *locus* do receptor de células T (TCR), nos quais situam-se nos cromossomos 14q11.2, 7q35 e 7p14-15. Além disso, na maioria dos casos de LLA de linhagem T, são verificadas mutações no receptor transmembrana, que é responsável por controlar o crescimento regular dos linfócitos T (BASSAN; HOELZER, 2011; MOORMAN *et al.*, 2007 *apud* SIMÕES, 2013).

2.3.3.5 Imunofenotipagem

Em relação à metodologia utilizada para a imunofenotipagem, a citometria de fluxo é uma das técnicas mais realizadas, sendo útil no diagnóstico de neoplasias hematológicas. É um método baseado na identificação de propriedades físicas de partículas em suspensão, como é o caso das células (MAHNKE; ROEDERER, 2007 *apud* SILVEIRA; ARRAES, 2008). Dessa forma, há a possibilidade de reconhecer os marcadores celulares expressos nos diferentes tipos e subtipos das leucemias agudas, além de permitir a caracterização do estágio que o clone se encontra em amadurecimento (BÉNÉ *et al.*, 1999; DREXLER; GIGNAC; MINOWADA, 1988; Martins; Falcão, 2000 *apud* SILVEIRA; ARRAES, 2008). Ademais, a imunofenotipagem permite a determinação das apresentações clínicas dos

diferentes tipos da doença, além da possibilidade de investigação de doença residual mínima (SILVA *et al.*, 2016).

Efetua-se uma imunofenotipagem inicial que envolve marcadores preliminares com o intuito da distinção entre a LLA de linhagem B e de linhagem T. Após essa diferenciação, realiza-se uma imunofenotipagem complementar, na qual há o emprego de marcadores mais específicos (SILVA *et al.*, 2016). De acordo com o European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (BENE *et al.*, 1995 *apud* SILVA *et al.*, 2016) e British Committee for Standards in Haematology (1994 *apud* SILVA *et al.*, 2016), os marcadores preliminares para o linfócito B são CD10, CD19 e CD20, enquanto que os marcadores preliminares para o linfócito T são CD2, CD3 e CD7.

A correlação da imunofenotipagem com a citogenética contribui para o aumento da sensibilidade e especificidade da identificação dos diversos tipos e subtipos da neoplasia (SILVA *et al.*, 2016). Sendo assim, entre as correlações mais comuns, cita-se a alteração citogenética t(9;22), na qual os marcadores imunofenotípicos são: CD19+, CD10+, CD34++, CD38-/+ e CD13+. Outra alteração é a t(12;21) que envolve os marcadores CD19+, CD10++, CD20-/+ , CD34+, CD45-/+ e HLA-DR++. Também existe a alteração 11q23 que apresenta como marcadores imunofenotípicos o CD19-, CD10-, CD20-, CD34+, CD15+, CD65+ e 7.1+ (DE ZEN *et al.*, 2000; KHALIDI *et al.*, 1999; TABERNERO *et al.*, 2001 *apud* SILVA *et al.*, 2016).

2.3.4 Tratamento

O tratamento da LLA inclui as fases de indução, profilaxia do sistema nervoso central (SNC), consolidação e manutenção (SIMÕES, 2013), que tem sua intensidade definida de acordo com o prognóstico do paciente. A escolha da terapia, doses e frequência de sua administração são dependentes de características como a idade, o sexo e o tempo em que observa-se remissão da doença. De modo geral, adultos e lactentes menores de 1 ano são populações que apresentam um pior prognóstico, assim como pacientes do sexo masculino. Ainda, um período de remissão maior que 4 semanas indica um mau prognóstico. A LLA-T, quando observada em crianças, representa prognóstico desfavorável. Ademais, quando o

paciente apresenta um prognóstico favorável, a intensidade do tratamento pode ser diminuída (HOFFBRAND; MOSS, 2018).

Com exceção à LLA de células B maduras, na qual o tratamento envolve quimioterapia intensiva em um período curto (LEE *et al.*, 2001; PATTE *et al.*, 2001 *apud* PUI; EVANS, 2006), os outros tipos de tratamento envolvem as fases de indução de remissão, intensificação e manutenção do tratamento com o intuito de remoção da doença residual. O tratamento voltado para o SNC é realizado em diferentes prazos, baseando-se na intensidade da terapia generalizada, probabilidade de recaída e se há emprego de irradiação craniana (PUI; EVANS, 2006).

A fase de indução tem como finalidade a redução de grande parte das células tumorais para um quadro onde são observados menos que 5% de blastos na medula óssea, ausência de blastos no sangue periférico, nenhum sintoma e valores do hemograma dentro dos intervalos de referência (HOFFBRAND; MOSS, 2018). Se todas essas condições forem observadas, considera-se que o paciente alcançou a remissão da doença. Em média, a remissão ocorre por um período de 1,3 a 2,8 anos, sendo que as chances da remissão prosseguir depois do terceiro ano podem variar de 30% a 45% (FADERL *et al.*, 2012 *apud* SIMÕES, 2013).

Na fase de indução, usualmente são administrados vincristina, corticoides como a dexametasona ou a prednisona, antraciclinas, tal como a doxorrubicina, podendo esses fármacos serem associados ou não com a L-asparaginase e/ou a ciclofosfamida (ABRALE, 2019). Também, dependendo do prognóstico, pode-se utilizar altas doses de metotrexato ou citarabina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022). Na LLA cromossomo Philadelphia positivo (Ph +), adiciona-se ao tratamento um inibidor da tirosina cinase, como o imatinibe. Já para o tratamento da LLA B positiva para CD20, pode ser incorporado ao esquema terapêutico o rituximabe, que consiste em um anticorpo monoclonal que apresenta como alvo o antígeno CD20 (EMADI; LAW, 2022). Além disso, existe a Blinatumomabe, que é uma imunoterapia para pacientes que apresentam DRM maior ou igual a 0,1% mesmo com LLA-B em remissão (ABRALE, 2019).

Ainda que o paciente tenha alcançado uma remissão completa, pode ser observada doença residual mínima que consiste na permanência de algumas células tumorais no organismo. Conseqüentemente, o paciente apresentará um risco maior de recidiva. Em casos que os blastos ainda estejam sendo observados mesmo após

a conclusão da primeira fase da quimioterapia, é realizada uma nova análise para a escolha dos quimioterápicos mais indicados para um outro ciclo de tratamento (ABRALE, 2019).

Em relação ao SNC, observa-se que no período do diagnóstico inicial não há uma prevalência significativa de pacientes com presença de blastos no líquido, representando entre 3 a 7% do total de casos. No entanto, há a necessidade de realizar uma terapia de prevenção, uma vez que é observada metástase para o SNC em mais de 50% dos pacientes sem profilaxia (ABRALE, 2019). Além disso, diversos medicamentos utilizados de forma sistêmica não atravessam a barreira hematoencefálica e atingem o líquido cefalorraquidiano de forma satisfatória; por esse motivo, realiza-se um tratamento específico para o SNC (HOFFBRAND; MOSS, 2018), o qual tem como finalidade prevenir a ocorrência de metástases tanto para o cérebro, quanto para a medula espinhal (ABRALE, 2019).

Entre os esquemas terapêuticos direcionados ao SNC há a quimioterapia intratecal, na qual os medicamentos comumente utilizados são o metotrexato, citarabina e corticoides (ABRALE, 2019). Dentre os corticoides utilizados, destaca-se a dexametasona, que apresenta uma infiltração mais eficaz no SNC, além de um maior tempo de meia-vida quando comparada a outros corticóides (BOSTROM *et al.*, 2003; MITCHELL *et al.*, 2005 *apud* PUI; EVANS, 2006). Um outro tratamento empregado é a quimioterapia sistêmica em doses elevadas envolvendo a aplicação de fármacos que atravessam a barreira hematoencefálica, entre os quais destacam-se o metotrexato, a L-asparaginase, a 6-mercaptopurina, além da citarabina e da dexametasona. Embora a radioterapia craniana possa ser utilizada, a radiação apresenta efeitos colaterais neurocognitivos, além de causar lesões em outros órgãos. Sendo assim, em crianças, a irradiação craniana é realizada somente se o paciente apresentar metástase ou recidiva no SNC (ABRALE, 2019).

Quando a remissão completa é alcançada, inicia-se a fase pós-remissão do tratamento com a finalidade de eliminar células leucêmicas residuais (ABRALE, 2019). Tal fase do tratamento é denominada consolidação, que é caracterizada pela administração dos medicamentos em doses mais elevadas do que na fase de indução (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022), e que se aproximam das doses relacionadas ao limite de tolerância (HOFFBRAND; MOSS, 2018). Logo, neste período do tratamento, são realizadas diversas hospitalizações e cuidados intensivos para dar suporte ao paciente (UCSF HEALTH, [20--]).

Os medicamentos utilizados durante a consolidação abrangem os mesmos quimioterápicos empregados na fase de indução. Os protocolos de tratamento mais comuns podem incluir metotrexato, citarabina, 6-mercaptopurina ou etoposídeo (HOFFBRAND; MOSS, 2018; UCSF HEALTH, [20--]), vincristina, ciclofosfamida e daunorrubicina (HOFFBRAND; MOSS, 2018). Assim como na fase de indução, em pacientes com a LLA cromossomo Philadelphia positivo (Ph +), o imatinibe também costuma ser incorporado na etapa da consolidação (ABRALE, 2019; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

Posteriormente a consolidação é iniciada a manutenção, que tem como finalidade prevenir a recidiva da LLA depois das fases de indução e consolidação. Nessa etapa do tratamento, os quimioterápicos são administrados em doses mais baixas, por cerca de 24 meses (ABRALE, 2019). Normalmente, os medicamentos utilizados nessa fase são a 6-mercaptopurina e o metotrexato, ambos por via oral. Também podem ser administrados a prednisona e a vincristina.

Segundo Lorenzi (2006), a remissão e a cura da LLA em adultos são de aproximadamente 30%, enquanto em crianças de 2 a 10 anos é observado um valor maior que 85%. À vista disso, com a intenção de reduzir as chances de recidiva no adulto, há a possibilidade de intensificar o tratamento com o aumento das doses de L-asparaginase e de metotrexato (SIMÕES, 2013).

2.4 METOTREXATO

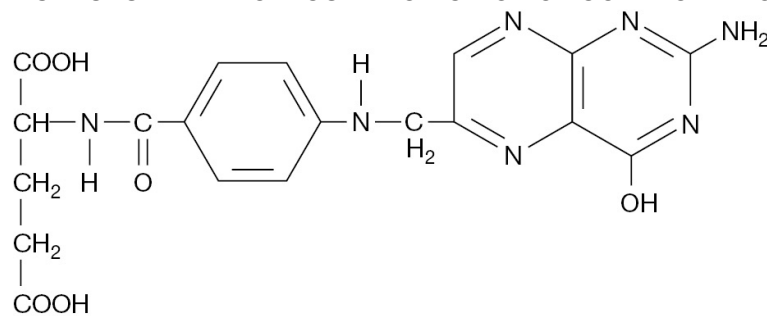
O metotrexato é um medicamento análogo do ácido fólico que é utilizado em casos de psoríase grave e artrite reumatóide (METREXATO, 2017). Na oncologia possui indicação em neoplasias trofoblásticas gestacionais, profilaxia e tratamento de linfomas não-Hodgkin e de Burkitt, câncer pulmonar de células pequenas, câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama, osteossarcoma, leucemia meníngea, terapia paliativa de tumores sólidos inoperáveis e leucemia linfoblástica aguda (METOTREXATO, 2022).

O metotrexato se diferencia do ácido fólico (FIGURA 4) por apresentar substituição do grupo OH por um grupo amino no N4 do anel pteridínico, além da inserção no N10 de um grupo metil (NUCCI, 2021).

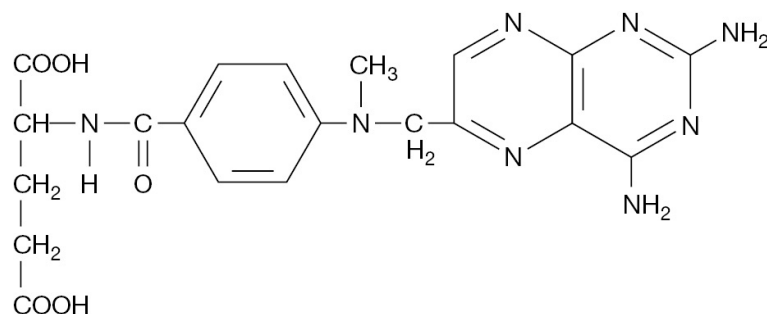
O folato está envolvido com a síntese de DNA, uma vez que é fundamental para a síntese de timidina. Quando sua deficiência é observada, ocorrem defeitos na

maturação nuclear, que ocasiona o retardo ou o bloqueio da divisão celular (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2016). O folato é reduzido pela dihidrofolato redutase (DHFR) a tetrahidrofolato (FH4) para agir como cofator em reações de transferência de carbono. O FH4 atua na síntese do timidilato, de purinas e dos aminoácidos serina e metionina (CHU, *et al.*, 2022).

FIGURA 4 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA DO ÁCIDO FÓLICO E DO METOTREXATO.



Ácido fólico



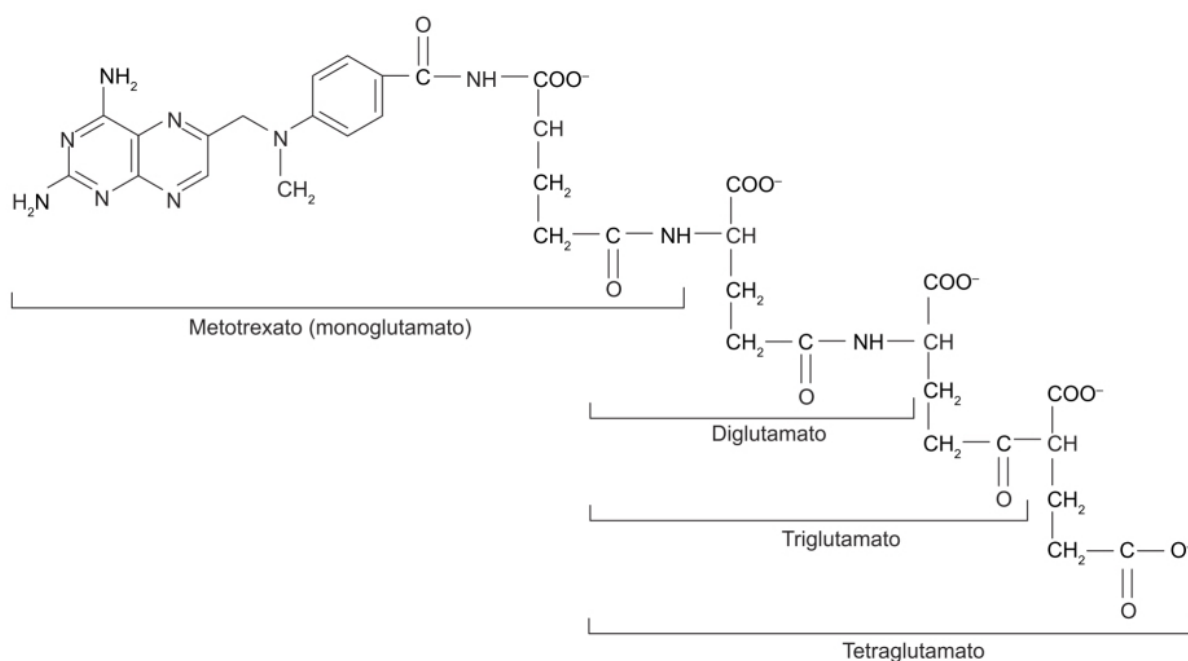
Metotrexato

FONTE: Chu (2022).

Em relação ao seu mecanismo de ação, o metotrexato atua como um inibidor da DHFR, uma vez que tem a capacidade de ligar ao sítio catalítico ativo desta enzima. Dessa forma, ocorre a interrupção da síntese de RNA e DNA (CHU, *et al.*, 2022), e a estagnação da célula na fase S do ciclo celular (BACA; COEN; GOLAN, 2014). Ademais, há a conversão do metotrexato em poliglutamatos (FIGURA 5), que é catalisada pela folilpoliglutamato sintase (CHU, *et al.*, 2022). Nesse sentido, deve-se destacar que o efeito inibitório do metotrexato é aumentado pela presença dos poliglutamatos armazenados dentro das células, uma vez que estes atuam inibindo a timidilato sintase e a DHFR (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015), promovendo o bloqueio da biossíntese de nucleotídeos de timidilato e de purinas (CHU, *et al.*, 2022). Desse modo, o acúmulo de poliglutamatos dentro da

célula leva ao bloqueio da DHFR por um maior período de tempo, mesmo depois de ocorrer a diminuição da concentração plasmática do metotrexato (NUCCI, 2021).

FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS POLIGLUTAMATOS DO METOTREXATO.



FONTE: Nucci (2021).

As células malignas exibem uma maior seletividade ao metotrexato em relação às células não tumorais, uma vez que os intermediários do folato são necessários para a síntese de compostos essenciais à sobrevivência das células leucêmicas, destacando aqueles que são fundamentais para a síntese de DNA, como o timidilato e as purinas (BACA; COEN; GOLAN, 2014). Além disso, tal seletividade também pode ser atribuída ao fato de que células não tumorais, por apresentarem uma taxa de replicação inferior ao das células leucêmicas, acumulam menor quantidade de poliglutamatos, e conseqüentemente, apresentam menor amplificação do efeito do metotrexato por parte destes compostos (NUCCI, 2021).

Entretanto, é pertinente relatar que o metotrexato não é completamente seletivo para as células tumorais, onde seu uso pode acarretar na morte de células não tumorais em divisão, principalmente daquelas pertencentes aos tecidos com alta taxa de renovação, como as células da medula óssea e as do epitélio intestinal (WELLSTEIN, *et al.*, 2019).

O metotrexato penetra nas células por difusão passiva. No entanto, uma vez que altas concentrações desse composto no fluido intersticial e no plasma também

favorecem sua entrada em tumores sólidos, é realizada a administração de doses elevadas desse quimioterápico (NUCCI, 2021). Contudo, quando administrado em doses elevadas, o metotrexato apresenta risco de toxicidade a vários sistemas, sendo necessário o monitoramento terapêutico deste fármaco durante o seu uso (COELHO, *et al.*, 2021).

O ácido folínico (leucovorin), que é a forma reduzida do folato, pode ser administrado para minimizar os efeitos tóxicos do metotrexato (NUCCI, 2021; WELLSTEIN, *et al.*, 2019). O leucovorin (N5-formil-FH4) é convertido em N5-N10-metileno-FH4, dessa forma, apresenta a capacidade de contornar a inibição da DHFR ocasionado pelo metotrexato, reconstituindo os níveis de folato (LAPLANT; LOUZON, 2016).

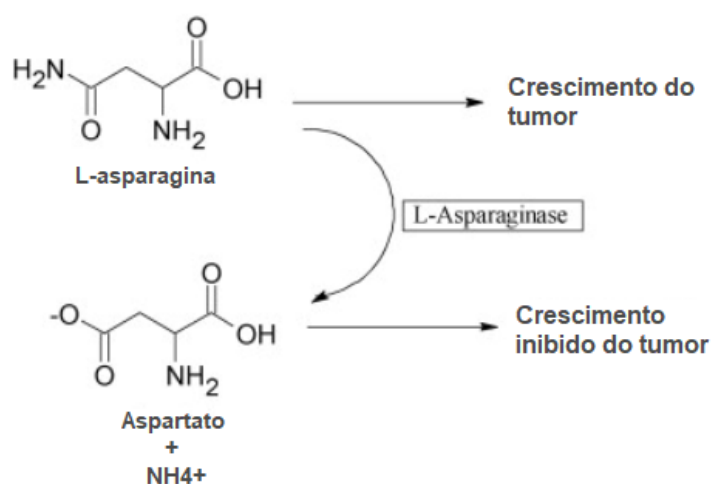
Os efeitos adversos e tóxicos do metotrexato ocorrem principalmente em tecidos que exibem maior sensibilidade ao fármaco, como a mucosa intestinal, medula óssea, mucosa bucal e células da bexiga dado que são tecidos com taxas de proliferação elevadas (METOTREXATO, 2022). Além disso, os indivíduos que fazem o uso do fármaco apresentam risco de hemorragia espontânea ou infecção de alta letalidade. Pacientes com insuficiência renal podem ter mielossupressão prolongada devido ao maior tempo necessário para eliminar o fármaco. Nessa situação, quando detectada diminuição da depuração de creatinina, é necessário diminuir de maneira proporcional a dose do metotrexato (WELLSTEIN, *et al.*, 2019). Além do mais, o metotrexato por si só pode provocar insuficiência renal quando utilizado em doses elevadas. Isso ocorre devido a sua cristalização nos túbulos renais, que pode ser evitada pela alcalinização da urina e pela elevação do fluxo urinário através da reposição de água (SAUSVILLE; LONGO, 2015).

A administração do metotrexato pode ser realizada por via oral, intravenosa, intramuscular ou intratecal. A injeção por via intratecal pode levar a uma resposta inflamatória no líquido cefalorraquidiano, além de meningismo. Ademais, pode haver nefrotoxicidade posterior a administração de altas doses do fármaco. Da mesma forma, outros efeitos tóxicos como alopecia, aborto, teratogênese, dermatite, pneumonite intersticial alérgica e formação deficiente de células reprodutoras (tanto femininas, quanto masculinas) podem ser observadas (WELLSTEIN *et al.*, 2019).

2.5 L-ASPARAGINASE

A utilização da L-asparaginase é indicada para o tratamento quimioterápico da LLA. Além disso, pode ser utilizada nas leucemias mieloides e nos linfomas Hodgkin e não Hodgkin (FILHO *et al.*, 2010). O mecanismo é baseado na sua ação catalisadora, uma vez que atua como enzima responsável pela conversão do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia (FIGURA 6), levando à privação de L-asparagina presente no plasma para células tumorais. Diferentemente de células não neoplásicas, células tumorais, sobretudo células características da LLA, apresentam uma capacidade baixa de sintetizar a L-asparagina intracelular, uma vez que não apresentam expressão significativa da L-asparagina sintetase. Como consequência, tais tipos celulares necessitam de uma fonte exógena da L-asparagina para a sua sobrevivência. Dessa forma, a hidrólise da L-asparagina extracelular realizada pela L-asparaginase impossibilita a sua captação pelas células neoplásicas e a sua sobrevivência (PAPAGEORGIO; MCLEOD, 2004; SPECTRILA, 2022).

FIGURA 6 - ESQUEMATIZAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA L-ASPARAGINASE



FONTE: Adaptado de Narta; Kanwar; Azmi (2006).

Devido ao seu mecanismo de ação, o uso da L-asparaginase promove a eliminação de células leucêmicas de forma seletiva, com pouco acometimento das células não tumorais. Por fim, destaca-se que a L-asparaginase consiste em um fármaco que age na fase G1 do ciclo celular, uma vez que nessa fase do ciclo ocorre a síntese de proteínas, RNA e enzimas essenciais para a síntese do DNA (PAPAGEORGIO; MCLEOD, 2004; SPECTRILA, 2022).

O emprego da L-asparaginase na LLA é efetuado na fase de indução, sendo um tratamento de primeira linha, com o intuito de reduzir a possibilidade do desenvolvimento de resistência contra esse fármaco, visto que, células tumorais, por sua plasticidade, adquirem a capacidade de produzir a L-asparagina, gerando resistência ao tratamento com L-asparaginase. Para o tratamento de leucemias agudas, em especial a leucemia infantil, este fármaco é comumente utilizado em associação com outros compostos, principalmente corticoides, antracíclicos e a vincristina (ABRALE, 2021). Nesse sentido, tem sido relatada a ocorrência de sinergismo no efeito citotóxico/antitumoral quando se associa a L-asparaginase com o metotrexato ou com a citarabina. No entanto, também tem sido relatada uma possível influência da ordem de aplicação dos fármacos para a indução desse sinergismo, visto que alguns autores observaram aumento da citotoxicidade para as células leucêmicas ao administrar o metotrexato previamente a aplicação da L-asparaginase (PAPAGEORGIO; MCLEOD, 2004).

Em relação à toxicidade, é relevante considerar a existência de diversos efeitos que são limitadores da dose de L-asparaginase, entre os quais destaca-se a ocorrência de reações alérgicas posterior à administração de múltiplas doses, principalmente por via intravenosa. Além disso, podem ser observados outros efeitos colaterais, que incluem náuseas e vômitos, assim como a perda de apetite, encefalopatia, confusão mental e sonolência, não necessitando de suspensão do tratamento na maioria dos casos. Também, pode ser verificado um acometimento na cascata da coagulação, que resulta em hemorragias e trombozes no SNC, além de hiperglicemia, hepatotoxicidade, pancreatite aguda e azotemia pré-renal (PAPAGEORGIO; MCLEOD, 2004; SPECTRILA, 2022).

A L-asparaginase está presente em diversas plantas e animais; no entanto, pela dificuldade de obtenção da enzima a partir dessas fontes, alternativas foram buscadas, tendo sido identificados microrganismos como fonte de extração desse fármaco. O resultado a partir destas fontes não apenas foi satisfatório, como apresentou baixo custo, sendo que as espécies bacterianas que obtiveram maior destaque foram *Escherichia coli* e *Erwinia caratovora*. A L-asparaginase extraída das duas bactérias apresenta uma menor toxicidade quando comparada à outras enzimas com efeitos antitumorais (DUVAL *et al.*, 2002 *apud* NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Desse modo, as duas fontes são formas nativas da L-asparaginase utilizadas no tratamento de primeira linha, sendo também empregadas em casos de

recaída. Além dessas fontes, existe uma preparação modificada da enzima proveniente da *Escherichia coli*, denominada pegasparaginase, que consiste em uma conjugação da L-asparaginase com polietilenoglicol (PEG), sendo uma alternativa para a terapia da LLA em pacientes que apresentam hipersensibilidade frente à L-asparaginase extraída da *Escherichia coli* (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). O desenvolvimento de processos que promovem a modificação da L-asparaginase mostrou-se necessário devido a uma imunogenicidade elevada encontrada em muitos pacientes, os quais exibem uma hipersensibilidade a enzima, que resulta em reações alérgicas leves ou pode causar efeitos mais graves levando a choques anafiláticos (UREN; HANDSCHUMACHER, 1977 *apud* NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Além disso, a L-asparaginase nativa possui um tempo de meia-vida curto, resultando em uma ação menos prolongada. Dessa forma, foram realizadas modificações químicas com o intuito de aumentar o tempo de meia-vida e diminuir a imunogenicidade, sem perder a atividade antineoplásica esperada (ABUCHOWSKI *et al.*, 1979; UREN; RAGIN, 1979 *apud* NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Nesse sentido, observou-se que a conjugação da L-asparaginase com PEG apresentou os melhores resultados, obtendo a pegasparaginase. Assim, foi possível reduzir a imunogenicidade sem comprometer a atividade antitumoral do medicamento (ABUCHOWSKI *et al.*, 1979; YOSHIMOTO *et al.*, 1986 *apud* NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

Com o passar do tempo, foi identificado que as formas nativas da enzima possuem também atividade de L-glutaminase, resultando na hidrólise da L-glutamina. A atividade L-glutaminase está associada com a ocorrência de efeitos tóxicos, dificultando a realização completa do tratamento (KAFKEWITZ; BENDICH, 1983; SILVERMAN *et al.*, 2001; WARRELL *et al.*, 1982; *apud* CHAN *et al.*, 2014). Apesar de tentativas de purificação da enzima, com o intuito de eliminar essa atividade, nenhuma enzima obtida apresentou ausência dessa atividade residual, nem mesmo a L-asparaginase recombinante (CAMPBELL; MASHBURN, 1969 *apud* NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

2.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE METOTREXATO E L-ASPARAGINASE

Alguns protocolos de tratamento têm sugerido associar metotrexato e L-asparaginase para o tratamento de LLA, devido à ação sinérgica apresentada por

essa combinação. Contudo, estudos têm demonstrado que a utilização da L-asparaginase antes do metotrexato, resulta em um antagonismo entre os dois fármacos, sugerindo que a ordem de administração dos mesmos influencia no tipo de efeito estabelecido pela combinação.

No que se refere a ação antagônica da associação, alguns mecanismos têm sido propostos para justificar esse efeito, estando os mesmos relacionados a uma ação residual da L-asparaginase, a qual acarretaria na inibição da formação dos poliglutamatos a partir do metotrexato e no bloqueio da síntese de proteínas, podendo resultar na redução do efeito do metotrexato (CAPIZZI, 1974; VADLAMUDI *et al.*, 1973 *apud* KADIA *et al.*, 2015; CAPIZZI; NICHOLS; MULLINS, 1972 *apud* VADLAMUDI *et al.*, 1973).

Embora estudos tenham mostrado que a aplicação de L-asparaginase previamente ao metotrexato apresente um efeito antagônico, tentativas de associar ambos os fármacos em um regime terapêutico continuaram sendo realizadas impulsionadas principalmente pela redução da toxicidade do metotrexato promovida pela L-asparaginase. Neste sentido, em uma pesquisa realizada em crianças com LLA refratária, foi observado que a administração prévia da L-asparaginase tornou as células tumorais refratárias à ação do metotrexato no período em que há o bloqueio da síntese de DNA, o qual ocorre em torno de 10 dias após a administração de uma dose única de L-asparaginase. Posteriormente, observou-se que as células passam por um período de recuperação da atividade sintética, caracterizado por uma síntese de DNA aumentada, o que as torna mais sensíveis à ação do metotrexato (LOBEL *et al.*, 1979 *apud* CHABNER; FRIEDMANN, 2011).

A formação de glutamatos a partir do metotrexato consiste na adição de resíduos de glutamato ao glutamato terminal dos metabólitos pela ação da folilpoliglutamato sintetase. Poliglutamatos que apresentam cadeias longas ligam-se à DHFR com uma afinidade semelhante ou até superior à do metotrexato, inibindo a atividade da enzima (HARDMAN; LIMBIRD, 2003; SCHUMACHER, 1995; WINTER, 1992; *apud* LELES, 2008).

Neste sentido, um estudo *in vitro* efetuado empregando o uso células L5178Y (linhagem de linfoblasto originada a partir de um linfoma murino) em cultura de suspensão contínua (sistema em que há o fornecimento de meio fresco e a retirada do meio precedente de maneira contínua) e outra pesquisa também utilizando células L5178Y, constataram que a aplicação prévia de L-asparaginase

resulta na depleção de L-asparagina e consequente inibição da folilpoliglutamato sintetase, ocasionando a diminuição (ou mesmo ausência) da formação dos poliglutamatos de cadeia longa. Tal redução verificada para os poliglutamatos de cadeia longa foi maior do que a apresentada pelos poliglutamatos de cadeia média, não tendo sido observada alteração na concentração dos poliglutamatos de cadeias menores (JOLIVET *et al.*, 1985; SUR *et al.*, 1987 *apud* KLOOS *et al.*, 2019). Por outro lado, o estudo de Kloos *et al.* (2019), realizado com crianças que apresentavam LLA, avaliou a terapia com metotrexato com e sem a administração prévia de L-asparaginase. As crianças que receberam apenas metotrexato não apresentaram alteração da síntese de poliglutamatos, enquanto aquelas que receberam administração prévia de L-asparaginase mostraram redução de poliglutamatos de cadeia longa, porém de forma menos significativa do que o demonstrado por estudos *in vitro*, não sendo observado um efeito antagônico que compromettesse a ação do metotrexato. Desse modo, é possível observar que a redução na eficácia do metotrexato devido à administração prévia de L-asparaginase é mais significativa *in vitro* do que *in vivo*.

No que diz respeito ao uso da forma modificada da L-asparaginase, de acordo com o estudo de Appel *et al.* (2008), realizado com crianças diagnosticadas recentemente com LLA, a aplicação da PEG-asparaginase causou uma depleção total de L-asparagina extracelular. *In vitro*, por meio da utilização de amostras dos pacientes, observou-se uma diferença na concentração de L-asparagina intracelular, demonstrando que há células tumorais com capacidade de manter níveis de aminoácidos, incluindo a L-asparagina, suficientes para a sua sobrevivência, enquanto células tumorais que não apresentam essa capacidade são eliminadas do organismo. Contudo, não foram identificadas modificações imediatas ou tardias na concentração de L-asparagina intracelular avaliada por meio da execução de modelos experimentais *in vivo*. Uma possível explicação para a concentração de L-asparagina se encontrar detectável *in vivo*, é de que a glutamina possa estar atuando como fonte para a produção de L-asparagina, provendo o grupamento amino para a síntese de tal aminoácido. Dessa forma, a sua produção é diminuída caso ocorra depleção de glutamina. Como há níveis elevados de glutamina no organismo, não se observa a supressão da síntese de L-asparagina (ROTOLI *et al.*, 2005; TARDITO *et al.*, 2007 *apud* APPEL *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* realizados com a utilização de células L5178Y, demonstraram que o efeito antagônico não é verificado quando o metotrexato é aplicado previamente a L-asparaginase, sendo nessa situação, observado um sinergismo entre ambos os fármacos (SUR *et al.*, 1987 *apud* KLOOS *et al.*, 2019). Além do mais, um estudo realizado com pacientes que apresentavam diferentes tipos de leucemia, sendo elas: LLA, leucemia aguda indiferenciada, leucemia mieloblástica aguda, além de outros pacientes com leucemia aguda que já haviam sido tratados, demonstrou que a administração do metotrexato seguido da L-asparaginase, contribuiu para a redução da toxicidade induzida pelo primeiro (YAP *et al.*, 1978 *apud* CHABNER; ALLEGRA, 2011). A partir da literatura consultada, não foi encontrado um mecanismo aceito que explique a sinergia entre os dois fármacos em relação ao efeito citotóxico/antitumoral dos mesmos. Os estudos citam um efeito sinérgico quando ocorre a administração do metotrexato previamente a da L-asparaginase, entretanto, não analisam de fato se há uma potencialização da ação terapêutica.

Foi realizado um estudo com crianças com leucemia aguda que apresentavam recaídas, no qual foi efetuada uma administração inicial de L-asparaginase, uma administração de metotrexato, realizada cerca de 10 - 11 dias após a aplicação da L-asparaginase, e por fim, 24 h após a administração do metotrexato, uma outra aplicação de L-asparaginase após 24 horas, com a finalidade de reduzir os efeitos tóxicos do análogo de ácido fólico. Como a L-asparaginase leva ao bloqueio da fase G1, a sua administração posterior ao metotrexato preveniu a morte adicional de células não tumorais até atingir níveis plasmáticos não tóxicos desse fármaco (HARRIS *et al.*, 1980).

Dessa forma, sugere-se que uma possibilidade terapêutica para a combinação, seria a administração da L-asparaginase por um período de 9 a 10 dias antes da aplicação do metotrexato ou a administração de L-asparaginase imediatamente após o uso do análogo de ácido fólico, dado que esses esquemas de administração poderiam elevar a capacidade antitumoral do metotrexato. Dessa forma, haveria a possibilidade de utilizar esses fármacos de forma associada respeitando-se um determinado intervalo de tempo entre a administração de L-asparaginase e a de metotrexato.

Convém ressaltar que tanto o tipo quanto as propriedades citogenéticas das células tumorais influenciam o grau de poliglutaminação do metotrexato (SYNOLD *et*

al., 1994; WOJTUSZKIEWICZ *et al.*, 2015 apud KLOOS *et al.*, 2019). Além disso, as células também podem apresentar alteração quanto a sensibilidade à L-asparaginase. Assim sendo, células que são mais sensíveis a esse fármaco podem sofrer um efeito maior da depleção de asparagina e, conseqüentemente, apresentar uma poliglutaminação diminuída, bem como células menos sensíveis a L-asparaginase podem apresentar uma formação mais acentuada desses metabólitos (CHEN, 2015 apud KLOOS *et al.*, 2019).

Como mencionado ao longo desse trabalho, estudos nos quais a L-asparaginase é administrada previamente ao metotrexato tem apresentado resultados controversos quando se comparam os modelos *in vitro* e *in vivo*. Dessa forma, esquemas terapêuticos nos quais a L-asparaginase é administrada posteriormente a este fármaco têm sido avaliados. De acordo com Capizzi (1981 apud KLOOS *et al.*, 2019), quando a administração *in vivo* do metotrexato foi seguida da L-asparaginase extraída da *E.coli*, obtiveram-se índices favoráveis de remissão tumoral.

Quando se avalia a associação entre os fármacos, de acordo com a análise de Aguayo *et al.* (1999) em pacientes com LLA recorrente ou refratária, o regime MOAP, que emprega PEG-asparaginase posterior ao metotrexato, apresenta uma tolerância satisfatória na LLA, ressaltando que essa forma da asparaginase apresenta menor toxicidade, e havendo a possibilidade de mais estudos que demonstrem o sinergismo entre a PEG-asparaginase e o metotrexato. Dessa forma, assim como o observado por alguns estudos em relação à forma nativa da L-asparaginase, observa-se um benefício na administração posterior da PEG-asparaginase com relação à ação do metotrexato aplicado isoladamente.

3 CONCLUSÃO

A associação entre metotrexato e L-asparaginase apresenta benefícios terapêuticos para o paciente. De acordo com alguns estudos, esse efeito é apenas observado quando a L-asparaginase é administrada posteriormente ao metotrexato. Em caso de uma administração prévia dessa enzima, tem sido observada a indução de um efeito antagônico e não desejável. Essas premissas têm norteado protocolos terapêuticos que associam esses medicamentos. No entanto, uma análise mais cuidadosa da literatura mostra que os estudos que evidenciam esse antagonismo são essencialmente realizados *in vitro*; ensaios *in vivo*, não evidenciam um antagonismo tão pronunciado. Neste sentido, a ordem de administração dos fármacos ao paciente parece não ser um fator determinante da eficácia da associação. Todavia, a quantidade de estudos que demonstram diferenças no efeito da combinação *in vivo* conforme a ordem de administração dos fármacos, é escassa. Assim sendo, é imprescindível que sejam realizadas pesquisas com enfoque *in vivo* e clínico para se adquirir mais conhecimento no que diz respeito ao tratamento com a combinação desses dois fármacos na leucemia linfoblástica aguda, a fim de embasar com maior precisão os protocolos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

ABRALE. **Manual LLA**: Tudo sobre a leucemia linfóide aguda. Brasil: [s.n], 2019.

AGUAYO, A. *et al.* Combination therapy with methotrexate, vincristine, polyethylene-glycol conjugated-asparaginase, and prednisone in the treatment of patients with refractory or recurrent acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, Texas, v. 86, n. 7, p. 1203-1209, oct. 1999.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Typical Treatment of Acute Lymphocytic Leukemia (ALL)**. Disponível em: https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/treating/typical-treatment.html#written_by. Acesso em: 1 set. 2022.

ANJOS, A. R.; ALVARES-SILVA, M.; BORELLI, P. Matriz Extracelular e Leucemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.l.], v. 22, n. 3, p. 404-412, nov. 2000.

APPEL, I. M. *et al.* Pharmacokinetic, pharmacodynamic and intracellular effects of PEG-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: results from a single agent window study. **Leukemia**, The Netherlands, v. 22, p. 1665-1679, jun. 2008.

BACA, Q. J.; COEN, D. M.; GOLAN, D. E. Princípios de farmacologia antimicrobiana e antineoplásica. *In*: GOLAN D. E.; TASHJIAN JR. A. H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia - a base fisiopatológica da farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 572-589.

BAIN, B. J. **Células Sanguíneas**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

BARRIOS, C. H.; LAKSA, D. Leucemia Linfóide Aguda no Adulto. *In*: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia**: Fundamentos e Prática. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 477-485.

CHABNER, B. A.; ALLEGRA, C. J. Antifolates. *In*: CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer Chemotherapy and Biotherapy**: Principles and Practice. 5. ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. p. 109-138.

CHABNER, B. A.; FRIEDMANN, A. M. Asparaginase. *In*: CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer Chemotherapy and Biotherapy**: Principles and Practice. 5. ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. p. 411-417.

CHAN, W. K. *et al.* The glutaminase activity of l-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. **Blood**, Washington DC, v. 123, n. 23, p. 3596-3606, mar. 2014.

CHAUFFAILLE, M. L.; ZACCHI, F. F. S. Leucemia Linfoblástica Aguda. *In*: SANDES, A. F. *et al.* **Diagnósticos em Hematologia**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2021. p. 428-440.

CHU, E. Quimioterapia do Câncer. *In*: KATZUNG, B. G.; VANDERAH, T. W. **Farmacologia básica e clínica**. 15. ed. Porto Alegre: AMGH, 2022. p. 985-1014.

COELHO, L. V. A. *et al.* **Metotrexato em altas doses no tratamento de crianças com leucemia linfoblástica aguda**: monitorização de nível sérico e fatores associados à toxicidade. 23 f. Trabalho acadêmico (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica) – IMIP, Recife, 2021.

EMADI, A.; LAW, J. Y. **Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)**. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/hematologia-e-oncologia/leucemia/leucemia-linfobl%C3%A1stica-aguda-lla>. Acesso em: 10 nov. 2022.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. Diagnóstico Laboratorial das Leucemias Linfóides Agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.l.], v. 40, n. 2, p. 91-98, abr. 2004.

FILHO *et al.*, Agentes antineoplásicos. *In*: SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 1060-1075.

GARICOCHEA, B.; ZAGO, M. A. Bases Moleculares e Citogenéticas. Oncogenes e Antioncogenes. *In*: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 367-382.

HAMERSCHLAK, N. Leucemias e Linfomas. *In*: CARVALHO, V. A. *et al.* **Temas em Psico-oncologia**. São Paulo: Summus, 2008. p. 92-99.

HAMERSCHLAK, N. **Manual de Hematologia**: Programa Integrado de Hematologia e Transplante de Medula Óssea. 1. ed. São Paulo: Manole, 2010.

HARRISON, C. J.; JOHANSSON, B. Acute Lymphoblastic Leukemia. *In*: HEIM, S.; MITELMAN, F. **Cancer Cytogenetics**: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells. 4. ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2015.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

INCA. **Incidência de Câncer no Brasil**: Estimativa-2020. Rio de Janeiro, 2019.

INCA. **Leucemia**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/leucemia>. Acesso em: 15 set. 2022.

KADIA, T. M. *et al.* Phase II study of methotrexate, vincristine, pegylated-asparaginase, and dexamethasone (MOpAD) in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. **American Journal of Hematology**, Texas, v. 90, p. 1-22, fev. 2015.

KLOOS, R. Q. H. *et al.* The effect of asparaginase therapy on methotrexate toxicity and efficacy in children with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, The Netherlands, v. 60, n. 12, p. 1-9, abr. 2019.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins e Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: GEN, 2016.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: GEN, 2018.

LAPLANT, K.; LOUZON, P. Anticâncer. *In*: WHALEN, K.; FINKEL R.; PANAVELIL, T. A. **Farmacologia Ilustrada**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. p. 587-618.

LARSON, R. A. Acute Lymphoblastic Leukemia. *In*: KAUSHANSKY, K. *et al.* **Williams Hematology**. 9. ed. USA: McGraw-Hill Education, 2016. p. 1505-1526.

LELES, R. N. **Monitorização terapêutica do metotrexato sob altas doses, em pacientes portadores de leucemia linfoblástica aguda**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiás.

LONGO, D. L. Neoplasias das Células Linfoides. *In*: LONGO, D. L. **Hematologia e oncologia de Harrison**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. p. 144-161.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia: Propedêutica e clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

MANCINI, N. **Asparaginase é fundamental no tratamento de leucemia infantil**.

Disponível em:

<https://revista.abrale.org.br/asparaginase-no-tratamento-de-leucemia-infantil/>.

Acesso em: 01 nov. 2022.

MARTINS, S. L. R.; REGO, E. M.; FALCÃO, R. P. Classificação das Leucemias Agudas: Citologia, Citoquímica e Imunofenotipagem. *In*: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 433-446.

METOTREXATO: solução injetável. Responsável técnico Eliza Yukie Saito. Cotia: Blau Farmacêutica S.A., 2022. 1 bula de remédio.

METREXATO/METOTREXATO: comprimidos. Responsável técnico Eliza Yukie Saito. Cotia: Blau Farmacêutica S.A., 2017. 1 bula de remédio.

NAOUM, F. A.; NAOUM, P. C. **Hematologia Laboratorial: Leucócitos**. São Paulo: Academia de Ciências e Tecnologia, 2006.

NARTA, U. K.; KANWAR S. S.; AZMI W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, India, v. 61, p. 208-221, jul. 2006.

NUCCI, Gilberto D. **Tratado de Farmacologia Clínica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

OLIVEIRA, R. A.; PEREIRA J.; BEITLER, B. **Mielograma e Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo em Hematologia - Prática e Interpretação**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

PAPAGEORGIO, C.; MCLEOD, H. L. Quimioterapia: princípios e farmacologia. *In*: GOVINDAN, R. ARQUETTE, M. A. **Washington Manual de Oncologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Não paginado.

PEZZINI, T. J.; CASTRO, F. S. Alterações Hematológicas na Leucemia Linfóide Aguda (LLA). **Estudos**, Goiânia, v. 41, n. 4, p. 767-776, set. 2014.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, Tennessee, v. 354, n. 2, p. 166-178, jan. 2006.

RIBEIRO, R. Leucemia Linfóide Aguda na Infância e Adolescência. *In*: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 487-516.

SAUSVILLE, E. A.; LONGO, D. L. Princípios do tratamento do câncer. *In*: LONGO, D. L. **Hematologia e oncologia de Harrison**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. p. 282-304.

SEKINE, L. Leucemias. *In*: XAVIER, R. M.; DORA, J. M.; BARROS E. **Laboratório na Prática Clínica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. p. 439-451.

SILVA, G. A. V. **Interações medicamentosas potenciais no setor de oncopediatria em um hospital universitário**. 45 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité - PB.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y.; ALVES, H. B. **Hematologia Laboratorial**. Rio de Janeiro: Revinter, 2009.

SILVA, P. H. *et al.* **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2016.

SILVEIRA, N. A.; ARRAES, S. M. A. A. A Imunofenotipagem no Diagnóstico Diferencial das Leucemias Agudas: Uma Revisão. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar**, Maringá, v. 12, n. 1, p. 5-14, 2008.

SIMÕES, B. P. Leucemia linfóide aguda do adulto. *In*: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 373-389.

SPECTRILA/ASPARAGINASE: pó liofilizado para solução injetável. Responsável técnico Juliana Vescovi de Freitas Aguiar. Alemanha: Lyocontract GmbH, 2022. 1 bula de remédio.

STASI, R. *et al.* Contribution of immunophenotypic and genotypic analyses to the diagnosis of acute leukemia. **Annals of Hematology**, UK, v. 71, p. 13-27, 1995.

UCSF HEALTH. **Acute lymphoblastic leukemia treatments**. Disponível em: <https://www.ucsfhealth.org/conditions/acute-lymphoblastic-leukemia/treatment#>. Acesso em: 1 set. 2022.

VADLAMUDI, S. *et al.* Schedule-dependent Therapeutic Synergism for L-Asparaginase and Methotrexate in Leukemic (L5178Y) Mice. **Cancer Research**, Maryland, v. 33, p. 2014-2019, set. 1973.

VILLELA, L. P.; WISINTEINER, S. C. Protocolos de Leucemias Agudas do Adulto. **Revista Técnico-Científica do Grupo Hospitalar Conceição**, Porto Alegre, v. 14, n. 1/2, p. 19-22, dez. 2001.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 351-360, ago. 2002.

WELLSTEIN, A. *et al.* Agentes citotóxicos. *In*: BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, P. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2019. p. 1433-1478.

WHO. **Cancer Today**: Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 05 dez. 2022.

YI, M. *et al.* Global burden and trend of acute lymphoblastic leukemia from 1990 to 2017. **Ageing**, [S.l.], v. 12, n. 22, p. 22869-22891, nov. 2020.