

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIENCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA  
CRIANÇA E DO ADOLESCENTE  
NÍVEL DOUTORADO**

**JOACILDA DA CONCEIÇÃO NUNES**

**ALERGIA PRÉVIA E RISCO DE LEUCEMIA LINFOIDE  
AGUDA NA INFÂNCIA E ADOLÊSCENCIA**

**RECIFE  
2012**

JOACILDA DA CONCEIÇÃO NUNES

ALERGIA PRÉVIA E RISCO DE LEUCEMIA LINFOIDE  
AGUDA NA INFÂNCIA E ADOLÊSCENCIA

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

**Área de Concentração:** Abordagens Quantitativas em Saúde

**Linha de Pesquisa:** Clínica e Epidemiologia das Afecções Imuno-alérgicas e Infecciosas

**Orientador:** Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

RECIFE  
2012

Catalogação na Publicação (CIP)  
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

N972a Nunes, Joacilda da Conceição.

Alergia prévia e risco de leucemia linfóide aguda na infância e adolescência / Joacilda da Conceição Nunes. – Recife: O autor, 2012.  
166 folhas : il. ; 30 cm.

Orientador: Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,  
2012.

Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Leucemia Linfóide aguda. 2. Alergia. 3. Risco. 4. IgE. 5. Vírus de Epstein Barr. 6. Parvovírus B19. I. Sarinho, Emanuel Sávio Cavalcanti (Orientador). II. Título.

618.92

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2012-196)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Sílvio Romero Barros Marques

**PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos.

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DIRETOR**

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADOR DA COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO CCS**

Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA E EPIDEMIOLOGIA DAS AFECÇÕES  
IMUNO-ALÉRGICAS E INFECIOSAS**

**COLEGIADO**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Marília de Carvalho Lima** (Coordenadora)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Maria Eugênia Farias Almeida Motta** (Vice-Coordenadora)

Prof<sup>o</sup> Dr Alcides da Silva Diniz

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Bernarda Ludermir

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Vasconcelos Martins de Souza Lima

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Bianca Arruda Manchester de Queiroga

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Marina T. Araújo

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cleide Maria Pontes

Prof<sup>o</sup> Dr Emanuel Savio Cavalcanti Sarinho

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisélia Alves P. da silva

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciane Soares de Lima

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Gorete Lucena de Vasconcelos

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mônica Maria Osório de Cerqueira

Prof<sup>o</sup> Dr Pedro Israel Cabral de Lira

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosemary de Jesus Machado Amorim

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sílvia Regina Jamelli

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sílvia Wanick Sarinho

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Bechara Coutinho

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sophie Helena Eickmann

Jackeline Maria Tavares Diniz (Representante discente - Doutorado)

Fabiana Cristina Lima da Silva Pastich Gonçalves (Representante discente -Mestrado)

**SECRETARIA**

Paulo Sergio Oliveira do Nascimento

Juliene Gomes Brasileiro

Janaína Lima da Paz



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIENCIAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

RECIFE, 30/05/2012

**MENÇÃO DA DOUTORANDA:**

JOACILDA DA CONCEIÇÃO NUNES

**MENÇÃO: APROVADA**

**DR. EMANUEL SÁVIO CAVALCANTI SARINHO**

(DO DEPTO. MATERNO – INFANTIL – UFPE)

**DR. ALCIDES DA SILVA DINIZ**

(DO DEPTO. NUTRIÇÃO – UFPE)

**DRª. SILVIA WANICK SARINHO**

(DO DEPTO. MATERNO - INFANTIL – UFPE)

**DRª. LEINA YUKARI ETTO**

(DO DEPTO. MEDICINA INTERNA – UFPB)

**DRª. ANA CAROLINA CAVALCANTI DELA BIANCA**

(DO DEPTO. MATERNO - INFANTIL – UFPE)

*Ao meu companheiro **José Gomes da Silva Neto**, pelo apoio no vestibular de medicina, pelo incentivo durante o curso, pelo acompanhamento durante a residência, pelo cuidado durante o mestrado, pelas orientações nos concursos, pelo zelo nas gestações, nos puerpérios, pela valorização no dia a dia, por ter participado na construção de uma grande parte da minha história;*

*A **Beatriz Nunes Gomes** e **Lara Nunes Gomes**, minhas filhas, meus amores incondicionais, a razão da minha existência;*

*Ao meu pai **João Nunes Filho** e a minha mãe **Gessi da Conceição Nunes**, aos meus irmãos **Adriano Nunes**, **José Albino Nunes**, **João Nunes Neto**, **Arlindo Marques Nunes Sobrinho**, e irmãs **Elvira da Conceição Guilherme da Silva**, **Josefa Maria Aparecida Nunes** (in memorian), **Maria Graças Nunes**, que complementam a minha existência,*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **João Nunes Filho e Gessi da Conceição Nunes**, pelo cuidado, zelo para com a minha vida e principalmente por terem me oferecido os passos para essa caminhada, não só me ensinaram os primeiros passos, mas me acompanharam e me incentivaram sempre.

Aos meus irmãos, em especial ao primogênito Adriano, que desbravou um caminho e nos ajudou em todos os aspectos, materiais, intelectuais, espirituais e acima de tudo com o seu exemplo de bondade, de cristianismo, de paciência, de amor a todos nós em todas as situações de nossas vidas.

Aos meus sobrinhos Raoni, Raíssa, Rafael, Danilo, Débora, Andressa, Mateus, Miguel, Felipe, Ana Luisa e especialmente ao futuro engenheiro de computação e meu afilhado Alexandre Magno Nunes da Silva, pela ajuda nos programas estatísticos, sua tranquilidade geneticamente herdada e pró-atividade.

Ao meu companheiro José Neto, que nunca deixou de acreditar nos meus e me ofereceu todas as condições para realizar esse projeto de vida.

As minhas filhas Beatriz e Lara, com o amor, a inteligência, o dinamismo dessas meninas, ficou mais fácil superar as dificuldades e sempre dando apoio e incentivo nas viagens e nas etapas a serem vencidas. Filhas minha, muito obrigada!

Ao meu orientador o professor Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho por ter aceitado o desafio e pela autonomia que me possibilitou na realização desse trabalho.

Aos colegas da 3<sup>a</sup> turma de doutorado do Programa de Saúde da Criança e do Adolescente Rebeca, Adriana, Gisele e em especial aos companheiros Augusto César Barreto Neto e Luciano Meireles de Pontes, pelas incansáveis ajudas logísticas, pelo companheirismo, e por terem facilitado a minha estada nessa pós-graduação.

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, pelos ensinamentos, pelo exemplo e empenho em nossos trabalhos e aprendizado.

As professoras Gisélia Alves Pontes da Silva e Marília de Carvalho Lima, dois pilares mestres nesse Curso de Pós-Graduação e em quem nos apoiamos muito, pelo potencial e solicitude.

Ao estudante de Medicina da UFPE e bolsista do PIBIC/CNPq Luis Felipe, pela preciosa ajuda na coleta de dados.

A equipe de médicas onco-hematologistas do Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade Estadual de Pernambuco, em especial a Dra. Edinalva Pereira Leite, Dra. Vera Lucia Lins de Moraes e Dra. Mariluze Oliveira da Silva, pelo apoio incondicional para obtenção da coleta de dados.

Aos funcionários do Laboratório Hemato pela coleta do material biológico, bem como o processamento das amostras e ensaios laboratoriais, em especial a Rosilda, Dynha e Iriana, sem a ajuda delas não teria sido viável o processo laboratorial.

Ao meu amigo Geraldo Luís dos Santos, por ter me apresentado ao programa de pós-graduação, pelo companheirismo, pela irmandade, pela lealdade e sobretudo pelo espírito fraternal da sua personalidade.

Ao professor Henrique Gil da Silva Nunesmaia, meu chefe de departamento na UFPB, sem a sua compreensão e apoio teria sido muito difícil realizar esse trabalho em estágio probatório, meus agradecimentos e reconhecimento pela paternidade científica

ainda na graduação e todo apoio e incentivo nesse importante trabalho da minha vida acadêmica.

Aos meus colegas e amigos professores da UFPB que tenho muita estima e me ensinaram a ter paciência e acreditar no final da história, poderia citar Jacicarlos, Luis Fábio, Biu, Jória, Luciano Gomes, Felipe Proenço, Alexandre Castanheiro, Alexandre Magno, Juliana Wanderley, Lebiam Tamar, Socorro Borges, Aldenildo, Constantino, Adriana Queiroga, Henrique Gil.

Aos meus pacientes, aos quais eu dedico uma parte importante do meu tempo e recebo a retroalimentação do meu cuidado para com eles de várias maneiras, em especial a Gabriel Cruz, que mexeu com meu imaginário por ter feito seu diagnóstico de leucemia no dia das mães e termos vencido essa batalha.

Aos amigos, cunhados, irmãos e companheiros Chico e Grace, que tiveram presentes apostando nesse projeto de vida, dando suporte junto com as crianças sempre que precisamos e acima de tudo pela existência deles em nossas vidas.

Ao professor Alcides da Silva Diniz, pelos ensinamentos altamente oportunos no módulo de Epidemiologia e pela orientação imprescindível na pré-banca tendo como resultado contribuição incalculável para conclusão desse trabalho.

Ao professor Jozemar Pereira dos Santos pelo apoio fantástico no tratamento estatístico e a Renata Monteiro, pelo apoio na tradução para o inglês, bem como na correção e formatação do trabalho.

A todos os meus sinceros agradecimentos de fazerem parte da minha vida!

*“... se avexe não, toda caminhada começa no primeiro passo. A natureza  
não tem pressa segue o seu compasso e inexoravelmente chega lá...”*

*Accyoli Neto, poeta e compositor pernambucano*

## RESUMO

Leucemia linfoide aguda (LLA) é o câncer pediátrico mais comum e etiologicamente não apresenta um modelo definido, uma vez que apresenta uma história natural biologicamente diversificada. Fatores têm sido relacionados ao sistema imunológico como risco/proteção ao desenvolvimento de LLA, considerando-se como plausíveis o papel do sistema imune frente às infecções na infância, e a inter-relação dessas infecções com mecanismos envolvendo as Hipóteses da Higiene e da Adrenal. A proposta desse estudo foi investigar uma possível associação entre alergia prévia, bem como a ativação do eixo adrenal, pautado na Hipótese da Adrenal, com o desenvolvimento de leucemia linfoide aguda na infância e adolescência. Trata-se de um estudo do tipo caso-controle não pareado de base hospitalar, cuja amostra foi constituída de 60 crianças e adolescentes com diagnóstico incidente de leucemia linfoide aguda *não T*, classificadas pela avaliação da medula óssea através do mielograma e imunofenotipagem e 120 controles selecionados com proporcionalidade com relação à idade e sexo a partir dos casos e oriunda dos estados de Pernambuco e Paraíba no nordeste brasileiro, entre 2008 e 2011. A coleta dos dados consistiu na aplicação de questionário estruturado para identificação de alergias como asma, rinite alérgica, antecedente de urticária e dermatite atópica, uso prévio de glicocorticoides, além de exame clínico e coleta de sangue para dosagem de IgE total, cortisol basal, ACTH, marcador de infecção prévia pelo EBV e parvovírus B19 através da dosagem de IgG. Outras variáveis como aleitamento materno, peso ao nascer, escolaridade materna, infecção materna na gestação e número de pessoas no domicílio também foram analisadas. Para a análise estatística foram utilizados Teste de associação de  $\chi^2$ , Teste Exato de Fisher, Odds Ratio, Regressão Logística Binária e Regressão Logística Múltipla. Os resultados encontrados na análise univariada ( $p < 0,20$ ) foram: Asma (p-valor = 0,116), Rinite Alérgica (p-valor=0,032), Antecedente de Urticária (p-valor = 0,011), Dermatite Atópica (p-valor = 0,086), Nível Sérico Elevado de IgE Total (p-valor = 0,00), Nível Elevado de Cortisol Basal (p-valor = 0,004), Infecção Prévia pelo EBV (p-valor = 0,143), Infecção Prévia por Parvovírus B19 (p-valor = 0,068). Após o modelo ajustado através da análise de regressão logística múltipla persiste a significância de uma relação inversa entre Asma com p-valor = 0,044 e OR/IC 95% 0,14 (0,02 – 0,95), Nível Sérico Elevado de IgE Total com p-valor = 0,001 e OR/IC 95% 0,10 (0,02 – 0,41), além de Níveis Elevados de Cortisol apresentando p-valor 0,004 e OR/IC 95% 0,16 (0,04 – 0,56); Para infecção Prévia pelo Parvovírus B 19 o resultado expressa risco p-valor = 0,037 e OR/IC 95% 2,19 (1,05 – 4,57). Asma e Níveis Séricos Elevados de IgE Total e ainda Níveis Elevados de Cortisol Basal, parecem estar relacionados com modificações na resposta imune e como consequência promoveriam uma diminuição de clones leucêmicos, desempenhando um papel de proteção a crianças e adolescentes contra LLA. A infecção prévia pelo parvovírus B 19 está associada com aumento de risco de LLA.

**Palavras Chaves:** Leucemia linfoide aguda. Alergia. Risco. IgE. Vírus de Epstein Barr. Parvovírus B 19.

## ABSTRACT

Acute Lymphoid Leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer and etiologically it does not have a defined model since it has a biologically diverse natural history. Factors have been related to the immune system as a risk / protection to the development of ALL, considering as plausible the immune system role before childhood infections and the interrelationship of these infections with mechanisms involving the Hygiene Hypothesis and the Adrenal Hypothesis. The purpose of this study was to investigate a possible association between previous allergy, as well as the activation of adrenal axis, based on the Adrenal Hypothesis, with the development of acute lymphoid leukemia during childhood and adolescence. It is an unpaired hospital-based case-control study which sample was composed of 60 children and adolescents incidentally diagnosed with acute lymphoid leukemia *non T*, classified by the association of bone marrow through myelogram and immunophenotyping, and 120 healthy controls, selected in proportion to the cases' age and sex, from Pernambuco and Paraíba, Brazilian northeastern states, between 2008 and 2011. Data collection consisted of the application of a structured questionnaire in order to identify allergies such as asthma, allergic rhinitis, history of urticaria and atopic dermatitis, previous glucocorticoids use, in addition to clinical examination and blood tests to measure total IgE, basal cortisol, ACTH, previous infection marker by EBV and B19 parvovirus through IgG measurement. Other variables such as breastfeeding, birthweight, mother's education level, mother's infections during pregnancy, number of household members were also analyzed. For the statistical analysis, we used Chi-square test ( $\chi^2$  test), Fisher's exact test, Odds Ratio, Binary Logistic Regression and Multiple Logistic Regression. The results found in the univariate analysis ( $p$ -value < 0.20) were Asthma (sig  $p$ -value = 0.116), Allergic Rhinitis (sig  $p$ -value = 0.032), History of Urticaria ( $p$ -value = 0.011), Atopic Dermatitis (sig  $p$ -value = 0.086), High Total IgE Plasmatic Level (sig  $p$ -value = 0.00), High Cortisol Level (sig  $p$ -value = 0.004), EBV Previous Infection (sig  $p$ -value  $p$  = 0.143), B19 Parvovirus Previous Infection (sig  $p$ -value = 0.068). After the model being adjusted through the multiple logistic regression analysis, the significance of an inverse relation towards Asthma still remains, with sig  $p$ -value = 0.044 and OR/CI 95% = 0.14 (0.02 – 0.95), High Total IgE Plasmatic Level with sig  $p$ -value = 0.001 and OR/CI 95% = 0.10 (0.02 – 0.41), besides Cortisol High Levels with sig  $p$ -value 0.004 and OR/CI 95% 0.16 (0.04 – 0.56); to previous infection from B19 Parvovirus the result expresses  $p$ -value risk  $p$  = 0.037 and OR/CI 95% 2,19 (1,05 – 4,57). Asthma and High Total IgE Plasmatic Level, as well as Cortisol High Levels, seem to be related with changes in the immune response and, as a consequence, it would promote leukemia clones' reduction, playing a protection role to ALL children and adolescents. Previous infection from B19 parvovirus is associated with increase of ALL risk.

**Key words:** Acute Lymphoid Leukemia. Allergy. IgE. Childhood leukemia. Epstein-Barr virus. B19 parvovirus. Risk.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SIGLA/ABREVIATURA	SIGNIFICADO
<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrófico
<b>EBV</b>	Vírus de Epstein-Barr
<b>IgE</b>	Imunoglobulina da classe e
<b>LLA</b>	Leucemia linfoide aguda
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>LMA</b>	Leucemia mielóide aguda
<b>Linfócitos NK</b>	Linfócitos natural killer
<b>CEM</b>	Campo eletromagnético
<b>ETV6/RUNX1</b>	Gene de fusão etv6 (ets variant gene 6) com runx1( runt-Related transcription factor 1)
<b>Gene MML</b>	Mouse mix-like gene
<b>Amplificação ALM1</b>	Amplification of the abnormal long morphology protein1
<b>Dic (9;20)</b>	Cromossomos 9 e 20 com dois centrômeros
<b>t (9;22)</b>	Translocação dos cromossomos 9 e 22
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>IC</b>	Intervalo de confiança

<b>UKCCS</b>	United Kingdom childhood cancer study
<b>BCG</b>	Bacillus Calmette-Guérin
<b>Hib</b>	Haemophilus influenzae type B
<b>USA</b>	United States of America
<b>UK</b>	United Kingdom
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen
<b>Th2</b>	Linfócito T helper 1
<b>Th1</b>	Linfócito T helper 2
<b>IL</b>	Interleucina
<b>GINA</b>	Global initiative for asthma
<b>CEON</b>	Centro de Oncologia do Hospital Oswaldo Cruz
<b>UPE</b>	Universidade Estadual de Pernambuco
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>PCR</b>	Proteína C Reativa
<b>ASLO</b>	Anti streptolysin O
<b>PNI</b>	Programa Nacional de Imunização
<b>SCORAD</b>	Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis
<b>GALEN</b>	Global Allergy and Asthma European Network

<b>ARIA</b>	Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma
<b>ELISA</b>	Enzima imuno ensaio
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>ANVISA</b>	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
<b>EPI</b>	Equipamento de Proteção Individual
<b>PIBIC</b>	Programa de Bolsas de Iniciação Científica
<b>SPSS</b>	Statistical Package for Social Sciences
<b>ISAAC</b>	International <i>Study of</i> Asthma and Allergies in Childhood

## **SUMÁRIO**

1.	APRESENTAÇÃO .....	15
2.	REVISÃO DALITERATURA .....	18
2.1	Fatores causais da leucemia linfóide aguda.....	19
2.2	O sistema imunológico e as alergias.....	25
2.3	A atopia e relação com leucemia linfóide aguda na infância.....	31
2.4	As hipóteses que associam causalidade com LLA .....	35
3.	MATERIAL E MÉTODO .....	40
3.1	Delineamento do Estudo .....	40
3.2	População e amostra .....	40
3.3	Descrição das variáveis do estudo.....	45
3.4	Considerações Éticas .....	49
3.5	Operacionalização .....	49
3.6	Processamento e análise dos dados.....	53
4.	RESULTADOS .....	56
4.1	Artigo 1: ALERGIA PRÉVIA E LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA .....	56
4.2	Artigo 2: RISCO DE LLA ANALISANDO A PARTIR DA HIPÓTESE ADRENAL: CASO-CONTROLE .....	101
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES.....	119
	REFERÊNCIAS .....	121
	APÊNDICES.....	130
	ANEXOS .....	142

## 1. APRESENTAÇÃO

A leucemia linfoide aguda (LLA) é o principal tipo de câncer pediátrico e no seu desenvolvimento está elencada uma série de eventos complexos incluindo determinantes genéticos e diversos fatores ambientais não totalmente esclarecidos. Muitos estudos têm sido feitos com diversas abordagens de exposição ambiental e fatores genéticos, na tentativa de se estabelecer uma via possível para explicar o desenvolvimento da leucemia linfoide aguda na infância. Já é conhecido que crianças com Síndrome de Down e outras doenças genéticas apresentam risco elevado para desenvolvimento de leucemias na infância, porém essas condições representam poucos casos. A grande maioria dos casos são crianças e adolescentes previamente hígidos e sem nenhum fator de risco aparentemente associado (LEE, 1998; GREAVES, 1999).

Por se tratar de uma neoplasia maligna, a LLA quando ocorre na faixa infanto-juvenil não obedece ao modelo clássico de risco para outras neoplasias como acontece nos adultos, uma vez que nestes pacientes, eventos genéticos em células somáticas e sucessivos ao longo de muitos anos são necessários para desencadear o crescimento neoplásico de células, ao passo que nas crianças e adolescentes esses eventos não dependeriam dessa sucessão longitudinal bem definida para ocorrerem. Nesse sentido muitos marcadores genéticos relacionados a modificações na vida intra-uterina foram estudados na tentativa de explicar o modelo de desenvolvimento de LLA na faixa etária pediátrica, porém não foi possível estabelecer causalidade direta para explicar porque crianças com mudanças genéticas congênitas fortemente relacionadas com o surgimento de neoplasias nunca desenvolveram neoplasias e crianças sem alterações nesses genes alvos apresentavam a doença (GREAVES, 2006). Diante desse cenário, a comunidade científica comprehende que fatores ocorridos na vida intra-uterina participariam desse processo, mas seria necessário um segundo gatilho ambiental para desencadear o crescimento neoplásico de linfócitos nesse grupo etário. Por essa razão, muitos fatores ambientais têm sido associados ao risco de LLA em pediatria, porém alguns destes podem ser apenas fortuitos devido às variáveis modificadoras de efeito e vieses.

A interação entre as respostas imunológicas e o desenvolvimento de leucemia linfoide na infância tem sido estudada desde a década de 1980 (GREAVES; KINLEN,

1988; MAGALHÃES, 2000). Nessa busca pela etiologia/fatores de risco, as hipóteses que foram levantadas como sendo possíveis de explicar a associação de leucemias na infância estão todas relacionadas com fatores ambientais em interface com a resposta imune.

Nos últimos anos tem sido crescente o aumento das alergias e a hipótese da higiene proposta por Scrachan em 1989, estabelece conexão entre o aumento da sensibilização alérgica *versus* modo de vida. A hipótese tem seus pilares de sustentação no fato de que o aumento da higiene e asseio, além do uso difundido de antibióticos, de água potável purificada e as imunizações por vacinas, podem ter privado o sistema imune em desenvolvimento, de estímulos ambientais moldados pela evolução do indivíduo, para manter a imunidade adaptativa longe das respostas linfocitárias do tipo Th2, e isso impediria o equilíbrio imunológico, explicando o aumento da prevalência de doenças alérgicas.

Da mesma forma, recentemente Schmiegelow et al., (2008) sugeriram a hipótese da adrenal para LLA, que resumidamente diz que a resposta imunológica frente às infecções pode estar associada ao menor risco de LLA. A idéia central é de que a exposição aos agentes infecciosos levaria ao desencadeamento de uma resposta imune que por sua vez resulta em elevação dos níveis de cortisol/ACTH e como consequência reduziria os clones malignos leucêmicos e agiria como fator de proteção contra LLA.

A questão norteadora desta pesquisa está fundamentada nestas intersecções entre estas duas hipóteses em que o desenvolvimento de leucemias na infância poderia ter alguma relação com o sistema imunológico em condição de exacerbação alérgica.

A quase totalidade dos estudos de associações de leucemia linfóide aguda com fatores ambientais entre crianças foi desenvolvida em países nórdicos com realidade biológica, ambiental, cultural e sócio-econômicas diferentes da população dos países do sul. Nesta perspectiva, considerando-se que a prevalência de leucemias tem diferenças significativas entre países centrais e países periféricos e que os aspectos imunológicos influenciam na expressão da doença as seguintes indagações podem ser norteadas. Qual a importância de antecedentes de alergia para o desenvolvimento de leucemia linfóide aguda? Qual o comportamento dos marcadores de infecção prévia pelo parvovírus B19

e pelo vírus de Epstein Barr nos pacientes leucêmicos em país pobre? A ativação do eixo adrenal pode ter alguma relação de risco para leucemia linfóide aguda?

Esta Tese encontra-se apresentada em três capítulos. O primeiro capítulo é a revisão narrativa da literatura, em que se contextualiza o tema da Leucemia Linfóide Aguda, enfatizando os fatores associados conhecidos mais associados com a doença e teorias propostas para fundamentar o desencadeamento da doença em crianças e adolescentes.

Em um segundo capítulo foi abordado a questão metodológica com descrição detalhada sobre o método empregado, desenho da pesquisa, com a finalidade de possibilitar a reproduzibilidade do estudo dentro de outros contextos geográficos, epidemiológicos e diferentes realidades sociais e culturais.

Em um terceiro capítulo esta Tese apresenta os resultados da pesquisa, sob a forma de dois artigos originais. O primeiro artigo é intitulado: **ALERGIA PRÉVIA E LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA**. Este trabalho teve como objetivo principal estabelecer relação entre doenças alérgicas e níveis séricos de IgE total com LLA e foi submetido para o Journal of Allergy and Clinical Immunology (JACI). O segundo artigo foi intitulado: **RISCO DE LLA ANALISANDO A PARTIR DA HIPÓTESE ADRENAL: CASO-CONTROLE** e foi submetido ao Journal of Pediatrics. Neste manuscrito o objetivo foi avaliar níveis de cortisol e ACTH, além de uso prévio de corticosteroides para averiguar relação de risco com o desenvolvimento de leucemia linfoide aguda entre crianças e adolescentes.

Por fim, são apresentadas as considerações finais, cujas reflexões elaboradas à partir de um olhar crítico dos resultados encontrados, vislumbram subsidiar outros estudos sobre o tema.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fatores causais da leucemia linfoide aguda

A leucemia linfoide aguda é uma doença biologicamente diversificada e muitos fatores têm sido apontados como possíveis vias de causa dessa entidade.

É correto afirmar que na origem de qualquer proliferação celular maligna, podem-se encontrar anormalidades em genes que regulam etapas do ciclo celular. A perda da regulação de qualquer etapa do ciclo celular pode resultar do acúmulo de células com defeitos genéticos, tornando a célula instável e vulnerável a acumular novos eventos genéticos que resultariam no desenvolvimento do clone maligno. Este grupo de genes, considerados como reguladores do ciclo celular e da diferenciação celular, estão classificados em quatro classes: Oncogenes, Genes Supressores de Tumor, Genes Relacionados a Apoptose e Genes de Reparo do DNA (LINDBLOM & LILJEGREN, 2000). Os oncogenes são genes que fazem parte normalmente de um grupo de genes altamente conservados pela evolução, e cujo papel normal é codificarem diversas proteínas que apresentam atividades biológicas como fatores de crescimento; receptores para fatores de crescimento, proteínas sinalizadoras, fatores transpcionais nucleares e ciclinas e cinases ciclina dependentes, quando estes oncogenes sofrem mutações, agem contribuindo para a proliferação celular anormal, resultando no crescimento desordenado e imortal das células (HAGAN et al., 1999). Os genes supressores de tumor, diferentemente dos oncogenes, agem bloqueando a divisão celular para que os genes de reparo do DNA e os genes da apoptose (morte celular programada) possam agir durante a divisão celular e mutações nestes genes supressores faz com que a célula cicle, ou seja se divida, sem que os reparos no material genético seja efetuado e contribuindo assim, para o desenvolvimento de neoplasias. Os genes que regulam a apoptose agem eliminando as células lesadas, que são identificadas por mecanismos imunológicos ou lesões ao genoma da célula. Uma vez identificada a lesão ocorre sinalização por parte do sistema imunológico para ativação de genes que regulam a apoptose, de maneira que a célula lesada seja impedida de repassar o seu genoma danificado; Os genes de reparo do DNA fazem parte de um sistema que vigiam a integridade do nosso DNA e estão pouco relacionados quando mutados com o

desenvolvimento de neoplasias hematológicas, diferentemente dos oncogenes, dos genes supressores de tumor e dos genes da apoptose, que quando mutados são responsáveis por uma série de neoplasias hematológicas, sobretudo as leucemias agudas (HAGAN et al., 1999; LINDBLOM & LILJEGREN, 2000). Os mecanismos de lesão desses genes reguladores são variáveis muitos deles são em consequência de alterações cromossômicas como translocações, deleções, mutações pontuais, aneuploidias, amplificação e poliploidia, sendo a aneuploidia (aberração no número de cromossomos) um evento comum nas leucemias e para a leucemia linfóide aguda um evento comum são as translocações. As neoplasias linfoides agudas resultam da proliferação de células precursoras B, T ou NK (BAIN, 1997; HAGAN et al, 1999; LINDBLOM & LILJEGREN, 2000). Em última análise, alterações no DNA celular resultam numa proliferação e crescimento anormal dos clones de linfócitos, porém o fator ou conjunto de fatores envolvidos ainda é motivo de muita discussão.

Predisposição genética e susceptibilidade a desenvolver leucemias já foram descritos na literatura, sobretudo em síndrome de Down, neurofibromatose tipo I, certas malformações com anomalias cromossômicas associadas, ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi e imunodeficiência hereditária. Diversas outras doenças genéticas, sobretudo as que apresentam defeitos em genes de reparo no DNA ou as síndromes de instabilidade cromossônica, apresentam também um alto potencial leucemogênico. No entanto, estas desordens representam menos de 5% de todas as causas conhecidas de leucemias em crianças (BAIN, 1997).

Estudos epidemiológicos de leucemias agudas em crianças têm investigado possíveis fatores de risco (por exemplo, ambientais, genéticos ou infecciosos), num esforço para determinar a etiologia da doença. Apenas um fator ambiental de risco, as radiações ionizantes, tem sido significativamente ligada tanto com LLA ou LMA; outros fatores de risco ambientais, por exemplo campos eletromagnéticos (CEM), tabagismo, foram fracamente ou inconsistentemente associados com qualquer forma de leucemia infantil. Como a leucemia infantil é uma doença de ocorrência rara, estudos prospectivos são difíceis de realizar e, portanto, estuda-se mais freqüentemente esse agravo na infância com modelos de estudos retrospectivos, sobretudo caso-controle. Embora mais fácil de conduzir, estes estudos têm várias limitações inerentes (SCHULZ & GRIMES, 2002).

Na visão de Infante-Rivard e Jacques (2000), vieses podem ser introduzidos em um estudo retrospectivo porque a exposição é medida indiretamente, é auto-referida, e podem ser diferencialmente recordado por pais de um controle, em comparação com os pais de um doente. Além disso outros vieses podem também ser introduzidos se um determinado segmento da população não responder ao estudo. Apesar dessas limitações, os resultados de estudos epidemiológicos desse tipo de pesquisa identificam fatores de risco ambientais para leucemia infantil e podem oferecer suporte com medidas para aliviar exposições potencialmente nocivas e o risco para a doença (SCHULZ & GRIMES, 2002).

Muitos fatores ambientais têm sido associados com aumento do risco de LLA em criança, porém alguns deles podem ser apenas associação aparente devido as variáveis modificadoras de efeito e vieses. Sendo muito bem estudado desde as décadas de 1980 a interação entre as respostas imunológicas e o desenvolvimento de leucemia linfóide na infância (CHAN et al., 2002). Acredita-se que a história natural da LLA aponta para um evento inicial ocorrido na vida intrauterina e um segundo evento externo, que seria necessário para ativação dos clones malignos. Fatores como infecções materna, o sistema HLA, aleitamento materno, imunização, agentes químicos e infecções pelo EBV e pelo parvovírus B19 têm sido estudados com o intuito de encontrar associações de risco com desenvolvimento de LLA.

- **Infecções maternas e risco de LLA**

Quanto as infecções maternas e risco de desenvolvimento de LLA alguns estudos resumidos na tabela 1, mostram essa relação de risco elevada para as crianças, cujas mães apresentaram infecções. As infecções mais estudadas foram aquelas associadas ao vírus de Epstein Barr, infecções do trato genital inferior, infecções maternas recorrentes e infecções virais não especificadas na mãe durante a gestação. Para o vírus de Epstein Barr, especificamente o estudo de Lehtinen et al (2003) apontam para um risco relativo de 2.9 para LLA.

Tabela 1 - Relação de risco de infecções materna e desenvolvimento de leucemias nas crianças

Estudo	Doença	Local	Tipo de estudo	Infecção materna	OR e IC
<b>Lehtinen et al, 2003</b>	LLA	Finlândia	Caso controle	Epstein Barr	2.9(1.5-5.8)
<b>Naumberg et al, 2002</b>	Leucemia	Suécia	Caso controle	Infecção do trato genital inferior	1.78(1.17-2.7)
<b>Infante-Rivarde et al, 2000</b>	LLA	Canadá	Caso controle	Infecção materna recorrente	1.09(0.65-1.84)
<b>McKinney et al 1999</b>	leucemias	Escócia	Caso controle	Alguma infecção viral materna	1.43(0.85-2.42)
	LLA				1.44(0.81-2.55)

Modificado de McNally e Eden, 2004

LLA=leucemia linfóide aguda OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança a 95%.

### • Aleitamento materno e risco de LLA

O aleitamento materno tem sido estudado para relação de risco com desenvolvimento de LLA, porém os resultados dos estudos não são homogêneos. A tabela 2 resume alguns desses estudos, cujo risco relativo varia desde fator de proteção estatisticamente significativo até aumento de risco de desenvolvimento de LLA. Existe uma certa restrição a estes estudos em função de muitos deles não parearem os casos e controles por status sócio-econômico e fatores de confundimento terem sido introduzidos e podem induzirem a esta discrepância de resultados. Além disso, o aleitamento materno é fator de proteção para a criança contra desenvolvimento de infecções e também ocorre transferência de anticorpos maternos para a criança, interferindo em última análise na resposta individual às infecções sobretudo no primeiro ano de vida e nesse caso o aleitamento materno poderia ser uma variável modificadora de efeito (MCNALLY & EDEN, 2004). O estudo de Jourdan-Da Silva et al., (2004) realizado na França, encontrou que crianças que nunca receberam leite

materno apresetaram um risco relativo discretamente elevado para desenvolvimento de LLA e LMA, discordante com o estudo de Murray (2002), que encontrou crianças que nunca receberam aleitamento materno e apresentaram relação de risco inversa para desenvolvimento de leucemias, OR= 0.86 e IC 95% (0.85-0.99). O estudo do United Kingdom Childhood Cancer Study (UKCCS) realizado pelos investigadores do UKCCS em 2001, compara grupos de crianças amamentadas por mais e menos de seis meses, e crianças nunca amamentadas e não encontrou diferenças estatisticamente significantes entre as três categorias. As crianças que nunca receberam leite materno apresentaram odds ratio de 0.86 com IC 95% (0.81-0.92) e para o grupo que mamou mais de seis meses o odds ratio de leucemias foi de 0.78 com IC 95% (0.71-0.85), demonstrando que não houve diferença estatisticamente significante entre os dois grupos.

Tabela 2 – aleitamento materno e risco de leucemia na infância

<b>Estudo</b>	<b>Doença</b>	<b>Local</b>	<b>Tipo de estudo</b>	<b>Status /OR e IC</b>
<b>Jourdan-Da Silva et al, 2004</b>	LLA	França	Caso controle	Nunca amamentadas 1.1(0.9-1.5)
<b>Lancashire and Sorahan, 2003</b>	LLA	UK	Caso controle	Nunca amamentadas 1.04(0.86-1.26)
<b>Perrilat et al, 2000</b>	Leucemias Agudas	França	Caso controle	Amamentadas >6 m 0.5(0.2-1.0)
<b>Murray et al 2002</b>	LLA	Irlanda do Norte	Coorte	Nunca amamentadas 0.98(0.68-1.42)
<b>UKCCS</b>	Leucemias	UK	Caso	Nunca amamentadas
			controle	0.86(0.81-0.92) Amamentadas >6 m 0.78(0.71-0.85)
				Amamentadas <6 m 0.91(0.85-0.99)

Modificado de McNally e Eden, 2004 LLA=leucemia linfóide aguda OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança a 95%.

UKCCS= United Kingdom Childhood Cancer Study

UK= United Kingdom

- Imunizações e risco de LLA**

Por desempenhar um papel estimulador do sistema imune e este por sua vez, por sua estreita ligação com vários dos fatores apontados como risco para desenvolvimento de leucemias em crianças, a vacinação ganha destaque e tem sido estudada como fator de risco para leucemias em crianças. Alguns destes estudos relatam um efeito protetor

das vacinas, e outros mostram aumento de risco. Na tabela 3 os estudos estão listados como efeito protetor estatisticamente significante, risco aumentado estatisticamente significante e efeitos não significantes. Nestes estudos foram incluídos o bacilo de Calmette-Guérin (BCG), vacina anti *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) conjugada e não conjugada, vacina tríplice viral (anti rubéola, sarampo e caxumba), vacina anti sarampo, anti rubéola, hepatite B, e uma classificação de acima de 4 vacinas da rotina de imunização. Os resultados quanto à vacina com conteúdo viral mostram na maioria dos trabalhos, resultados conflitantes, e sobretudo contra sarampo, onde o estudo de Dockerty et al, em 1999, aponta a vacina anti sarampo como fator de risco para leucemias com OR= 1.87 e IC 95% (1.0 a 3.48) . Nesse mesmo trabalho as vacinas anti pólio, hepatite B, tríplice viral, sarampo isolada, rubéola, também foram estudadas, porém só a anti sarampo demonstrou efeito de risco para leucemias. Já o trabalho de Nishi e Miyake, 1989, realizado numa população do Japão aponta essa mesma vacina como fator de proteção para leucemia linfoide aguda não célula T, com OR=0.2 e IC=0.1-0.7. Atualmente no Brasil e em vários países existe um calendário vacinal com ampla cobertura da população infantil, tendo sido inclusive inseridas essas vacinas estudadas e não houve aumento na ocorrência de leucemias em crianças expostas a essas vacinas. Comportamentos auto-imunes de algumas doenças como a anemia hemolítica auto-imune tem sido relatadas como tendo aumento de risco, mas não de doenças com crescimento celular anormal.

Tabela 3 – Vacinação e risco de leucemias em crianças

Estudo	Doença	Local	Tipo de estudo	Vacinação	Risco estimado
<b>Efeito protetor estatisticamente significativo</b>					
Groves et al, 1999	LLA	USA	Caso controle	Hib conjugada	0.57(0.36-0.87)
Schuz et al, 1999	LA	Alemanha	Caso controle	>4 imunizações de rotina	0.3( $p<0.05$ )
Nishi e Miyake, 1989	LLA não T	Japão	Caso controle	vacina BCG e sarampo	0.1(0.0-1.0) 0.2(0.1-0.7)
McKinney et al 1987	Leucemia	UK	Caso controle	Imunizações	0.2(0.1-0.)
<b>Risco elevado estatisticamente significativo</b>					
Dockerty et al, 1999	Leucemia	Nova Zelândia	Caso controle	Sarampo	1.87(1.00-3.48)
Buckley et al, 1994	LLA comum	USA e Canadá	Caso controle	Tríplice viral MMR	1.7( $p<0.01$ )
<b>Efeito não significativo</b>					
Groves et al, 2002	Leucemia	Finlândia	Ensaio clínico	Hib	1.14(0.63-2.08)
Auvinen et al, 2000	Leucemia	França	Ensaio clínico	Hib	0.72(0.46-1.13)
Petridou et al, 1997	Leucemia	Grécia	Caso controle	Vacinas virais	1.23(0.91-1.66)

Modificado de McNally e Eden, 2004 LLA=leucemia linfóide aguda OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança a 95%.

Hib-haemophilus influenzae tipo b;LLA= leucemia linfóide aguda, LA= leucemia aguda; BCG=bacilo de Calmett Guerin; MMR=vacina contra sarampo, rubéola e caxumba.

- **O sistema HLA e LLA**

O sistema HLA tem sido apontado em vários estudos como marcador de susceptibilidade à leucemias, principalmente em meninos. Os alelos da classe II do sistema HLA são os mais apontados como marcador de susceptibilidade em crianças. Um estudo de Taylor et al, em 2002, relata que crianças que carreiam o alelo DPB1\*0201 da classe II do sistema HLA teriam aumento de susceptibilidade de desenvolver LLA do subtipo pré-B, com risco relativo de 1.76 e IC (1.2-2.56) e para o subtipo de LLA de células T o risco relativo encontrado foi de 1.93 com IC (1.03-3.80). Foi mostrado ainda um excesso de frequência dos haplótipos DQA1\*0101/\*0104 e DQB1\*0501 em meninos, mas não nas meninas. O estudo de Dorak et al. (1999), encontraram uma associação moderada dos alelos DRB1\*04 e DRB4\*01 nos meninos com LLA e aponta para o argumento que o HLA-DRB4\*01 pode ser um fator de risco genético para LLA nas crianças masculinas portadoras deste alelo.

## 2.2 O sistema imunológico e as alergias

- **O papel do sistema imune**

Uma das principais funções do sistema imunológico é reconhecer o que é *próprio* do que é *não próprio* e a partir disso proteger o indivíduo contra agentes infeciosos. Entretanto, o funcionamento inadequado deste sistema pode ser a causa de doenças, como as **alergias** e as doenças auto-imunes. O sistema imunológico de forma simplificada e clássica atua por meio de dois padrões de resposta imune adquirida: a resposta imune mediada por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (T helper 1, Th1, em inglês), e a resposta imune Th2. A resposta imune Th1 ocorre na reação às infecções virais e bacterianas e nas doenças auto-imunes. A resposta imune Th2 ocorre na reação às infecções helmínticas e nas doenças alérgicas, como a asma, a rinite e o eczema. Na resposta imune Th2, os抗ígenos de helmintos ou alérgenos estimulam os linfócitos T a produzir citocinas Th2, como as interleucinas (IL)-4 e IL-5. A IL-4 induz os linfócitos B a produzir imunoglobulina E (IgE) e a IL-5 atrai e ativa os eosinófilos. A eosinofilia e o aumento do nível sérico de IgE são, portanto, características da resposta imune Th2.

Uma parte da IgE produzida durante a resposta imune Th2 é antígeno-específica. Quando a IgE específica se liga a receptores de alta afinidade na superfície de mastócitos e basófilos, ela deixa o sistema imune pronto para reações alérgicas a qualquer exposição ao alérgeno. Segundo Kay (2001), a resposta imune Th2 é reforçada sempre que o antígeno se liga à IgE específica na superfície dos mastócitos, que degranulam, liberando mediadores da reação alérgica imediata (histamina, prostaglandinas, leucotrienos) e também citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-13, RANTES). As principais características da resposta imune mediadas por linfócitos T auxiliares 1 e 2 estão resumidas na tabela 4.

O balanço entre imunidade humoral e celular, os linfócitos Th1/Th2 e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é relativamente imaturo por ocasião do nascimento (SHERMAN, 1985; LEWIS & RAMSAY, 1995). Na medida em que a criança vai se expondo a carga infecciosa nos primeiros anos, essa exposição pode influenciar na extensão pelas quais subsequentes infecções promovem uma resposta pró-inflamatória mediada por Th1. A exposição a infecções na infância promoveria uma adaptação do sistema imune e evitaria uma hiperprodução de citocinas mediadas por Th1 tais como a IL12, fator de necrose tumoral alfa e interferon gama. O cortisol favorece a produção de citocinas anti-inflamatórias mediadas por Th2, tais como IL4 e IL10, que preveniria o stress proliferativo ativado por Th1 (BLOTTA et al., 1997). Já está demonstrado em modelos animais que estimulação intensa do sistema imune com agentes infecciosos promovem aumento mais sustentados nos níveis de cortisol e consequente redução da proliferação de linfócitos (SHANKS et al., 1990).

Tabela 4- Principais características da resposta imune mediadas por linfócitos T auxiliares 1 e 2

	<b>Resposta imune Th1</b>	<b>Resposta imune Th2</b>
<b>Citocinas envolvidas</b>	Interferon gama	Interleucinas 4 e 5
<b>Participação da IgE</b>	Ausente	Presente
<b>Participação da IgG</b>	Presente	Ausente
<b>Participação de eosinófilos</b>	Ausente	Presente
<b>Participação de mastócitos</b>	Ausente	Presente
<b>Participação de linfócitos</b>	Presente	Presente
<b>Participação de neutrófilos</b>	Presente	Ausente
<b>Patologia</b>	Doenças auto-imunes e resposta a infecções virais e bacterianas	Alergias e resposta à infecções helmínticas.

Adaptado de Ponte et al, 2007 Th1: T helper 1 (linfócitos T auxiliares do tipo 1); Th2: T helper 2 (linfócitos T auxiliares do tipo 2); IgE: imunoglobulina E; IgG: imunoglobulina G.

- **A hipótese da Higiene**

De acordo com a hipótese da higiene, as políticas de vacinação e de saneamento básico implantadas nas últimas décadas em países desenvolvidos previnem doenças infecciosas na infância, o que impede o equilíbrio imunológico, explicando o aumento da prevalência de doenças alérgicas. Strachan em 1989, o qual primado pelo paradigma de que exposição a microbióticos poderia causar tanto doença quanto proteção a outro tipo de doenças, criando-se assim uma dicotomia, que é a base da teoria da higiene, cria assim esta hipótese que passa a ser entendida como que, a exposição a estes agentes poderia resultar em um efeito protetor contra o desenvolvimento de doenças, sobretudo as doenças alérgicas. Várias explicações podem embasar o fato notório do aumento destes processos de exacerbação da resposta imune, tais como a migração para as zonas urbanas, afastando-se assim do feno, dos parasitas, dos microrganismos do solo, bem como a exposição aos antibióticos o que modificou a colonização da flora intestinal, as imunizações, a redução da hepatite A, o ambiente modificado através de medidas de higiene e saneamento e as modificações dos padrões alimentares. São mudanças epidemiológicas rápidas e que não podem ser explicadas por modificações genéticas.

- **Epidemiologia das doenças alérgicas**

O estudo chamado The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) realizou uma investigação extensa da prevalência de asma no mundo. Neste estudo, a prevalência de sibilos no último ano em adolescentes de 13 e 14 anos foi bastante variável, indo de 2,1% na Indonésia até 32,2% na Inglaterra. No Brasil, a prevalência foi de 23,3%. Países industrializados, de cultura ocidental e de língua inglesa, e alguns países da América Latina, têm maior prevalência de asma do que outros países em desenvolvimento (ABERG, 1995; PONTE, et al.; 2007). Apesar de fatores genéticos serem importantes para explicar a variabilidade da prevalência de asma no mundo, a genética não explica o acentuado crescimento recente da prevalência de asma, rinite alérgica, eczema e reatividade ao teste alérgico cutâneo verificado em vários países (ABERG, 1995; VON MUTIUS, 1998), o que provavelmente está relacionado com mudanças ambientais ocorridas nas últimas décadas.

Entre os fatores ambientais que podem influenciar o surgimento de doenças alérgicas estão às infecções na infância. Em recém nascidos, a população de linfócitos T do cordão umbilical tem atividade imunológica predominantemente Th2, semelhante ao que ocorre em indivíduos alérgicos (PRESCOTT, 1989). É possível supor que haja uma predisposição natural para o desenvolvimento de doenças alérgicas na infância e que as doenças infecciosas adquiridas nesta faixa etária contribuam para o desenvolvimento de um equilíbrio da atividade imunológica, prevenindo o surgimento das alergias. Esta é a hipótese da higiene (STRACHAN, 1989), que tem o respaldo de publicações que demonstraram associação inversa entre alergia e exposição a infecções virais, bacterianas e helmínticas (SHIRAKAWA et al., 1997).

- **Classificação das alergias**

As principais alergias estão classificadas em alergias respiratórias, alergias cutâneas, alergias alimentares e alergias a drogas. Segundo uma visão atual, a atopia seria predisposição hereditária do sistema imune a privilegiar reações de hipersensibilidade mediada por IgE, em resposta a antígenos comuns na alimentação, no ambiente intra (aeroalérgenos) e extradomiciliar, conceito esse situando a dermatite

atópica como uma das manifestações das doenças da tríade atópica (dermatite atópica, asma, rinite alérgica).

### **Asma**

A Asma é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por hiper responsividade das vias aéreas manifestando-se por obstrução ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou pelo tratamento, com episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao acordar. O diagnóstico da asma pode ser baseado em condições clínicas e funcionais (LAITINEN, 1985; DJUKANOVIC, 1990).

De acordo com *projeto diretrizes* diagnóstico e tratamento da asma brônquica, do Ministério da Saúde, 2001 e do GINA (GINA (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA) o diagnóstico clínico de asma pode ser feito quando um ou mais dos seguintes sintomas estiver presente: dispnéia, tosse crônica, sibilância, aperto no peito ou desconforto torácico, particularmente à noite ou nas primeiras horas da manhã; sintomas episódicos; melhora espontânea ou pelo uso de medicações específicas para asma (broncodilatadores, antiinflamatórios esteróides); diagnósticos alternativos excluídos. Para caracterizar a evidência clínica de asma as seguintes perguntas devem ser feitas:

- Tem ou teve episódios recorrentes de falta de ar?
- Teve alguma crise ou episódios recorrentes de sibilância?
- Tem tosse persistente, particularmente à noite ou ao acordar?
- Acorda por tosse ou falta de ar?
- Tem tosse, sibilância, aperto no peito após atividade física?
- Apresenta tosse, sibilância ou desenvolve aperto no peito após exposição a alergênios como mofo, poeira de casa e animais ou irritantes como fumaça de cigarros e perfumes ou após resfriados ou alterações emocionais como risada ou choro?
- Usa alguma medicação quando os sintomas ocorrem? Com que freqüência? Os sintomas são aliviados quando a medicação é usada?

## Rinite Alérgica

O diagnóstico clínico da rinite pode ser dado baseado na história clínica típica, que revela o aparecimento dos sintomas (prurido nasal, ocular, auricular, rinorréia aquosa, espirros em salva e obstrução nasal) quando existe o contato com alergênicos. Entretanto, os sintomas também podem surgir após o contato com irritantes (odores fortes, ar frio, poluição, fumaça de cigarro, perfumes etc.). Fatores como a frequência, intensidade, duração e periodicidade dos sintomas, relação com atividades profissionais ou de lazer, assim como o impacto na qualidade de vida e ainda questionar a presença de antecedentes pessoais e familiares de atopia (asma, dermatite atópica, etc.), fazem parte da investigação da rinite alérgica (WILSON et al., 2001; DEMOLY, 2003).

## Urticária

A urticária é uma manifestação alérgica, que pode envolver pele e mucosas, e cujas lesões se apresentam morfologicamente como eritemato- edematosas, ou por vezes, de cor pálida, circunscritas, isoladas ou agrupadas, fugazes, geralmente numulares ou lenticulares, podendo variar em forma e tamanho, assumindo freqüentemente arranjos geográficos ou figurados. São conseqüentes à vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar e edema da derme, estando geralmente associadas a prurido intenso. A duração das lesões individualizadas é fugaz, em torno de 24 a 48 horas, esmaecendo sem deixar seqüelas na pele, acompanhadas ou não de edema de partes moles ou mucosas, denominado angioedema (FRANCA, 2000; GRATTAN, 2001).

## 2.3 A atopia e relação com leucemia linfóide aguda na infância

A prevalência das doenças alérgicas tem tido um crescente aumento nas últimas décadas. Muito tem se especulado a cerca da sua interação com o desenvolvimento de outras doenças. Uma dessas hipóteses é de que a atopia influenciaria patologias como diabetes melito tipo I, as doenças cardiovasculares e o câncer. Existe na literatura um debate sobre história de alergia e risco de desenvolvimento de câncer e Wang e Diepgen em 2005, realizaram uma revisão dos estudos epidemiológicos sobre esse tema, avaliando diversos tipos de cânceres como colo-retal, pâncreas, linfomas, e leucemias. A revisão sobre leucemias neste estudo refere diversos trabalhos, na maioria deles, estudos do tipo caso-controle. Os principais estudos citados referenciam uma baixa associação de desenvolvimento de leucemias na infância e precedente de alergia, sendo a alergia prévia fortemente apontada como fator de proteção para desenvolvimento de LLA na infância (KINLEN & PETRIDOU, 1995; SCHUZ et al., 2003; COOPER et al., 1996). Outro estudo conduzido no Japão, nos Estados Unidos, e na Alemanha, mostrado no trabalho conduzido por Petridou em 1997, com 153 crianças, relacionando um efeito protetor para desenvolver LLA de 60% em crianças com história de atopia e internamentos por processos alérgicos .

No que diz respeito ao câncer, a alergia tem sido apontada como desempenhando um papel de fator de proteção contra o desenvolvimento de neoplasias. Como demonstraram Wang e Diepgen (2005), a doença atópica tem sido apontada como um fator de risco inverso ou proteção para o desenvolvimento de leucemias em crianças. A tabela 5 mostra um resumo dos principais estudos de associação de atopia e leucemias na infância modificado de Wang e Diepgen em 2005.

Alguns estudos apontam para essa evidência de proteção entre alergia e desenvolvimento de leucemias em crianças, conforme foi resumido na tabela 1, sendo essa associação inversa entre atopia e risco de leucemia, praticamente unânime nos trabalhos apontados nos últimos vinte anos. Wen et al., 2000 conduziram um grande estudo do tipo caso-controle constituído de 1.842 casos e 1.986 controles. As condições alérgicas pesquisadas neste estudo foram asma, rinite alérgica, alergia alimentar, alergia a drogas, eczema de contato e urticária. Os resultados encontrados apontam para uma redução de 30% no risco de desenvolvimento de LLA quando o sujeito estudado

apresentou alguma dessas condições alérgicas e além disso, o número de condições alérgicas apresentadas influenciaram também no risco de desenvolver leucemias, como demonstrado por uma tendência de decréscimo linear de risco de desenvolver LLA versus aumento no total de alergias apresentadas por cada indivíduo. O efeito protetor da alergia em crianças e risco de LLA também foi muito bem enfatizado num estudo de Schuz et al, em 2003, realizado na Alemanha, o qual envolveu 1.294 indivíduos entre portadores de LLA e controles. A exposição estudada foi classificada em rinite, neurodermatite, asma, eczema, urticária, alergia alimentar e alergia a drogas. Para rinite a razão de chances de desenvolvimento de LLA foi de 0.5 com intervalo de confiança de 0.3 a 0.7, sendo esse fator rinite, nesse estudo um fator de proteção para LLA. Entretanto para leucemia mieloide aguda a razão de chance encontrada com esse mesmo fator, foi de 1.0 com IC de 0.5 a 2.1. Para a exposição asma, a razão de chance encontrada foi de 0.6 com IC de 0.3 a 1.4, isso para LLA, pois para LMA, não foi apresentado o risco quando o fator foi asma. Resultado de razão de chance idêntico foi encontrado para a exposição eczema de contato, já com relação a urticária, houve uma associação diferente, com OR = 1.1 e IC 95% de 0.6 a 2.9 para LLA. Esses achados de Schuz estão resumidos na tabela 5.

Essa relação entre o sistema imunológico e risco para desenvolvimento de LLA tem levado os pesquisadores para investigação de outros fatores intimamente relacionados com a resposta imune, e consequentemente, apontados como associados a risco de desenvolvimento de leucemia linfóide, a exemplo das infecções maternas, infecções na criança, aleitamento materno e imunização.

Tabela 5- principais estudos que avaliaram a associação de atopia com leucemias em crianças

Estudo/país	Tipo de estudo	Nº casos	Exposição	OR/IC 95%
Cooper et al, 1996, Estados Unidos	Caso controle de base populacional	811	Asma/LLA	0.9 (0.4-1.9)
			Eczema/LLA	1.7 (0.7-4.2)
			Rinite/LLA	1.0(0.6-1.8)
	Caso controle de base hospitalar		Rinite	0.5(0.3-1.0)
			Eczema	0.7(0.3-1.5)
			Asma	1.1(0.5-2.6)
Linet at al,1986, Estados Unidos		342	Urticária	0.7(0.4-1.0)
Linet at al,1987, Estados Unidos	Caso controle de base hospitalar	100	Alergia	1.0(0.5-2.3)
Nishe e Miyake, 1989, Japão	Caso controle de base hospitalar	63	Atopia	0.3(0.1-0.8)
Petridou et al,1997, Grécia	Caso controle de base hospitalar	153	Alergia	0.4(0.1-1.4)
Schuz et al, 2003, Alemanha	Caso controle de base populacional	1294	Rinite	0.5 (0.3-0.7)
			Neurodermatite	0.5 (0.3-0.7)
			Asma	0.6 (0.3-1.4)
			Eczema de contato	0.6 (0.4-1.0)
			Urticária	1.1 (0.6-2.9)
			Alergia a drogas	0.8 (0.6-1.2)
				0.8 (0.6-1.0)
Wen et al, 2000, Estados Unidos	Caso controle de base populacional	1842	Asma	0.6 (0.5-0.8)
			Rinite	0.7 (0.6-0.8)
			Alimentar/droga	0.7 (0.5-0.9)
			Eczema	0.9 (0.7-1.2)
			Urticária	0.7 (0.6-0.8)
			Alergia	

Adaptado de Wang e Diepgen, 2005.

## 2.4 As hipóteses que associam causalidade com LLA

- Hipóteses de Greves e Kinlen

Duas hipóteses foram levantadas como sendo possíveis de explicar a associação de leucemias na infância e fatores ambientais associados a resposta imunológica. A hipótese de Kinlen (1988) sugere que residentes em regiões de alta miscigenação populacional estariam sujeitos a um risco aumentado de desenvolver leucemias. Sua hipótese se baseia na observação de que em áreas previamente isoladas no Reino Unido, as quais receberam um grande afluxo populacional nos anos 1950, foram constatados níveis de ocorrência de leucemia mais altos que a média nacional para a época. Uma das explicações postuladas para este fato seria o aumento na exposição destes habitantes a infecções virais e de que essa população poderia possuir uma baixa imunidade natural. Estes agentes infecciosos seriam os responsáveis pelo desencadeamento de leucemias agudas (KINLEN et al., 1993; KINLEN LJ & PETRIDOU, 1995). Suspeita-se atualmente dos seguintes agentes: Epstein-Barr vírus, herpes vírus tipo 6 e o parvovírus B19 (MAGALHÃES, POMBO-DE-OLIVEIRA, BENNETT et al, 2000). Desde então vários pesquisadores têm procurado, através de estudos imunomoleculares, estabelecer associação entre agentes infecciosos e leucemias infantis. A outra hipótese seria postulada por Greaves em 1988, que por sua vez faz referência a duas possibilidades de que uma resposta anormal às infecções comuns tem um papel decisivo no desenvolvimento de leucemia linfóide aguda na infância. A primeira possibilidade descrita por Greaves baseia-se nas conclusões de Kinlen (1988), já citadas, em que aumento na incidência de leucemia, em certos agrupamentos populacionais, devem-se à mobilidade e mistura populacional resultando em infecções ocorrendo em indivíduos previamente não expostos ou susceptíveis. A segunda possibilidade, denominada por Greaves de hipótese da "infecção atrasada", afirma que leucemia linfóide aguda é causada por uma falta de exposição à infecção e por uma falha no sistema imune infantil. Nestas crianças, posteriormente, uma resposta imune anormal ocorre frente às infecções bacterianas e virais comuns, quando estas acontecem tarde (atrasadas). Em 1995, Kinlen e Petridou, estudando índices de mortalidade infantil devido à leucemia em 33 países, ocorridas durante os anos de 1950 e 1960, perceberam aumentos significativos nestas taxas em áreas rurais sujeitas a migrações e misturas populacionais.

Os autores destacam o cuidado por eles tomado ao fazer comparações internacionais quanto à mortalidade e percebem que, dentro deste contexto, Grécia e Itália se sobressaem, corroborando a hipótese das infecções proposta por Kinlen em 1988. Outros estudos têm sido realizados no sentido de estreitar essa associação de causalidade/risco de desenvolvimento de leucemias na infância e a participação do sistema imunológico.

Acredita-se que consideráveis variações temporais e geográficas na incidência de LLA, possam refletir uma correlação com os níveis socioeconômicos de desenvolvimento e sugere que haja um papel importante dos fatores ambientais no envolvimento da patogênese da LLA entre crianças e adolescentes (KINLEN et al., 1995; GREAVES et al., 1993). Diversas evidências epidemiológicas demonstram forte relação de infecções nos primeiros anos de vida que poderiam influenciar no risco de LLA, tendo inclusive sido ofertados diferentes cenários para explicar essa associação , mas o mecanismo biológico ainda precisa ser estabelecido (STILLER & PARKIN 1996).

- Hipótese Adrenal

Contrastando com essas duas hipóteses, de Greaves e Kinler, tem-se a Hipótese Adrenal, postulada em 2008 por Schmiegelow et al, na qual eles hipotetizam que o risco de LLA na infância estaria reduzido com o aumento de infecções nos primeiros anos de vida. Isso se deveria ao fato de que a exposição a infecções promoveria ativação do eixo hipotálamo/hipófise/adrenal e elevaria os níveis séricos de cortisol, que eliminaria clones leucêmicos e pré-leucêmicos nos tipos de LLA predominantes entre os 2 e 5 anos de idade. Essa Hipótese Adrenal emerge de algumas observações que estão resumidas no quadro 1.

**Quadro 1- Fundamentos da Hipótese Adrenal**

- 1- A incidência de LLA mostra um pico antes dos 5 anos de idade que é mais proeminente em países com maiores indicadores de desenvolvimento que nos países menos ricos;
- 2- Nos países ocidentais industrializados cerca de 80% dos casos de LLA B possuem uma translocação ETV6/RUNX1 ou um clone leucêmico hiperhiplóide. Ambos os subgrupos estão relacionados com um evento iniciado na vida pré-natal e tem uma fase pré-leucêmica larga.
- 3- Uma porcentagem de recém-nascidos saudáveis possuem células de cordão positivas para translocação t(12,21)/ETV6/RUNX1, que aumenta em 100x o risco de desenvolver LLA ETV6/RUNX1 positiva. E sendo assim, a cinética de desaparecimento de tais células pré-leucêmicas nos 1 a 2 anos de vida poderiam influenciar o risco subsequente de LLA.
- 4- Os glicocorticóides estão entre os agentes mais eficazes na terapia antileucêmica. Todos os casos que ocorrem na infância são especialmente sensíveis aos glicocorticóides.
- 5- Terapia com o hormônio adrenocorticotrófico pode induzir níveis de cortisol elevado, o que leva a remissão morfológica na LLA.
- 6- Durante a infecção induzida por *stress*, a resposta do ACTH pode aumentar a secreção de cortisol para níveis que são eqüipotentes com os níveis de glicocorticóides usados na terapia antileucêmica.
- 7- Infecções graves podem induzir a remissão morfológica de LLA na infância.
- 8- Permanência em creches e instituições de cuidados diários aumenta significativamente o risco de infecções e está associado a um risco reduzido de LLA na infância.
- 9- Nos países em desenvolvimento tanto a carga elevada de infecções quanto a desnutrição podem contribuir para uma ocorrência menor de LLA na infância, pois aumenta a secreção de cortisol durante infecções e aumenta a resposta celular ao cortisol.

10- Cerca de 90% dos casos de LLA na infância são do tipo B e apresenta as seguintes evidências genéticas:

- a. LLA na infância, apresenta um pobre prognóstico e frequentemente envolve a translocação no gene MLL ou na região cromossômica 11q2.3.
- b. O pico de incidência da LLA ocorre entre 2 e 7 anos de idade, dos quais 80 % das crianças nos países desenvolvidos apresentam uma das duas mutações: translocação t(12;21)(p13;q22)[RUNX1/ETV6] ou um cariótipo com alta hiperploidia (X51 cromossomos). Ambos os subgrupos têm uma alta taxa de cura com quimioterapia baixa a moderada intensidade de agentes antimetabólicos. Epidemiologicamente este pico de incidência está ausente ou menos pronunciado nos países em desenvolvimento.
- c. Um grupo biologicamente heterogêneo de LLA de células T, de casos com translocações t(9;22), amplificação AML1, dic(9;20), LLA hipoploide e numerosas outras mutações leucêmicas recorrentes requerem altas doses de quimioterapias com os agentes antimetabólicos e não tem um pico de incidência.

Fonte: Adaptado de Schmiegelow et al., 2008

A hipótese adrenal propõe que mudanças quantitativas e qualitativas possam ocorrer no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que seria plausível para explicar várias das observações descritas por Greaves e Kinler em suas teorias da etiologia da LLA. Entretanto estudos ainda necessitam ser realizados, sobretudo em países em desenvolvimento que tem uma incidência e prevalência de LLA diferentes dos países desenvolvidos, sobretudo devem ser estudadas de forma prospectiva as crianças que apresentem células pré-leucêmicas já ao nascimento, bem como a cinética de desaparecimento de células pré-leucêmicas com interação com as infecções na infância e ainda observações da resposta do ACTH em crianças saudáveis frente a sua história infecciosa. No Brasil, estudo publicado por Azevedo-Silva et al em 2010 demonstrou que houve uma mudança nas taxas de incidência de LLA no país como um todo.

Entretanto, existem diferenças na taxa de incidência de LLA entre as distintas regiões do país, como por exemplo uma alta taxa em Curitiba e Goiânia, e uma pequena taxa em Aracaju e Salvador. Estas diferenças na taxa de incidência no Brasil, poderiam ser explicadas em parte pelo fato do Brasil ser um país tropical, com uma variedade de infecções virais, parasitárias e bacterianas, e por esta exposição aos diferentes tipos de infecções, e das distintas endemias nas diversas regiões, poderia resultar em possível secreção contínua de cortisol que poderia eliminar clones leucêmicos em crianças que vivem em regiões expostas a determinados agentes infecciosos.

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 Delineamento do Estudo**

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle não pareado, de base hospitalar, no qual os participantes foram selecionados entre os indivíduos que apresentavam o diagnóstico da doença leucemia linfoide aguda (**casos**) e entre indivíduos que não apresentam a doença leucemia linfoide aguda (**controles**), para verificar a possível associação de risco ou proteção entre a exposição a determinados fatores (doenças alérgicas e outros fatores) e o desenvolvimento da doença (LLA).

#### **3.2 População e amostra**

Crianças e adolescentes com faixa etária entre um a 18 anos de idade de ambos os sexos. A amostra foi constituída da criança e adolescente portador da neoplasia hematológica (leucemia linfóide aguda subtipo não T) e de um grupo comparativo de crianças e adolescentes não portadores da doença maligna, dos estados de Pernambuco e Paraíba e cuja genitora após explicação da pesquisa concordou em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

#### **O dimensionamento da amostra**

O cálculo do tamanho da amostra foi feito utilizando-se software do Laboratório de Epidemiologia e Estatística da Faculdade de Medicina da USP disponível em <http://www.lee.dante.br/> e os seguintes critérios foram considerados para estudo do tipo caso-controle:

1. Nível de significância do teste alfa=5%
2. Poder do teste 1-beta=80%
3. Proporção de pessoas expostas ao fator de risco na população=35% (alergia)
4. O valor de OR mínimo a ser detectado=0.25
5. Razão entre o número de casos e controles=1:2

A amostra esperada para com esses parâmetros foi de 58 casos e 116 controles, já sendo considerando um acréscimo de 10% para perdas. Inicialmente foram selecionados 80 casos de pacientes com leucemia linfóide aguda do Centro de Oncologia do Hospital Oswaldo Cruz da UPE no período compreendido entre 2008 e 2011, entretanto após depuração dos casos, aplicando-se os critérios de inclusão de casos com leucemia linfoide aguda não T, com idade entre 1 e 18 anos, com resultado de comprovação de classificação da doença através da imunofenotipagem e mielograma, a amostra final foi constituída de 60 pacientes e 120 controles. A figura 1 mostra o fluxograma da seleção e exclusão dos casos, onde a necessidade de exclusão ocorreu devido a: óbito de pacientes (07 casos); impossibilidade de fazer a coleta do material biológico para as análises laboratoriais (08 casos); e um total de cinco casos com critérios de diagnóstico final que não se enquadram no modelo: leucemia mielóide aguda ao invés de LLA (02 casos), leucemia com comportamento bifenotípico (01 caso não confirmado, porém excluído), leucemia com diagnóstico de leucemia/linfoma (02 casos).

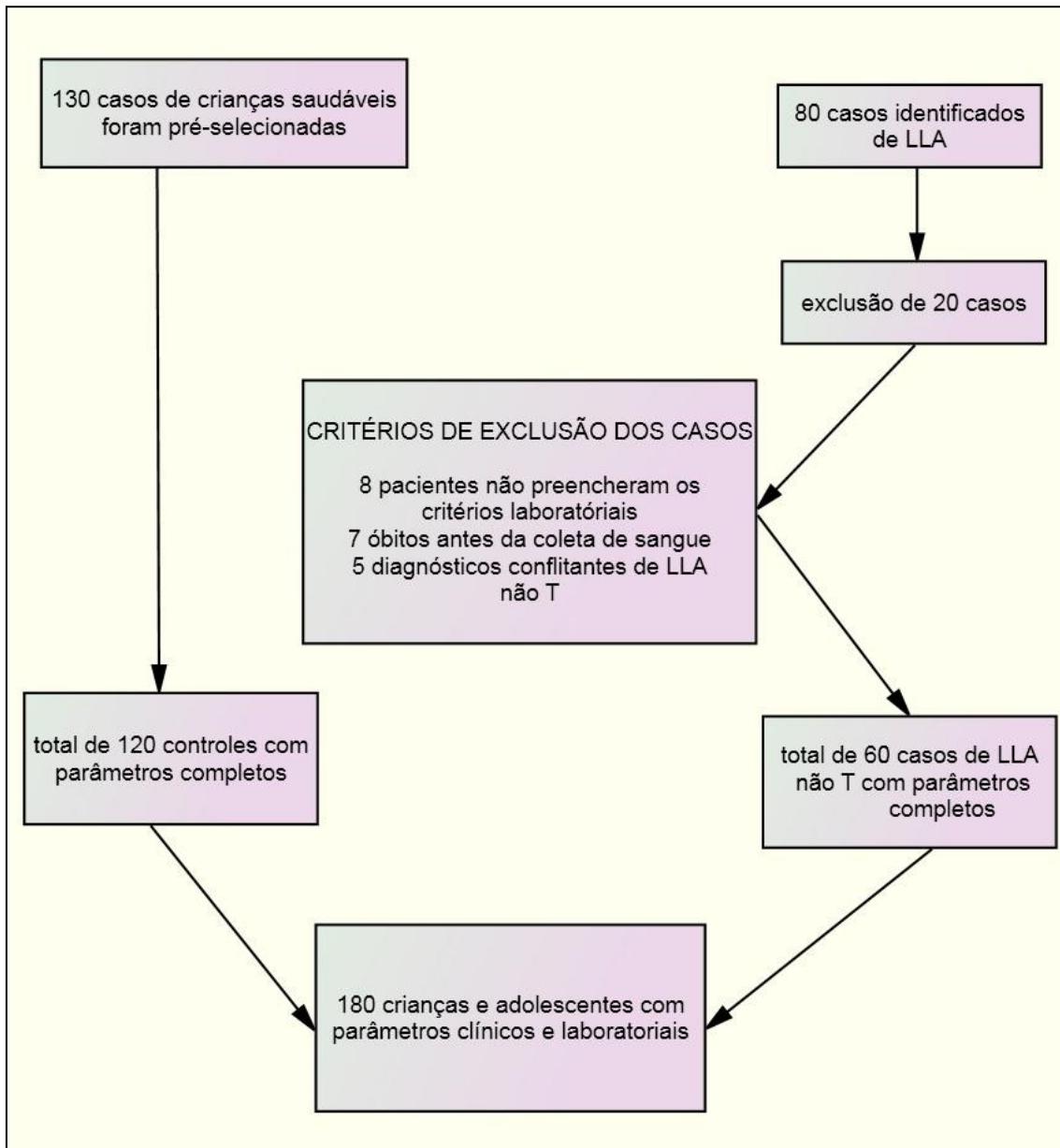


Figura 1- fluxograma da seleção da amostra

### Seleção dos casos:

#### Critérios de inclusão

A definição de caso foi pré-estabelecida pelo diagnóstico médico baseado em alterações clínicas e achados laboratoriais com critérios já definidos de diagnóstico de leucemia linfóide aguda, bem como a classificação do subtípico utilizando-se a

imunofenotipagem das células da medula óssea através da técnica de citometria de fluxo. Todas as crianças e adolescentes da amostra já haviam sido diagnosticadas com leucemia linfóide aguda, sendo o diagnóstico de inclusão dos casos feito através do **mielograma (presença de linfoblastos acima de 20% na medula óssea segundo o critério da OMS)** e da identificação do subtipo de população de linfócitos que adquiriu transformação maligna, através da **imunofenotipagem realizada por citometria de fluxo. Todas as crianças e adolescentes com a doença foram atendidas pelo Sistema Único de Saúde** no Centro de Oncologia do Hospital Oswaldo Cruz da Universidade Estadual de Pernambuco (CEON-OC/UPE). Por se tratar de um centro de referência de alta complexidade para tratamento do câncer infantil o CEON recebe crianças e adolescentes de vários estados do Nordeste, sobretudo Paraíba e Alagoas, pela maior proximidade. O quadro 2 mostra os critérios de classificação da leucemia linfóide aguda, utilizando-se marcadores celulares com anticorpos monoclonais pela técnica laboratorial da citometria de fluxo. As classificações *Pró-B*, *Comum*, *Pré-B* e *B* são consideradas *não T*.

Quadro 2 – Critérios de classificação imunofenotípica de LLA

Marcador	<u>Classificação da Linhagem B</u>				<u>Classificação da Linhagem T</u>		
	<u>Pró-B</u>	<u>Comum</u>	<u>Pré-B</u>	<u>B</u>	Pré-T	Intermediário	T
HLA-DR	+	+	+	+	+/-	-	-
TdT	+	+	+	+/-	+	+	+
CD19	+	+	+	+	-	-	-
CD22(c)	+/-	+	+	+	-	-	-
CD10	-	+	+	-/+	-/+	-/+	+/-
CD20	-	-/+	+	-	-	-	-
cμ	-	-	+	+	-	-	-
SmIg	-	-	-	-	-	-	-
CD7	-	-	-	-	+	+	+
CD2	-	-	-	-	-	+	+
CD3(c)	-	-	-	-	+/-	+	+
CD1a	-	-	-	-	-	+/-	-
CD3	-	-	-	-	-	-	+
CD4/CD8	-	-	-	-	-	+/-	+

TdT= terminal desoxinucleotil transferase; CD22(c)=CD22 intracitoplasmático;cμ=cadeia μ citoplasmática; SmIg=imunoglobulina de superfície; + = expressão do antígeno; +/-: expressão variável, frequentemente positiva;-/+: expressão variável, frequentemente negativa; -: ausência de expressão do antígeno.

Adaptado de Souza et al, 1998.

### Critérios de exclusão

Casos de leucemia que não apresentaram os critérios de leucemia não T, ou não foi possível efetuar a coleta de dados e ou de material biológico para ensaios laboratoriais.

### Seleção dos controles

Os controles foram selecionados na proporção de 1:2 pareados pela idade e sexo com os casos pré-selecionados. Os controles foram crianças hígidas da população da mesma área de abrangência do estudo, entre usuários do Sistema Único de Saúde do Complexo de Pediatria Arlinda Marques, João Pessoa – PB, que compareceram ao serviço sem queixas clínicas, para realização de exames de rotina, ou acompanhando a mãe com outro irmão doente, além de para atender aos requisitos dos programas sociais do governo. O critério de inclusão dos controles parte do princípio que os controles estejam também expostos aos fatores de risco ou proteção ao agravo por estarem na mesma área de abrangência dos casos.

### Local do estudo

O presente estudo foi realizado nos estados de Pernambuco e Paraíba, respectivamente no Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade Estadual de Pernambuco, e no Complexo de Pediatria Arlinda Marques, locais onde foram selecionados os casos diagnosticados de leucemia linfóide aguda e os controles respectivamente. A análise de marcadores biológicos foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica HEMATO, situado a AV. Maximiano Figueiredo, 387, Centro, João Pessoa-PB e em parceria com Laboratórios de patologia clínica de referência como o Hermes Pardini em Belo Horizonte/MG.

### 3.3 Descrição das variáveis do estudo

**Dependente:** leucemia linfóide aguda

A leucemia linfóide aguda foi o agravo estudado na criança e adolescente entre um e 18 anos e o diagnóstico da doença foi dado pela presença ao mielograma de mais de 25% de blastos linfoides na medula óssea; associado ao exame de imunofenotipagem, que caracteriza o subtípo específico da leucemia em linfóide ou mielóide, nesse caso só os casos de classificação imunofenotípica linfóides entraram no estudo.

**Independentes** (fatores de risco ou de proteção relacionados ao agravo/ ou variáveis explicativas)

#### a) Variáveis relacionadas às condições da mãe e da gestação

**InSTRUÇÃO DA MÃE** - a escolaridade materna foi medida em fase de conclusão do estudo se ensino fundamental I completo ou incompleto, se ensino fundamental II completo ou incompleto, se ensino médio completo ou incompleto, se ensino superior completo ou não concluído.

**Idade materna** - foi avaliada pela data de nascimento e subtraída da idade do filho para identificar a idade em que ocorreu a gestação nos questionários dos apêndices

**Exposição a infecções na gestação** - foi medido através de pergunta direta se houve alguma infecção, do tipo bacteriana, ou doenças febris exantemáticas que caracterizariam infecções virais.

#### b) Variáveis relacionadas à criança

**Peso ao nascer** - foi expresso em gramas e categorizado como > 2500 g ou < 2500 g.

**Número de pessoas que residem no mesmo domicílio** da criança - averiguado através de pergunta direta no questionário dos apêndices B e C.

**Aleitamento materno** - foi perguntado se a criança amamentou, em caso positivo, foi subdividido em dois tempos, se mais ou menos de 3 meses de aleitamento materno exclusivo, ou se mais ou menos de 6 meses de aleitamento materno exclusivo.

Os casos em que houve aleitamento misto não foram considerados como sim, conforme perguntas formuladas nos apêndices B e C.

**Vacinação** - averiguação de todo o calendário vacinal preconizado pelo Programa Nacional de Imunização (PNI) de acordo com as referências do cartão de vacina da criança e ainda foram investigadas se receberam outras vacinas que estejam fora do calendário proposto pelo PNI, incluindo número de doses.

c) Variáveis relacionadas com a identificação do marcador de risco para o agravo.

**-Alergia prévia do tipo:**

**Asma** - a existência de asma foi caracterizada através do diagnóstico clínico de asma, seguindo as recomendações GINA (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2009) expressas nos apêndices B e C.

**Rinite alérgica** - a existência de rinite alérgica foi caracterizada clinicamente por perguntas elaboradas nos apêndices B e C de acordo com o diagnóstico clínico de rinite alérgica, conforme um sistema de escore clínico no qual a cada um de seis sinais/sintomas (obstrução nasal, rinorréia, espirros, prurido nasal, prurido de orofaringe e prurido ocular) foi atribuída uma pontuação de 0 a 3, de acordo com a intensidade do sinal/sintoma, porém não foi objetivo desse estudo classificar a gravidade da rinite alérgica e consideramos tendo rinite os que apresentava qualquer das classificações: Pontuação total entre 1-6 indica rinite alérgica leve, entre 7 e 12, rinite moderada e entre 13-18, rinite alérgica grave (WILSON et al., 2001). Ainda foram levadas em consideração as recomendações do projeto iniciativa ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) citadas por DEMOLY et al., 2003. As perguntas estruturadas estão expressas nos apêndices B e C.

**Dermatite atópica** - a dermatite atópica foi caracterizada de acordo com os critérios diagnósticos no guia de validação europeu de dermatite atópica (**Clinical Validation and Guidelines for the SCORAD Index: Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis, 1997**). E as perguntas estruturadas para detecção da exposição dermatite atópica estão expressas nos apêndices B e C.

**Urticária** - a existência de urticária foi caracterizada clinicamente por perguntas elaboradas nos apêndices B e C de acordo com o diagnóstico clínico de urticária,

elaboradas com base no guia de definição, classificação e diagnóstico de urticária GALEN (EAACI / GALEN / EDF / WA0, 2009).

**Nível sérico de IgE total** - foi expressa em valores de acordo com a técnica laboratorial empregada que é a de quimiluminescência e os valores de referência considerados como normais de acordo com os dados do fabricante que foi até 52 UI/ml. Todos os sujeitos participantes no estudo fizeram uso prévio de albendazol em dose única de 400 mg duas semanas antes da coleta do sangue para redução da interferência das parasitoses e helmintíases que podem elevar IgE sobretudo em regiões com saneamento básico insuficiente, como no Nordeste brasileiro.

**Nível sérico de IgG para o vírus de Epstein-Barr** - foi expressa em valores de acordo com a técnica laboratorial empregada que é a enzima imunoensaio (ELISA) e os valores de referência considerados elevados para caracterização infecção recente é de níveis de IgM > 12 UI/mL e para infecção prévia níveis de IgG > 10 UI/mL.

**Nível sérico de IgG para o vírus parvovírus B19** - foi expressa em valores de acordo com a técnica laboratorial empregada que é a de enzima imunoensaio (ELISA) e os valores de referência considerados elevados para caracterização infecção prévia níveis de IgG > 5,1 UI/mL.

**Nível sérico da proteína C reativa** - foi expressa em valores de acordo com a técnica laboratorial empregada que é a de determinação qualitativa e semi-quantitativa da Proteína C Reativa (PCR) em amostras de soro pelo látex e os valores de referência considerados elevados são > de 6 mg/ml na amostra.

**Nível sérico de anti-estreptolisna “O” (ASLO)** - foi expressa em valores de acordo com a técnica laboratorial empregada que é a de determinação qualitativa e semi-quantitativa da anti-estreptolisina “O” (ASLO) em amostras de soro pelo látex e os valores de referência considerados elevados são > de 200 U/ml na amostra.

**Nível de cortisol basal sérico** - foi expresso em valores de acordo com o método de quantificação empregado considerando a calibração do equipamento controle de validação interna com dosagens de padrões normais e alterados. Foram considerados elevados os valores de cortisol  $\geq 23$  mcg/dL.

**Nível de ACTH basal sérico** - hormônio adrenocorticotrófico foi expresso em valores de acordo com o método de quantificação empregado considerando a calibração do equipamento, controle de validação interna com dosagens de padrões normais e

alterados. Foram considerados normais os valores do hormônio adrenocorticotrófico até 40 mcg/dL.

**Uso prévio de glicocorticóides** – o uso prévio de glicocorticóides foi caracterizado por perguntas diretivas às mães sobre uso de medicamentos e apresentada uma lista com os principais glicocorticóides dexametasona, prednisona e prednisolona, além das apresentações inalatórias e parenterais para auxiliá-las no reconhecimento dos medicamentos. Foi caracterizado como tendo usado glicocorticóides as crianças e adolescentes dos dois grupos que fizeram uso de corticóide inalatório mensalmente por mais de seis meses/ano; os que usaram glicocorticóides orais por pelo menos cinco dias semanais no mínimo 3 vezes por ano; e ainda considerado como uso positivo de glicocorticóides os que usaram glicocorticóides via intramuscular ou endovenoso pelo menos duas vezes por ano.

### **3.4 Considerações Éticas**

A pesquisa foi realizada de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinque e ainda da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que trata da pesquisa em seres humanos, onde foi elaborado um termo de consentimento livre e esclarecido para os provedores das crianças explicando todas as informações e objetivos da pesquisa, bem como o consentimento para coleta dos dados e de material biológico para dosagens séricas de substâncias.

A presente pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba e aprovada conforme documento do anexo 1 e 2.

A coleta dos dados foi devidamente autorizada pelas instituições envolvidas conforme documento do anexo 3.

### **3.5 Operacionalização**

A medida de exposição nos casos e controles foi realizada através da aplicação de um questionário clínico padronizado, de exame clínico, bem como da dosagem no soro de marcadores da resposta inflamatória e imune.

### **A quantificação dos marcadores biológicos**

**IgE total** - A dosagem de IgE total foi realizada utilizando-se o método de quimiluminescência com kit **IMMULITE® 2000 assay** para IgE, código L2KIE6, 600 testes.

**Pesquisa de anticorpos tipo IgG** para o vírus de Epstein Barr - A dosagem de IgG para o vírus de Epstein Barr foi realizada utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático ELISA, com kit human®

**Pesquisa de anticorpos tipo IgG** para o vírus parvovírus B 19 - A dosagem de IgM e IgG parvovírus B 19 foi realizada utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático ELISA, com kit human®

**PCR**- A dosagem da proteína C reativa foi realizada utilizando-se o método de com kit látex CEPA® para determinação da proteína C reativa, com 100 testes.

**Pesquisa de anticorpos anti estreptolína** - O para pesquisa desse marcador utilizando-se o método de aglutinação em placa por partículas de látex com kit CEPA®, com 100 testes.

**Dosagem do cortisol sérico** - a coleta de sangue para dosagem sérica do cortisol basal foi feita entre 07h30min h e 08h00min pela manhã conforme instruções específicas para ensaio dessa substância, que tem influências biológicas de acordo com o ciclo circadiano, através de punção venosa com cateter e preparo do paciente com jejum de oito horas em tubo contendo gel para separação do soro. As amostras foram acondicionadas, identificadas, centrifugadas para obtenção do soro e em seguida refrigeradas para posterior dosagem. A dosagem do cortisol sérica foi feita utilizando-se kit de ensaio **IMMULITE® 2000 assay** para cortisol, em equipamento de quimiluminescência.

**Dosagem do ACTH** – a coleta de sangue para a dosagem sérica do ACTH foi feita conforme as recomendações específicas para o ensaio utilizado, através de punção venosa com cateter e preparo do paciente com jejum de oito horas. Todas as amostras dos casos e controles foram colhidas de sangue venoso em tubo contendo o anticoagulante EDTA para obtenção de plasma. As amostras foram acondicionadas, identificadas, centrifugadas para obtenção do plasma e em seguida refrigeradas para posterior dosagem. A dosagem do ACTH foi feita utilizando-se kit de ensaio IMMULITE® 2000 *assay* para ACTH, em equipamento de quimioluminescência.

### A Coleta de dados

Os dados foram obtidos por meio da aplicação de um instrumento com questionário após identificação e seleção dos casos e controles. As fontes de informações dos casos foram obtidas através de entrevistas com as mães e os pacientes, além de pesquisa nos prontuários, história clínica, exame físico e coleta de sangue para realização de dosagem de marcadores biológicos, no próprio serviço referenciado. Em pacientes internados a coleta dos dados foi realizada a beira do leito e para os pacientes que não estavam internados a entrevista, avaliação do prontuário, história e exame clínico foram feitas no ambulatório de oncohematologia no prédio do CEON e a coleta de sangue se deu nas instalações do laboratório do hospital Oswaldo Cruz, pela manhã antes da consulta médica. Para os controles as fontes de informações foram verificadas no âmbito ambulatorial, bem como a coleta de sangue se deu em estrutura de sala de coleta montada no ambulatório exclusivamente para a pesquisa.

### Aspectos gerais de biossegurança

Antes da coleta sanguínea, os tubos foram etiquetados com um protocolo numérico previamente gerado, e utilizado na forma de etiquetas sendo afixadas nos tubos e nos questionários para não haver discordância entre o material biológico e os dados da entrevista. Esse protocolo era implantado no âmbito laboratorial para

processamento das análises utilizando-se os dados de identificação contidos no formulário da entrevista. Para a anti-sepsia do local a ser punctionado, utilizou-se álcool a 70% antes e após cada procedimento. As coletas foram realizadas com o sistema a vácuo e tubos e agulhas descartáveis e estéreis da marca Greiner-Bione® e descarte do material foi feito em recipiente específico para materiais perfuro-cortante e biológicos. Esse tipo de resíduo é encaminhado à empresa especializada em coleta e processamento de resíduos de serviços de saúde (SERQUIP) conforme especificações da RDC nº 306 de 07/12/2004 (ANVISA).

Equipamentos de proteção individual (EPI's), tais como: jaleco, luvas descartáveis, sapato fechado e máscara foram utilizados, e a desinfecção do local da coleta foi realizada com álcool a 70% antes de cada procedimento e com hipoclorito de sódio 5% após os procedimentos de dosagens e de processamento das amostras.

Não houve casos de acidente pérfurocortante com quaisquer membros da equipe.

### **Aspectos da entrevista/aplicação do questionário estruturado**

Os entrevistadores foram treinados para utilizar um questionário clínico estruturado com questões abertas, bem como questões fechadas e pré-codificadas. A entrevista foi realizada no serviço onde a criança ou o adolescente estava sendo tratado, seja na rotina ou resgate para os casos e para os controles no serviço de saúde onde compareceu acompanhado da mãe seja para fins de programas sociais, seja para acompanhar algum irmão com consulta médica. O questionário apresentou questões, envolvendo dados da mãe, situação vacinal, aleitamento materno, dados sobre caracterização de asma e das outras alergias, além de dados referentes ao processo de diagnóstico, para os casos e controles e ainda as características biológicas da doença, para os casos.

Nesse instrumento constam, portanto, quesitos relacionados à doença bem como dados para elaboração de diagnóstico relacionado à exposição (alergia).

Para a exposição, além da caracterização e gravidade de acordo com as diretrizes internacionais de asma, rinite alérgica, urticária e dermatite atópica, foram também avaliados tratamentos ou uso de medicamentos para controle da alergia.

Foram necessários três entrevistadores auxiliares (estudantes de medicina bolsistas de iniciação científica) e devidamente treinados e da área médica

Outros fatores como aleitamento materno, imunização e infecção prévia pelo vírus EBV e parvovírus B 19, também foram analisados como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento do agravo.

### **Estudo Piloto**

Foi realizado um treinamento com leitura do questionário e do manual de instrução e simulação de entrevistas com estudantes do curso de graduação em medicina bolsistas do PIBIC da Universidade Federal de Pernambuco e Universidade Federal da Paraíba. Em seguida, realizado um estudo piloto, com o objetivo de determinar a logística do estudo, treinar a abordagem das famílias pelos entrevistadores e, sobretudo, testar a aplicação dos questionários. Foram recrutados cinco casos e cinco controles para treinamento da aplicação de questionário com as mães.

O estudo piloto proporcionou a avaliação da equipe, sobretudo no que diz respeito à compreensão dos formulários, a execução destes e possíveis mudanças para facilitar a compreensão dos colaboradores e das mães. Conforme os resultados foram introduzidas novas alterações em tempo hábil.

A coordenação do estudo ficou sob responsabilidade do pesquisador principal, que realizava história clínica e exame físico e ficou responsável pelas reuniões sistemáticas durante o período proposto para a coleta dos dados, além de relatórios com descrição das atividades desenvolvidas, bem como dificuldades e facilidades.

### 3.6 Processamento e análise dos dados

O software Excel - 2007 foi utilizado na construção de um banco de dados para as questões contidas nos instrumentos de coleta dos dados dos casos e dos controles e as variáveis foram inventariadas quanto a categorias, valores numéricos, conforme indica os apêndices B e C. As informações contidas no banco de dados foram transferidas para o pacote estatístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) – versão 13.0. As variáveis estudadas foram mensuradas nos níveis das escalas: nominal, ordinal e intervalar. Inicialmente, efetuou-se a codificação das variáveis pertinentes, e procedeu-se a consistência dos dados para o tipo de estudo proposto. A seguir, para o levantamento do perfil sócio-demográfico dos pacientes e controles em relação às variáveis inerentes ao objeto de estudo, procedeu-se à análise estatística através da construção de tabelas de freqüências simples, medidas descritivas, cruzamentos de variáveis (tabelas de freqüências conjuntas) e figuras pertinentes.

Na sequência, e de acordo com objetivos específicos propostos de comparar as exposições entre dois grupos um de doente e um de não doentes para testar associações, foram utilizadas técnicas da estatística inferencial bivariada e multivariada, com uso do pacote estatístico SPSS-ver 13.0, tendo sido aplicados os seguintes testes estatísticos, ao nível de 5% de significância:

Teste de associação de  $\chi^2$  – Teste não-paramétrico para tabela de dupla entrada  $l \times c$ . Mede a existência ou não de associação entre duas variáveis categóricas, em particular é usado em tabela de contingência 2x2 para variáveis dicotômicas.

Teste exato de Fisher – alternativa do teste de associação de  $\chi^2$  para tabela de contingência 2x2, quando ocorre casela ou célula com freqüência esperada inferior a 5. Determina o cálculo exato da significância p-valor.

Odds Ratio (OR) – Razão de chances ou vantagens, também conhecida como a razão dos produtos cruzados numa tabela de contingência 2x2 OR (IC 95%). Calculada a partir do Teste de associação de qui-quadrado ou da Regressão logística binária, dependendo da categorização da variável.

Regressão Logística Binária – cuja variável dependente Y é dada por uma variável categórica dicotômica, contendo apenas uma variável independente no modelo não ajustado, considerando significativo o valor  $p < 0,20$ .

Regressão Logística Múltipla – cuja variável dependente Y é dada por uma variável categórica dicotômica, contendo apenas uma ou mais variáveis independentes no modelo ajustado, considerando significativo o valor  $p < 0,05$ . Para a análise de regressão logística múltipla ou hierarquizada foram selecionadas as variáveis independentes que na análise de regressão logística binária apresentaram valor de  $p < 0,20$ . Para o estabelecimento de associação ou não entre as variáveis independentes e a variável resposta no modelo de regressão logística (após ajuste) foi considerado o nível de significância estatística de 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Artigo 1: ALERGIA PRÉVIA E LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA

NUNES<sup>1</sup>, Joacilda da Conceição; SARINHO<sup>2</sup>, Emanuel Sávio Cavalcanti;

<sup>1</sup> Professora Assistente do Departamento de Pediatria e Genética da Universidade Federal da Paraíba

<sup>2</sup> Professor Associado do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de Pernambuco

Conflitos de interesse: os autores declaram não haver conflitos de interesse.

***Endereço para correspondência:***

Joacilda da Conceição Nunes

Universidade Federal da Paraíba

Departamento de Pediatria e Genética

Hospital Universitário Lauro Wanderley – 3º andar

Cidade Universitária, João Pessoa PB - Brasil

CEP: 58051-900 fone: +55 (83) 3216-7308

joacildamed@yahoo.com.br

## RESUMO

**Introdução:** a leucemia linfóide aguda (LLA) é o câncer pediátrico mais comum. Diversos fatores relacionados ao sistema imunológico podem estar associados ao risco de LLA, e dentre estes a presença de doenças alérgicas. A proposta deste estudo foi investigar uma possível associação entre alergias e níveis elevados de IgE total com a leucemia linfoide aguda na infância e adolescência.

**Método:** Trata-se de um estudo do tipo caso-controle não pareado de base hospitalar, cuja amostra foi constituída de 60 crianças e adolescentes com diagnóstico incidente de leucemia linfoide aguda *não T*, classificadas pela avaliação da medula óssea através do mielograma e imunofenotipagem e 120 controles selecionados com proporcionalidade com relação à idade e sexo a partir dos casos e oriunda dos estados de Pernambuco e Paraíba no nordeste brasileiro, entre 2008 e 2011. A coleta dos dados consistiu na aplicação de questionário estruturado para identificação de doenças alérgicas como asma, rinite alérgica, antecedente de urticária e dermatite atópica, e uso prévio de glicocorticoides, além de exame clínico e coleta de sangue para dosagem de IgE total.

**Resultados:** Para o modelo não ajustado as variáveis de exposição que apresentaram valor de  $p < 0,20$  foram a escolaridade materna ( $p = 0,005$ ), asma ( $p = 0,116$ ), rinite alérgica ( $p = 0,032$ ), dermatite atópica ( $p = 0,009$ ) e urticária ( $p = 0,011$ ), mais de uma doença alérgica ( $p = 0,086$ ) e níveis séricos de IgE elevados acima de 52 IU/mL ( $p = 0,000$ ). Após o modelo ajustado através da análise de regressão logística persiste a significância de uma relação inversa para asma quando comparados os casos com os controles apresentando  $p = 0,044$  e OR/IC 95% 0,14 (0,02 – 0,95); e para os níveis de IgE  $p = 0,001$  e OR/IC 95% 0,10 (0,02 – 0,4).

**Conclusão:** Níveis elevados de IgE total, e a história de asma, parecem promover algum papel em proteger crianças e adolescentes de LLA.

**Palavras-chaves:** Leucemia linfoide aguda. Alergia. IgE. Leucemia na infância. Função imune

## ABSTRACT

**Background:** Acute lymphoid leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer. Several factors related to the immune system, such as preceding history of allergies, may be associated with ALL.

**Objective:** To investigate a possible association between preceding history of allergy and the elevation of Total IgE, with Acute Lymphoid Leukemia in children and adolescents.

**Methods:** A hospital-based unpaired case-control study in the northeast region of Brazil. The population included 60 patients diagnosed with non-T acute lymphoid leukemia by means of bone marrow myelogram and immunophenotyping and 120 controls selected proportionally for age and gender. Data collection employed a structured questionnaire to determine prior history of allergies, as well as total IgE serum tests and clinical examinations.

**Results:** The results show that both total IgE serum levels and preceding history of asthma have a significant inverse risk association with acute lymphoid leukemia. In the unadjusted model, the exposure variables with a p-value < 0.20 were: asthma, elevated IgE levels, concomitant allergy, atopic dermatitis, allergic rhinitis and urticaria. The inverse relation to both asthma and IgE serum levels continued to be significant in the adjusted model, showing sig p-value 0.044 and OR/CI 95% of 0.14 (0.02 – 0.95); and sig p-value 0.001 and OR/CI 95% of 0.10 (0.02 – 0.41), respectively.

**Conclusion:** High levels of total IgE, especially related to asthma, appear to contribute to alterations in the immune system, play a role in protecting children and adolescents from ALL.

**Key words:** Acute Lymphoid Leukemia, allergy, IgE, childhood leukemia, immune function

## INTRODUÇÃO

A leucemia linfoide aguda (LLA) é definida como a proliferação anormal, monoclonal e progressiva de precursores linfóides na medula óssea e com disseminação para o sangue periférico e infiltração para outros órgãos como sistema nervoso, pele, testículos, baço e linfonodos. A LLA é a mais comum neoplasia maligna da infância em crianças abaixo de 15 anos, sendo responsável por 76 a 85% de todos os diagnósticos de leucemias em crianças e representa mais de 30% das neoplasias malignas da infância.<sup>1,2</sup> Estima-se que a leucemia apresente uma incidência de 3,9 a 7,0 casos/ano para cada 100.000 crianças abaixo de 15 anos, sobretudo em dados de registro dos países nórdicos. Apesar de todo sucesso no tratamento, as suas causas permanecem enigmáticas. A doença é biologicamente heterogênea e sua história natural aponta para o surgimento de um clone pré-leucêmico ainda na vida intra-uterina, muito frequentemente por alterações cromossômicas numéricas e estruturais sendo contudo necessário um segundo gatilho pós-natal para promover novos eventos epigenéticos e desencadear o crescimento desordenado dos clones de linfócitos imaturos e anormais.<sup>3,4</sup> O período de latência entre o primeiro evento epigenético até o desencadeamento da doença é bastante variável, desde poucos meses a vários anos.<sup>3</sup>

Uma multiplicidade de possíveis fatores causais têm sido propostos. Uma anormalidade da resposta imune às infecções comuns tem emergido fortemente como um plausível mecanismo etiológico da LLA.<sup>3-5</sup> Nesse sentido a hipótese da higiene talvez possa ser ampliada com uma visão de interconexão entre alergia e leucemia linfoide aguda. O presente estudo tem como proposta avaliar a associação de alergia prévia com leucemia linfoide aguda entre crianças e adolescentes em população de país emergente.

## MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle não pareado de base hospitalar, cuja casuística foi constituída de 60 crianças e adolescentes com diagnóstico incidente de leucemia linfóide aguda *não T*, classificadas pela avaliação da medula óssea através do mielograma e imunofenotipagem e 120 controles selecionados com proporcionalidade com relação à idade e sexo a partir dos casos e por crianças e adolescentes saudáveis, da mesma área geográfica dos casos e usuários do Sistema Único de Saúde e que procuraram o serviço de saúde sem queixas clínicas, por causa dos programas sociais do governo, oriunda dos estados de Pernambuco e Paraíba no Nordeste brasileiro, entre 2008 e 2011. A coleta dos dados consistiu na aplicação de questionário estruturado para identificação de alergias como asma, rinite alérgica, antecedente de urticária e dermatite atópica, uso prévio de glicocorticoides, além de exame clínico e coleta de sangue para dosagem de IgE total, após termo de consentimento livre e esclarecido.

Na caracterização de alergia, a existência de asma foi caracterizada através do diagnóstico clínico de asma, seguindo as recomendações GINA (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA); a existência de rinite alérgica foi caracterizada clinicamente por perguntas elaboradas de acordo com o diagnóstico clínico de rinite alérgica, conforme um sistema de escore clínico no qual a cada um de seis sinais/sintomas (obstrução nasal, rinorréia, espirros, prurido nasal, prurido de orofaringe e prurido ocular) foi atribuída uma pontuação de 0 a 3, de acordo com a intensidade do sinal/sintoma, porém não foi objetivo desse estudo classificar a gravidade da rinite alérgica e consideramos tendo rinite os que apresentava qualquer das classificações: Pontuação total entre 1-6 indica rinite alérgica. Ainda foram levadas em consideração as recomendações do projeto iniciativa ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) citadas por DEMOLY et al., 2003; a dermatite atópica foi caracterizada de acordo com os critérios diagnósticos descritos no guia de validação europeu de dermatite atópica (Clinical Validation and Guidelines for the SCORAD Index: Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis, 1997); a existência de urticária foi caracterizada clinicamente por perguntas elaboradas de acordo com o diagnóstico clínico de urticária, com base no guia de definição, classificação e diagnóstico de

urticária (EAACI - European Academy of Allergology and Clinical Immunology / GALEN - Global Allergy and Asthma European Network / EDF - European Dermatology Forum / WAO - World Allergy Organization, 2009);<sup>6-12</sup> Enfim, além do achado epidemiológico obtido através de questionário todas as doenças mencionadas apresentaram repercussão significativa na história do indivíduo e foi realizado exame clínico em cada individuo com história positiva de alergia

**A análise laboratorial de IgE total sérica** foi expressa por valores de referência considerados como normais de acordo com os dados do fabricante (52 UI/ml). A dosagem de IgE total foi realizada utilizando-se o método de quimiluminescência com kit IMMULITE® 2000 assay para IgE, código L2KIE6, 600 testes. Todos os sujeitos participantes no estudo fizeram uso prévio de albendazol em dose única de 400 mg duas semanas antes da coleta do sangue para redução da interferência das parasitoses e helmintíases que podem elevar IgE sobretudo em regiões com saneamento básico insuficiente, como no Nordeste brasileiro.

Além das variáveis de alergia (asma, rinite, dermatite atópica e urticária e dosagem de IgE sérica), variáveis como escolaridade materna, número de pessoas no domicílio, presença de infecção materna durante a gravidez, aleitamento materno, peso ao nascer também foram avaliadas

**Análise estatística:** o software Excel - 2007 foi utilizado na construção de um banco de dados para as questões contidas nos instrumentos de coleta dos dados. As variáveis estudadas foram mensuradas nos níveis das escalas: nominal, ordinal e intervalar e efetuou-se a codificação das variáveis pertinentes com avaliação da consistência dos dados. Foram utilizadas técnicas da estatística inferencial bivariada e multivariada, com uso do pacote estatístico SPSS-versão 13.0, tendo sido aplicados o Teste de associação de  $\chi^2$  e/ou uso de Regressão Logística Binária para o cálculo do Odds Ratio (OR) e seu IC 95% considerando os fatores de forma isolada e significativo o valor  $p < 0.20$ . Para o modelo ajustado foi utilizada a Regressão Logística Múltipla com nível de  $p$  valor  $< 0.05$ .

## RESULTADOS

A tabela I demonstra as características gerais da amostra, em que se verifica que houve um discreto predomínio do sexo masculino, a faixa etária com maior número de crianças foi entre 1 e 6 anos.

A tabela II demonstra o OR não ajustado de risco de LLA considerando-se as varáveis de controle Número de Pessoas no Domicílio para até 3 pessoas  $p = 0.96$  com OR 95% 0.98 (0.36 a 2.60); entre 4 e 7 pessoas  $p = 0.85$  e OR 95% 0.92 (0.38 a 2.25); para acima de 7 pessoas no domicílio OR 95% 1.00), Infecção Materna ausente na gravidez  $p = 0.25$  com OR 95% 0.63 (0.28 a 1.39), Peso ao Nascimento < 2.500 g OR 95% 1.00; Peso ao Nascimento > 2.500 g apresentou  $p = 0.87$  e OR 95% 0.92 (0.36 a 2.40), Aleitamento Materno e OR 95% 1.00; Aleitamento Materno não  $p = 0.83$  e OR 95% 0.94 (0.50 a 1.74). As variáveis não apresentaram significância para o modelo.

A tabela III demonstra OR no modelo não ajustado para as variáveis asma, rinite alérgica, dermatite atópica, antecedentes de urticária aguda e níveis séricos de IgE total. As principais variáveis que apresentaram significância ( $p < 0.20$ ) quando comparado os casos de LLA (Leucemia Linfóide Aguda) e os controles normais foram: *Asma* ( $p = 0.116$ ); *Rinite alérgica* ( $p = 0.032$ ); história de *Urticária* ( $p = 0.011$ ); *Dermatite atópica* ( $p = 0.086$ ); Concomitância de doenças alérgicas ( $p = 0.009$ ) e *Níveis séricos de IgE* ( $p = 0.000$ ). Estas variáveis foram consideradas na avaliação do modelo de regressão logístico multivariado. Em relação às variáveis de controle que poderiam ter alguma influencia em doenças alérgicas ou LLA, tais como peso ao nascer aleitamento materno exclusivo, número de pessoas no domicílio e não houve diferença significativa entre os grupos.

Na Tabela IV estão apresentados OR no modelo ajustado para as doenças alérgicas Asma, Rinite alérgica, antecedentes de Urticária, Dermatite atópica e concomitância de doença alérgicas níveis séricos de IgE total para a ocorrência ou não de LLA. Apenas as variáveis Asma com OR e IC de 0,14 (0,02 – 0,95) e  $p = 0,044 < 0,05$  e níveis séricos de IgE com OR e IC de 0,10 (0,02 – 0,41) e  $p = 0,001 < 0,01$  apresentaram significância após ajuste. A relação de asma e níveis séricos de IgE apresentaram-se como fator de proteção, ou risco inverso de desenvolvimento de LLA. Após o ajuste a variável rinite

alérgica não apresentou significância, provavelmente pela alta associação que a rinite alérgica apresenta com relação a asma. .<sup>13,14</sup>

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram uma relação de risco inversa entre nível sérico de IgE total, asma e leucemia linfóide aguda.

A leucemia linfóide aguda é uma doença biologicamente heterogênea que ainda não apresenta patogenia completamente estabelecida. A história natural da Leucemia Linfóide Aguda na infância aponta para o surgimento de um clone pré-leucêmico ainda na vida intra-uterina, muito freqüentemente por alterações cromossômicas numéricas e estruturais e um segundo processo de exposição pós-natal deve ser necessário para promover mudanças epigenéticas e desencadear o crescimento desordenado dos clones de linfócitos imaturos e aberrantes. Possíveis fatores precipitantes ou protetores desse segundo evento necessitam ser pesquisados sob a ótica epidemiológica, sob uma visão clínica e também a partir das observações de modelos biológicos.<sup>3</sup>

Surge então o questionamento quanto a relação existente entre leucemia linfóide aguda em crianças e história prévia de alergia.<sup>15</sup> Esse tema foi avaliado por pesquisadores do United Kingdom Childhood Cancer Study (UKCCS), em 2007. O estudo relacionou antecedentes de asma, rinite e dermatite atópica com risco de LLA. Os resultados do UKCCS evidenciaram uma redução de risco de 30% de leucemia linfóide aguda nos sujeitos com antecedentes de dermatite atópica, com OR=0,70 a um intervalo de confiança de 95% (0,51 a 0,97). Associação maior foi encontrada para os que tiveram rinite alérgica com OR=0,47; IC=95% (0,26-0,85). Esses achados sugerem fortemente que há uma relação inversa entre alergia prévia e leucemia linfóide aguda em crianças e consequentemente compatível com a hipótese de uma resposta imune desregulada teria uma estreita associação com a leucemia linfóide aguda na infância.<sup>15</sup> Achados semelhantes em relação a asma e nível de IgE total foi encontrado neste estudo de base clínica e epidemiológica.

Outras pesquisas que antecederam o UKCCS, corroboraram com essa hipótese, podendo-se destacar o estudo de caso-controle de base hospitalar de Linet *et al* em 1986, no qual os fatores de risco estudados foram rinite, eczema atópico, asma e urticária e cujos resultados foram de alta associação inversa encontrada para rinite, dermatite e urticária, com valores respectivos de OR 0,5 (0,3-1,0), 0,7(0,3-1,5), 0,7(0,3-1,5).<sup>16</sup>

Um estudo de metanálise desenvolvido por Linabery et al (2010), resumiu as evidências epidemiológicas de associação de alergia com LLA com pesquisas oriundas de 1952 a 2009 e incluiu dez estudos de caso-controle, e oito destes estudos demonstraram associação inversa entre alergia e LLA. A relação entre LLA e asma apresentou odds ratio de 0,79 (odds ratio (OR) 0,79, 95% IC: 0,61 – 1,02), a de eczema foi de 0,74 (OR 0,74, 95% IC: 0,58 – 0,96), e para rinite alérgica apresentou odds ratio de 0,55 (OR 0,55, 95% IC: 0,46- 0,66).<sup>17</sup>

Wang & Diepgen (2005) realizaram um grande estudo de revisão a cerca da relação entre câncer e alergia. Nesse estudo as neoplasias com maior relação de risco inverso foram as leucemias linfóides agudas nas crianças e os tumores cerebrais.<sup>18</sup> A nossa pesquisa de forma semelhante encontra resultados concordantes, quando considera o modelo não ajustado, uma vez que as variáveis das doenças alérgicas encontram-se freqüentemente associadas em um mesmo indivíduo, pois alergia é doença sistêmica com manifestações em vários órgãos alvos. Essa importante ligação deve ser mais explorada e de fato, é possível que o indivíduo com doença alérgica em uma visão mais abrangente, frente às agressões ambientais do mundo moderno seja na verdade um indivíduo cuja hiper-reactividade imune possa servir de alerta e prevenção para LLA que é uma doença potencialmente letal.

Assim, temos aqui uma ampliação da hipótese da higiene, em que a ausência de processos infecciosos, apesar de induzir um desvio imune Th2 para hiperprodução de IgE e asma, teria um efeito protetor no que se refere ao desenvolvimento de LLA.

A hipótese da vigilância imune afirma que o sistema imunológico reconhece抗ígenos de células malignas como estranhas e monta uma resposta frente aos mesmos, impedindo que uma boa parte dos cânceres potenciais se desenvolva a partir de uma predisposição.<sup>19</sup> A presença de uma condição atópica poderia aumentar a vigilância do sistema imune monitorando, identificando e eliminando células malignas.<sup>3, 20</sup> Em apoio a esta hipótese existe a observação de que pessoas imunocomprometidas têm um risco aumentado de linfoma não-Hodgkin uma malignidade com a histologia idêntica à de células da leucemia linfóide aguda.<sup>21</sup>

Embora nenhum mecanismo biológico tenha ainda sido estabelecido, o principal fator que liga a leucemia linfóide aguda e a doença atópica talvez seja o processo dinâmico no qual o sistema imunológico amadurece e responde aos estímulos ao longo da infância. As hipóteses levantadas por Greaves e Kinlen, sugerem um papel

etiológico para o sistema imune no desenvolvimento da leucemia na infância através da teoria da exposição tardia e de uma resposta anômala às infecções na vida precoce; já que nenhum vírus responsável ou outro agente infeccioso tem sido realmente identificado até à data atual.<sup>22,23,24,25,26</sup>

Kinlen (1988) levanta a hipótese de que o aumento do número de casos de leucemia, em certos agrupamentos populacionais, deve-se à mobilidade e mistura populacional. E como resultado dessa mistura surgiria novos agentes infecciosos em indivíduos previamente não expostos ou susceptíveis, que poderiam promover eventos imunológicos e resultar em transformação maligna, após estas infecções. Greaves (1989) propôs um modelo hipotético de que a presença de infecção induziria a resposta imune celular mediada por linfócitos T que por sua vez produziria citocinas que suprimiriam a hematopoiése normal e/ ou induziria à apoptose e neste contexto o clone pré-leucêmico pré-existente poderia ganhar uma vantagem proliferativa..<sup>3,23</sup> Contrariamente segundo outro modelo proposto por Schmiegelow (2008), as infecções poderiam induzir a mudanças qualitativas e quantitativas no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que resultaria em níveis séricos exacerbados de cortisol. Esta hiperfunção da adrenal poderia eliminar clones pré-leucêmicos, neste sentido o estímulo crônico da glândula adrenal resultante de crises de asma e de uso freqüente de esteróides nesses pacientes poderia de alguma forma ter um efeito benéfico em prevenir o segundo processo desencadeante de LLA em indivíduos pré-dispostos.<sup>28</sup>

Considerando essas interações entre a hipótese da higiene, que valoriza a redução de doenças infecciosas como um possível fator explicativo para o aumento da prevalência das alergias e avaliando as hipóteses de Kinlen, Greaves e Schmiegelow em relação ao papel das infecções na gênese da LLA, é possível que exista um racional biológico que ligue a história prévia de alergia com alguma possível proteção para LLA. Assim, uma inadequada modulação da resposta imune parece encontrar-se envolvida em ambas as doenças.<sup>3,23,29,30,31,32,33</sup>

O predomínio de células T helper 2 (Th2) versus as células T helper 1 (Th1), é muitas vezes descrito quando se aborda a patogênese das atopias onde cada tipo de célula tem um perfil de citocinas específico.<sup>33</sup> Os bebês nascem com uma predominância do perfil Th2 imunológico; crianças não atópicas gradualmente migram para um processo de Th1-dominante em torno dos dois anos de idade, enquanto que crianças com histórico familiar de atopia não conseguem fazer a transição de Th2 para

Th1 tão facilmente e especialmente frente a um ambiente insento de pequenos estímulos.<sup>33,34,35</sup> A exposição precoce aos vários agentes, em especial aos infecciosos é avaliado como fundamental para estimular esta transição. Dois tipos adicionais de células T, linfócito T-regulatório e Th17, também podem desempenhar algum papel nesta complexa interação entre atopia, infecções, e doenças auto-imunes.<sup>36,37</sup>

O nosso estudo foi de base epidemiológica, onde a caracterização da exposição nos casos e controles foi feita de forma mais acurada, sob o aspecto clínico. Os resultados encontrados da asma e nível elevado de IgE total como tendo relação de proteção para LLA são relevantes do ponto de vista epidemiológico, uma vez que essa população estudada apresenta características ambientais, biológicas e sócio econômicas bem distintas de estudos anteriores com grande importância sobre o tema.

A maior parte dos estudos envolvendo alergia e leucemias, de maneira geral, são estudos de caso controle, os quais apresentam a limitação de temporalidade entre a exposição e o surgimento do agravo. Sendo portanto, necessários desenhos biológicos a serem estruturados utilizando-se diferentes populações, em função das variações epigenéticas e que possam ampliar a aproximação com a etiologia das leucemias linfóides na faixa pediátrica.

## REFERÊNCIAS

1. Stiller CA. Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene*. 2004; **23**:6429-6444,
2. Stewart A, Webb J, Hewitt D. A survey of childhood malignancies. *BMJ*. 1958; **1**:1495-508.
3. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature reviews cancer*. 2006; **6**:193-203.
4. Ahlbom A, Day N, Feychtig M, Roman E, Skinner J, Dockerty J, et al. Pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer*. 2000; **83**, 692-8.
5. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, et al. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. 2003; **102**(7): 2321–2333.
6. Wilson AM, Dempsey OJ, Sims EJ, Lipworth BJ. A comparison of topical budesonide and oral montelukast in seasonal allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy*. 2001; **31**(4):616-24
7. Global Initiative for Asthma (GINA), National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Global Strategy for asthma management and prevention. Bethesda (MD), 2006, p. 339
8. Demoly P, Allaert FA, Lecasble M, Bousquet J. PRAGMA validation of the classification of ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma). *Allergy*. 2003; **58**(7):672-5.
9. Kunz B , Oranje AP, Labrèze, Stalder JF, Ring J, Taïeb A. Clinical Validation and Guidelines for the SCORAD Index: Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*. 1997; **195**:10-19.
10. Société Française de Dermatologie. Consensus Conference Management of chronic urticaria. *Eur J Dermatol*. 2003; **13**:385-92.
11. Grattan C, Powell S, Humphreys F. Management and diagnostic guidelines for urticaria and angio-edema. *Br J Dermatol*. 2001; **144**:708-14.

12. The EAACI / GALEN / EDF / WAO guideline: definition, classification and diagnosis of urticaria. *Allergy*. 2009; **64** Issue 10:1417 – 1426.
13. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 1998;351(9111):1225-32.
14. Dykewicz MS, Fineman S, Skoner DP, Nicklas R, Lee R, Blessing-Moore J, et al. Diagnosis and management of rhinitis: complete guidelines of the Joint Task Force on Practice Parameters in Allergy, Asthma and Immunology. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998; **81**(5 Pt 2):478-518.
15. Hughes, AM; Lightfoot T; Simpson J et al on behalf of the United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. Allergy and risk of childhood leukaemia: Results from the UKCCS. *Int. J. Cancer*. 2007; **121**:819–824
16. Linet MS, McCaffrey LD, Humphrey RL, Brookmeyer R, Van Natta ML, Tielsch JM et al. Chronic lymphocytic leukemia and acquired disorders affecting the immune system: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 1986; **77**:371-16
17. Linabery AM, Jurek AM, Duval S, and Ross JA. The Association Between Atopy and Childhood/Adolescent Leukemia: A Meta Analysis. *Am J Epidemiol*. 2010; **171**:749–764.
18. Wang H, Diepgen TL. Is atopy a protective or a risk factor for cancer? A review of epidemiological studies. *Allergy*. 2005; **60**: 1098–1111
19. Markiewicz MA, Gajewski TF. The immune system as antitumor sentinel: molecular requirements for an anti-tumor immune response. *Crit Rev Oncog*. 1999; **10**(3):247–260. 20.
20. Turner MC, Chen Y, Krewski D, et al. An overview of the association between allergy and cancer. *Int J Cancer*. 2006; **118**(12):3124–3132.
21. Kersey JH, Shapiro RS, Filipovich AH. Relationship of immunodeficiency to lymphoid malignancy. *Pediatr Infect Dis J*. 1988; **7**(5 suppl):S10–S12).
22. Greaves MF. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1988; **2**(2):120–125.
23. Kinlen L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet*. 1988; **2**(8624):1323–1327

24. MacKenzie J, Greaves MF, Eden TO, et al. The putative role of transforming viruses in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2006; **91**(2):240–243.
25. Vasconcelos GM, Kang M, Pombo-de-Oliveira MS, et al. Adenovirus detection in Guthrie cards from paediatric leukaemia cases and controls. *Br J Cancer*. 2008; **99**(10):1668–1672.
26. Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer* 1999; **35**:173-185.
27. Kinlen LJ, O'Brien F, Clarke K, Balkwill A, Matthews F. Rural population mixing and childhood leukaemia: effects of the North Sea oil industry in Scotland, including the area near Dounreay nuclear site. *BMJ*. 1993; **306**:743-748.
28. Schmiegelow K, Vestergaard T, Nielsen SM and Hjalgrim H. Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: the adrenal hypothesis. *Leukemia* (2008) **22**, 2137–2141.
29. Kinlen LJ, Balkwill A. Infective cause of childhood leukaemia and wartime population mixing in Orkney and Shetland, UK. *Lancet*;2001;**357**:858.
30. Kinlen LJ and Petridou E. Childhood leukaemia and rural population mixing: Greece, Italy and other countries. *Cancer Causes and Control*. 1995; **6**: 445 -450.
31. Kinlen LJ, Dickson M, Stiller CA. Childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma near large rural construction sites, with a comparison with Sellafield nuclear site. *BMJ*. 1995; **301**:763-768.
32. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ*. 1989; **299** (6710):1259-60.
33. Robinson DS. The Th1 and Th2 concept in atopic allergic disease. *Chem Immunol*. 2000; **78**:50–61.
34. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, et al. Reciprocal age-related patterns of allergen-specific T-cell immunity in normal vs. atopic infants. *Clin Exp Allergy*. 1998; **28**(suppl 5): 39–44.
35. Chang JS, Wiemels JL, Buffler PA. Allergies and childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2009; **42**(2):99–104.

36. Rudant J, Orsi L, Menegaux F, Petit A, Baruchel A, Bertrand Y, Lambilliotte A, Robert A, Michel G, Margueritte G, Tandonnet J, Mechinaud F, Bordigoni P, Hémon D, and Clave J. Childhood Acute Leukemia, Early Common Infections, and Allergy: The ESCALE Study. *Am. J. Epidemiol.* 2010; **172**(9):1015-1027
37. Magalhães IQ, Pombo-De-Oliveira MSP, Bennett CA et al. TELAML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. *Br J Haematol* 2000; **111**:204-207.
38. Chan LC, Lam TH, Li CK et al. Is the timing of exposure to infection a major determinant of acute lymphoblastic leukaemia in Hon Kong? *Pediatric and Perinatal Epidemiology*. 2002; **16**:154-165.

**TABELA I-** Distribuição da amostra quanto ao gênero e idade das crianças e adolescentes n=180

<b>PERFIL</b>	<b>GRUPO</b>				<b>Total</b>	
	<b>Caso (LLA)</b>		<b>Controle (S/Doença)</b>			
	n	%	n	%	n	%
<b>SEXO</b>						
Feminino	26	43.3	52	43.3	78	43.3
Masculino	34	56.7	68	56.7	102	56.7
<b>FAIXA ETÁRIA</b>						
1 a < 7 anos	35	58.3	70	58.3	105	58.3
7 a < 12 anos	14	23.3	28	23.3	42	23.3
12 a 18 anos	11	18.3	22	18.3	33	18.3
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>100</b>	<b>180</b>	<b>100</b>

**TABELA II**– OR não ajustado do risco de LLA considerando-se o número de pessoas no domicílio, infecções materna, peso ao nascer e aleitamento materno.

Variável	Total	Grupo de estudo		Teste de $\chi^2$ ou Regressão		<i>Sig. p-valor</i>	OR (IC. 95%)		
		Caso		Controle					
		n	%	n	%				
<b>Pessoas p/domicílio<sup>b</sup></b>									
Até 3 pessoas	52	100	17	33	35	67	p = 0.96	0.98 (0.36 a 2.60)	
Entre 4 e 7 pessoas	100	100	34	34	66	66	p = 0.85	0.92 (0.38 a 2.25)	
Entre 7 e 10 pessoas	28	100	9	32	19	68	-	1.00	
<b>Infecções na gestação<sup>a</sup></b>									
Sim	39	100	10	26	29	74	-	1.00	
Não	141	100	50	36	91	64	p = 0.25	0.63 (0.28 a 1.39)	
<b>Peso ao nascer-filho<sup>a</sup></b>									
< 2.500 gramas	22	100	7	32	15	68	-	1.00	
≥ 2.500 gramas	158	100	53	34	105	66	p = 0.87	0.92 (0.36 a 2.40)	
<b>Aleitamento materno<sup>a</sup></b>									
Sim	80	100	26	32	54	68	-	1.00	
Não	100	100	34	34	66	66	p = 0.83	0.94 (0.50 a 1.4)	
<b>Grupo Total</b>	<b>180</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>33</b>	<b>120</b>	<b>67</b>	-	-	

<sup>a</sup> Teste de associação de Qui-quadrado.

<sup>b</sup> Regressão logística binária (variável com mais de 2 categorias).

**TABELA III** – OR não-ajustado para o risco de LLA (Leucemia Linfóide Aguda) em indivíduos expostos segundo os tipos de alergias e níveis séricos de IgE.

Variável	Total	Grupo de estudo				Teste de $\chi^2$ ou Regressão		
		Caso (LLA)		Controle		Logística Binária		
	n	%	n	%	n	%	Sig. p-valor	OR (IC. 95%)
<b>Asma<sup>a</sup></b>								
Sim	46	100	11	24	35	76	-	1.00
Não	134	100	49	37	85	63	p < 0.20	0.54 (0.25 a 1.17)
<b>Rinite alérgica<sup>a</sup></b>								
Sim	48	100	10	21	38	79	-	1.00
Não	132	100	50	38	82	62	p < 0.05	0.43 (0.20 a 0.94)
<b>Antecedentes de Urticária<sup>a</sup></b>								
Sim	26	100	3	12	23	88	-	1.00
Não	154	100	57	37	97	63	p < 0.05	0.22 (0.06 a 0.77)
<b>Dermatite atópica<sup>a</sup></b>								
Sim	15	100	2	13	13	87	-	1.00
Não	165	100	58	35	107	65	p < 0.20	0.28 (0.06 a 1.30)
<b>Mais de uma alergia<sup>a</sup></b>								
Sim	49	100	9	18	40	82	-	1.00
Não	131	100	51	39	80	61	p < 0.01	0.35 (0.16 a 0.79)
<b>Níveis séricos IgE<sup>a</sup></b>								
Não-exp (IgE < 52)	99	100	48	48	51	52	-	1,00
Exposto (IgE ≥ 52)	81	100	12	15	69	85	p < 0.001	5.41 (2.61 a 11.22)
<b>Grupo Total</b>	<b>180</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>33</b>	<b>120</b>	<b>67</b>	-	-

<sup>a</sup> Teste de associação de Qui-quadrado.

<sup>b</sup> Regressão logística binária (variável com mais de 2 categorias).

**TABELA IV** – OR ajustado para o risco de LLA (Leucemia Linfóide Aguda) em indivíduos expostos segundo os tipos de alergias e níveis séricos de IgE.

Variável	Grupo				<i>Razão de chance Ajustada</i>	<i>Reg. Log. Múltipla Significância P-valor</i>		
	<i>Caso (LLA)</i>		<i>Controle (S/Doença)</i>					
	n	%	n	%				
• <b>Asma</b>								
Não	49	37	85	63	-			
Sim	11	24	35	76	0.14 (0.02 a 0.95)	P < 0.05		
• <b>Níveis séricos IgE</b>								
Não-exp (IgE < 52)	48	48	51	52	-			
Exposto (IgE ≥ 52)	12	15	69	85	0.10 (0.02 a 0.41)	P < 0.01		
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>33</b>	<b>120</b>	<b>67</b>	-	-		
• <b>Rinite alérgica</b>								
Não	50	38	82	62	-			
Sim	10	21	38	79	0.61 (0.09 a 4.08)	P = 0.61		
• <b>Antecedentes de Urticária</b>								
Não	57	37	97	63	-			
Sim	3	12	23	88	0.77 (0.16 a 3.67)	P = 0.74		
• <b>Dermatite atópica</b>								
Não	58	35	107	65	-			
Sim	2	13	13	87	0.54 (0.08 a 3.47)	P = 0.52		
• <b>Mais de uma alergia</b>								
Não	51	39	80	61	-			
Sim	9	18	40	82	0.19 (0.02 a 2.20)	P = 0.18		
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>33</b>	<b>120</b>	<b>67</b>	-	-		

## TITLE PAGE

Original Article

**Preceding History of Allergy and Acute Lymphoid Leukemia in Childhood and Adolescence**

Joacilda da Conceição Nunes, MD,<sup>a</sup> and Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho, MD<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Assistant Professor, Department of Genetics and Pediatrics, Universidade Federal da Paraíba

<sup>b</sup> Associate Professor, Department of Pediatrics, Universidade Federal de Pernambuco

**Corresponding author**

Joacilda da Conceição Nunes, MD

Universidade Federal da Paraíba

Departamento de Pediatria e Genética

Hospital Universitário Lauro Wanderley – 3º andar

João Pessoa, PB 58051-900 Brasil

Telephone: +55 (83) 3216-7308

Fax: +55 (83) 3221-6611

E-mail: [joacildamed@yahoo.com.br](mailto:joacildamed@yahoo.com.br)

Declaration of all sources of funding:

The authors have no funding relationship to declare.

Word count: 2536

## Abstract

**Background:** Acute lymphoid leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer. Several factors related to the immune system, such as preceding history of allergies, may be associated with ALL.

**Objective:** To investigate a possible association between preceding history of allergy and the elevation of Total IgE, with Acute Lymphoid Leukemia in children and adolescents.

**Methods:** A hospital-based unpaired case-control study in the northeast region of Brazil. The population included 60 patients diagnosed with non-T acute lymphoid leukemia by means of bone marrow myelogram and immunophenotyping and 120 controls selected proportionally for age and gender. Data collection employed a structured questionnaire to determine prior history of allergies, as well as total IgE serum tests and clinical examinations.

**Results:** The results show that both total IgE serum levels and preceding history of asthma have a significant inverse risk association with acute lymphoid leukemia. In the unadjusted model, the exposure variables with a p-value < 0.20 were: asthma, elevated IgE levels, concomitant allergy, atopic dermatitis, allergic rhinitis and urticaria. The inverse relation to both asthma and IgE serum levels continued to be significant in the adjusted model, showing sig p-value 0.044 and OR (CI 95%) of 0.14 (0.02 – 0.95); and p-value 0.001 and OR (CI 95%) of 0.10 (0.02 – 0.41), respectively.

**Conclusion:** High levels of total IgE, especially related to asthma, appear to contribute to alterations in the immune system, which may activate Th2-mediated pathways and play a role in protecting children and adolescents from ALL.

## **Clinical Implications**

The diagnosis of preceding history of allergies in children points to a protection factor for Acute Lymphoid Leukemia

## **Capsule Summary**

Our study on the association between preceding allergy and childhood Acute Lymphoid Leukemia, augments recent findings with a sample population from the northeast of Brazil, a region with distinct epidemiological characteristics from previous studies.

## **Key words**

Acute Lymphoid Leukemia, allergy, IgE, childhood leukemia, immune function

## **Abbreviations used**

ALL: Acute Lymphoid Leukemia

IgE: Immunoglobulin E

OR: Odds Ratio

CI: Confidence Interval

## INTRODUCTION

Acute lymphoid leukemia (ALL) is defined as the abnormal, monoclonal and progressive proliferation of the lymphoid precursors in bone marrow, with dissemination to the peripheral blood and infiltration to other organs such as the nervous system, skin, testes, spleen and lymph nodes. ALL is the most common childhood malignant neoplasia in children under age 15, accounting for 76% to 85% of all leukemia diagnoses in children and representing more than 30% of all malignant neoplasias in childhood, as noted by Stiller<sup>1</sup> and Stewart and Web et al.<sup>2</sup> It is estimated that the annual incidence of leukemia is between 3.9 and 7.0 cases per 100,000 children under age 15, especially in registered data from Nordic countries. Despite treatment successes, the cause of ALL remains unknown. The disease is biologically heterogeneous and its natural history points to the emergence of an intrauterine pre-leukemic clone, primarily by numerical and structural chromosomal alterations. However a second, post-natal trigger is required to provoke new epigenetic events and unleash a disorderly growth of immature and abnormal lymph clones, as noted by Greaves<sup>3</sup> and Ahlbom and Day et al.<sup>4</sup> The latent period between the first epigenetic event and the emergence of the disease is quite variable, ranging from a few months to many years.<sup>3</sup>

A multitude of possible causal factors for ALL have been proposed. “An abnormal immune response to common infections has emerged as a plausible etiological mechanism,” as noted by Greaves<sup>3</sup>, Albom and Day et al.<sup>4</sup> and Greaves and Maia et al.<sup>5</sup> Our study evaluates the association between preceding history of allergy and acute lymphoid leukemia among children and adolescents in the population of the northeast

region of Brazil. The objective is to investigate a possible association of either risk or protection between the variables or factors studied and the development of the disease.

## METHODS

We conducted a hospital-based unpaired case-control study with a total study population of 180 children and adolescents from the states of Pernambuco and Paraíba in northeast region of Brazil, from 2008 to 2011. Participants were selected among individuals diagnosed with the disease (**cases**) and among those who were not (**controls**), with similar social conditions and environmental exposures.

### **Definition of cases and controls**

The case group was composed of 60 children and adolescents with incident diagnosis of non-T acute lymphoid leukemia, which was classified by means of bone marrow myelogram and immunophenotyping. Controls were selected proportionally for age and gender, relative to the cases. The control group was composed of 120 healthy children and adolescents selected from the same geographic area as the cases and were identified from within Brazil's national public health system (Sistema Único de Saúde – SUS).

### **Inclusion and Exclusion Criteria**

Initially, 80 potential ALL cases were identified, however 20 patients were excluded based on the following criteria: conflicting diagnosis of non-T ALL (5), death before blood collection (7), did not meet the laboratory criteria (8). In the control group, 130 potential participants were originally identified; however 10 participants were eliminated because of incomplete data sets.

### **Data collection**

After written informed-consent, data were collected through a structured clinical questionnaire, individual clinical examinations and the collection of blood samples for

laboratory tests. In the characterization of allergies in the questionnaire, the existence of preceding history of asthma was established through clinical diagnosis, following the GINA (Global Initiative for Asthma) recommendations.<sup>7</sup> Similarly, a history of allergic rhinitis was characterized through the use of a scoring system in which an intensity score from 0 to 3 was applied for each of six signs/symptoms (nasal congestion, rhinorrhea, sneezing, nasal itching, oropharyngeal itching and ocular itching). However, as it was not the purpose of the current study to classify the severity of allergic rhinitis, we considered an indication of “history of allergic rhinitis” those with a total score between 1 and 6 (indicating mild allergic rhinitis). The ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) initiative recommendations, as described by Demoly and Alleart et al,<sup>8</sup> were also taken into consideration. History of atopic dermatitis was characterized in accordance with diagnosis criteria defined in the Clinical Validation and Guidelines for the SCORAD Index: Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis, as described by Kunz and Oranje et al.<sup>9</sup> And finally, the history of urticaria was clinically characterized through questions designed according to the definition, classification and diagnosis of urticaria guidelines (EAACI - European Academy of Allergology and Clinical Immunology/GALEN - Global Allergy and Asthma European Network / EDF - European Dermatology Forum/ WAO - World Allergy Organization, 2009).<sup>10-12</sup>

Laboratory analysis of serum levels of Immunoglobulin type E (IgE) were measured using the IMMULITE® 2000 (L2KIE6) test kit, a solid phase, chemiluminescent immunometric assay. Values < 52 UI/ml were considered normal according to the reference values provided by the manufacturer. Since basic sanitation problems are common in the northeast region of Brazil and parasitosis and helminthiasis can elevate IgE levels, study

subjects were given a single 400mg dose of albendazole two weeks prior to blood collection.

In addition to the allergy variables (asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis and urticaria and IgE serum measurement), the following data were gathered and evaluated: number of household members, mother's infections during pregnancy, birth weight and breastfeeding.

### **Statistical Analysis**

The compiled data was organized using Excel - 2007. The studied variables were measured as appropriate using nominal, ordinal or interval scale and the encoding of the relevant variables were evaluated for consistency. Statistical analysis of the data was done with SPSS, version 13.0. Bivariate and multivariate inferential statistical techniques were used. The  $\chi^2$  Association Test and/or Binary Logistic Regression were used for calculating the Odds Ratio (OR) and the 95% Confidence Interval (CI). P-values < 0.20 were considered significant for simple regressions. For the adjusted model, Multiple Logistic Regression with p-value < 0.05 was used.

## RESULTS

The results show that both *total IgE serum levels* and *preceding history of asthma* have a significant inverse risk association with acute lymphoid leukemia.

Table I shows the general characteristics of the sample, indicating a slight predominance of male subjects. The 1 to 6 age group had the greatest number of participants.

Table II shows Odds Ratio (95% CI) values from the unadjusted model for the following control variables: Up to 3 household members p = 0.96 OR 0.98 (0.36 – 2.60); Between 4 and 7 household members p = 0.85 OR 0.92 (0.38 – 2.25); More than 7 household members OR 1.00; No Maternal Infection during Pregnancy p = 0.25 OR 0.63 (0.28 – 1.39); Birth Weight < 2.500g OR = 1.00; Birth weight > 2.500g p = 0.87 OR 0.92 (0.36 – 2.40) ; Not Breastfed p = 0.83 e OR 0.94 (0.50 – 1.74). No significance was found in these control variables.

Table III shows OR values from the unadjusted model for the following variables: asthma, allergic rhinitis, urticaria, atopic dermatitis, more than one allergy and total IgE serum levels. The variables with level of significance p < 0.20, when comparing ALL cases and controls, were: *asthma* (p = 0.116); *allergic rhinitis* (p = 0.032); *urticaria* (p = 0.011); *atopic dermatitis* (p = 0.086); *concomitant allergies* (p = 0.009) and *IgE serum levels* (p = 0.000).

Table IV shows OR (95% CI) values from the model adjusted for preceding history of allergic diseases (asthma, allergic rhinitis, urticaria history, atopic dermatitis and

concomitant allergies), for the total IgE serum levels and for the presence or absence of ALL. Only the variables *asthma*, with OR 0.14 (0.02 – 0.95) and  $p = 0.044 < 0.05$  and *IgE serum levels* with OR 0.10 (0.02 – 0.41) and  $p = 0.001 < 0.01$  showed statistically significant results. The relation between both asthma and IgE serum level to ALL indicate a protective effect, or an inverse risk, to the development of ALL. After adjustment, the variable *allergic rhinitis* did not show significance, likely due to the strong association between allergic rhinitis and asthma.

## DISCUSSION

Acute lymphoid leukemia is a biologically heterogeneous disease without a well established pathogenesis. The natural history of pediatric acute lymphoid leukemia points to the emergence of an intrauterine pre-leukemic clone, primarily by numerical and structural chromosomal alterations. A second post-natal exposure is necessary to promote epigenetic changes and to initiate a disorderly growth of immature and aberrant lymph clones. However, further research is needed to establish possible precipitating or protective factors during that second event, from an epidemiological perspective, from a clinical point of view and also from the biological model perspective, as noted by Greaves.<sup>3</sup>

This then raises the question of the existence of a relation between acute lymphoid leukemia in children and preceding history of allergy, as noted by Hughes and Lightfoot et al.<sup>15</sup> This topic was analyzed by the United Kingdom Childhood Cancer Study (UKCCS) researchers, in 2007. The study related preceding history of asthma, rhinitis and atopic dermatitis with the risk of ALL. The UKCCS results showed a 30% risk reduction for acute lymphoid leukemia in subjects with history of atopic dermatitis, with OR (CI 95%) 0.70 (0.51 – 0.97). A greater association was found for those who had allergic rhinitis with OR (CI 95%) 0.47 (0.26 – 0.85). These findings strongly suggest that there is an inverse relation between preceding history of allergy and acute lymphoid leukemia in children, and consequently, it is compatible with the hypothesis that an unregulated immune response would have a close association with acute lymphoid leukemia in childhood.<sup>15</sup> Similar findings regarding asthma and total IgE level were detected in our study.

Other research which preceded the UKCCS supported this hypothesis. Standing out among this work was a hospital-based case-control study by Linet and McCaffrey et al, in 1986, in which rhinitis, atopic eczema, asthma and urticaria were analyzed as risk factors, yielding results with a high inverse association detected for rhinitis, dermatitis and urticaria, with the respective OR (CI 95%) values of 0.5 (0.3 – 1.0), 0.7(0.3 – 1.5), 0.7(0.3 – 1.5).<sup>16</sup>

A meta-analysis study developed by Linabery and Jurek et al, in 2010, summarized the epidemiological evidence of an association between ALL and allergy in published research from 1952 to 2009. That research included ten case-control studies, eight of which showed an inverse association between allergy and ALL. The relation between ALL and asthma presented an OR (CI 95%) of 0.79 (0.61 – 1.02), for eczema a value of 0.74 (0.58 – 0.96), and for allergic rhinitis the OR was 0.55 (0.46 – 0.66).<sup>17</sup>

Wang & Diepgen, 2005, conducted a large review study on the association between cancer and allergy. In the study, the neoplasias with greatest inverse risk relation were acute lymphoid leukemia in children and brain tumors.<sup>18</sup> Our research supports those findings when considering the unadjusted model results. This is to be expected, because multiple allergic disease variables are frequently present in the same subject, since allergy is a systemic disease with manifestations in various target organs. This connection is important and should be explored. It is quite possible that an individual diagnosed with allergic disease has, in fact, an immune hyperreactivity that can serve as an alert and as prevention for ALL, a potentially lethal disease.

Thus, we have an expansion of the hygiene hypothesis in which the absence of infectious processes, despite inducing a Th2 immune deviation towards IgE overproduction and asthma, would have a protective effect with respect to the development of ALL.

The immune surveillance hypothesis states that the immune system recognizes antigens of malignant cells as foreign bodies and creates a response to them, preventing the development of many cancers, as noted by Markiewicz and Gajewski.<sup>19</sup> The presence of an atopic condition could increase the immune system's surveillance by monitoring, identifying and eliminating malignant cells, as noted by Turner and Chen et al.<sup>20</sup> In support of this hypothesis, Kersey and Shapiro et al observe that immunocompromised persons have a high risk of developing non-Hodgkin lymphoma, a malignancy with histology identical to acute lymphoid leukemia.<sup>21</sup>

Although no biological mechanism has been established, the main factor linking acute lymphoid leukemia and atopic disease is perhaps a dynamic process in which the immune system matures and responds to stimuli during childhood. The hypotheses raised by Greaves and Kinlen suggest an etiologic role of the immune system in the development of leukemia in childhood through delayed exposure and anomalous response to infections in early life, since no virus or infectious agents have been specifically identified as responsible, so far.<sup>22,23,24,25,26</sup>

Kinlen (1988) proposed that the increase in cases of leukemia, in certain population groups, is due to population mobility and mixture, resulting in the emergence of new infectious agents in individuals not previously exposed or susceptible, triggering

immunological events and causing transformations after these infections.<sup>23</sup> Greaves proposed a hypothetical model in which the presence of infection would induce a cellular immune response mediated by T-lymphocytes which in turn would produce cytokines that would suppress normal hematopoiesis and/or induce apoptosis. In this context, the preexistent pre-leukemic clone could gain a proliferative advantage. On the other hand, according to another model, proposed by Schmiegelow (2008), infections could induce qualitative and quantitative changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis which could result in exacerbated cortisol serum levels. This adrenal hyperfunction could eliminate pre-leukemic clones. In this sense, the chronic stimulus of the adrenal gland resulting from asthma crises and frequent steroid use in these patients could in some way have a beneficial effect in preventing a second triggering process of ALL in predisposed individuals.<sup>28</sup>

Considering the hygiene hypothesis, which emphasizes the reduction of infectious diseases as a possible explanatory factor to the increase in the prevalence of allergies and evaluating the hypotheses of Kinlen, Greaves and Schmiegelow relative to the role of infections in the genesis of ALL, it is possible that a biological rationale exists linking preceding history of allergy as a protective factor for ALL. Thus, an inadequate modulation of the immune response seems to be involved in both diseases.<sup>3,23,29,30,31,32,33</sup>

The predominance of T-helper 2 (Th2) cells versus T- helper 1 (Th1) is often described in the approach to pathogenesis of atopy in which each type of cell has a specific cytokine profile.<sup>33</sup> Babies are born with a predominance of immune Th2 profile; non-atopic children gradually migrate to a Th1-dominant process around the age of two. In children with family history of atopy the transition from Th2 to Th1 is not as easy,

especially in an environment free of small stimuli.<sup>33,34,35</sup> Early exposure to various agents, especially to infectious agents, is considered fundamental to stimulate this transition. Two additional types of T-cells -- regulatory T-lymphocytes and Th17-- may also perform some role in this complex interaction between atopy, infections and autoimmune diseases.<sup>36,37</sup>

Even though our study employed an epidemiological approach, the characterization of exposure in cases and controls was made more accurate through clinical examination of the study subjects. Our finding, of a protective effect of preceding history of asthma and elevated total IgE, relative to ALL, is relevant from an epidemiological perspective, since our study population has environmental, biological and socioeconomic characteristics that are distinct from previous studies on the theme.

Most studies involving allergy and leukemia are necessarily case-control studies, because the time span between exposure and onset of disease is large. Because of this limitation, it is important to have studies structured using different populations so that epigenetic variations are captured and the etiology of lymphoid leukemia in pediatric patients can better be characterized.

## References

39. Stiller CA. Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene*. 2004; **23**:6429-6444.
40. Stewart A, Webb J, Hewitt D. A survey of childhood malignancies. *BMJ*. 1958; **1**:1495-508.
41. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature reviews cancer*. 2006; **6**:193-203.
42. Ahlbom A, Day N, Feychtig M, Roman E, Skinner J, Dockerty J, et al. Pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer*. 2000; **83**, 692-8.
43. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, et al. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. 2003; **102**(7): 2321–2333.
44. Wilson AM, Dempsey OJ, Sims EJ, Lipworth BJ. A comparison of topical budesonide and oral montelukast in seasonal allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy*. 2001; **31**(4):616-24
45. Global Initiative for Asthma (GINA), National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Global Strategy for asthma management and prevention. Bethesda (MD), 2006, p. 339
46. Demoly P, Allaert FA, Lecasble M, Bousquet J. PRAGMA validation of the classification of ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma). *Allergy*. 2003; **58**(7):672-5.
47. Kunz B , Oranje AP, Labrèze, Stalder JF, Ring J, Taïeb A. Clinical Validation and Guidelines for the SCORAD Index: Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*. 1997; **195**:10-19.
48. Société Française de Dermatologie. Consensus Conference Management of chronic urticaria. *Eur J Dermatol*. 2003; **13**:385-92.

49. Grattan C, Powell S, Humphreys F. Management and diagnostic guidelines for urticaria and angio-edema. *Br J Dermatol.* 2001; **144**:708-14.
50. The EAACI / GALEN / EDF / WAO guideline: definition, classification and diagnosis of urticaria. *Allergy.* 2009; **64** Issue 10:1417 – 1426.
51. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet.* 1998; **351**(9111):1225-32.
52. Dykewicz MS, Fineman S, Skoner DP, Nicklas R, Lee R, Blessing-Moore J, et al. Diagnosis and management of rhinitis: complete guidelines of the Joint Task Force on Practice Parameters in Allergy, Asthma and Immunology. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998; **81**(5 Pt 2):478-518.
53. Hughes, AM; Lightfoot T; Simpson J et al on behalf of the United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. Allergy and risk of childhood leukaemia: Results from the UKCCS. *Int. J. Cancer.* 2007; **121**:819–824
54. Linet MS, McCaffrey LD, Humphrey RL, Brookmeyer R, Van Natta ML, Tielsch JM et al. Chronic lymphocytic leukemia and acquired disorders affecting the immune system: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 1986; **77**:371-16
55. Linabery AM, Jurek AM, Duval S, and Ross JA. The Association Between Atopy and Childhood/Adolescent Leukemia: A Meta Analysis. *Am J Epidemiol.* 2010; **171**:749–764.
56. Wang H, Diepgen TL. Is atopy a protective or a risk factor for cancer? A review of epidemiological studies. *Allergy.* 2005; **60**: 1098–1111

57. Markiewicz MA, Gajewski TF. The immune system as antitumor sentinel: molecular requirements for an anti-tumor immune response. *Crit Rev Oncog.* 1999; **10**(3):247–260. 20.
58. Turner MC, Chen Y, Krewski D, et al. An overview of the association between allergy and cancer. *Int J Cancer.* 2006; **118**(12):3124–3132.
59. Kersey JH, Shapiro RS, Filipovich AH. Relationship of immunodeficiency to lymphoid malignancy. *Pediatr Infect Dis J.* 1988; **7**(5 suppl):S10–S12).
60. Greaves MF. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1988; **2**(2):120–125.
61. Kinlen L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet.* 1988; **2**(8624):1323–1327
62. MacKenzie J, Greaves MF, Eden TO, et al. The putative role of transforming viruses in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2006; **91**(2):240–243.
63. Vasconcelos GM, Kang M, Pombo-de-Oliveira MS, et al. Adenovirus detection in Guthrie cards from paediatric leukaemia cases and controls. *Br J Cancer.* 2008; **99**(10):1668–1672.
64. Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer* 1999; **35**:173-185.
65. Kinlen LJ, O'Brien F, Clarke K, Balkwill A, Matthews F. Rural population mixing and childhood leukaemia: effects of the North Sea oil industry in Scotland, including the area near Dounreay nuclear site. *BMJ.* 1993; **306**:743-748.

66. Schmiegelow K, Vestergaard T, Nielsen SM and Hjalgrim H. Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: the adrenal hypothesis. *Leukemia* (2008) **22**, 2137–2141.
67. Kinlen LJ, Balkwill A. Infective cause of childhood leukaemia and wartime population mixing in Orkney and Shetland, UK. *Lancet*;2001;**357**:858.
68. Kinlen LJ and Petridou E. Childhood leukaemia and rural population mixing: Greece, Italy and other countries. *Cancer Causes and Control*. 1995; **6**: 445 -450.
69. Kinlen LJ, Dickson M, Stiller CA. Childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma near large rural construction sites, with a comparison with Sellafield nuclear site. *BMJ*. 1995; **301**:763-768.
70. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ*. 1989; **299** (6710):1259-60.
71. Robinson DS. The Th1 and Th2 concept in atopic allergic disease. *Chem Immunol*. 2000; **78**:50–61.
72. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, et al. Reciprocal age-related patterns of allergen-specific T-cell immunity in normal vs. atopic infants. *Clin Exp Allergy*. 1998; **28**(suppl 5): 39–44.
73. Chang JS, Wiemels JL, Buffler PA. Allergies and childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2009; **42**(2):99–104.
74. Rudant J, Orsi L, Menegaux F, Petit A, Baruchel A, Bertrand Y, Lambilliotte A, Robert A, Michel G, Margueritte G, Tandonnet J, Mechinaud F, Bordigoni P, Hémon D, and Clave J. Childhood Acute Leukemia, Early Common Infections, and Allergy: The ESCALE Study. *Am. J. Epidemiol.* 2010; **172**(9):1015-1027

75. Magalhães IQ, Pombo-De-Oliveira MSP, Bennett CA et al. TEL-AML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. *Br J Haematol* 2000; **111**:204-207.
76. Chan LC, Lam TH, Li CK et al. Is the timing of exposure to infection a major determinant of acute lymphoblastic leukaemia in Hong Kong? *Pediatric and Perinatal Epidemiology*. 2002; **16**:154-165.

**Table I. Characteristics of cases and controls, n=180**

<i>Variable</i>	<i>Group</i>				<i>Total</i>	
	<i>Case (LLA) n=60</i>		<i>Control (healthy) n=120</i>			
	n	%	n	%	n	%
<i>GENDER</i>						
Female	26	43.3	52	43.3	78	43.3
Male	34	56.7	68	56.7	102	56.7
<i>Age Group</i>						
1 to 6 years	35	58.3	70	58.3	105	58.3
7 to 11 years	14	23.3	28	23.3	42	23.3
12 to 18 years	11	18.3	22	18.3	33	18.3
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>100</b>	<b>180</b>	<b>100</b>

**Table II.** Unadjusted odds ratios for risk of Acute Lymphoid Leukemia (ALL) relative to number of household members, gestational infections, birth weight and breastfeeding

Variable		Study Group				Chi-square test or	
		Case		Control		Binary Logistic Regression	
	Total	n	%	n	%	Sig. p-value	OR (95%CI)
<b>Household members<sup>b</sup></b>							
Up to 3 people	52	100	17	33	35	p = 0.96	0.98 (0.36 a 2.60)
Between 4 and 6 people	100	100	34	34	66	p = 0.85	0.92 (0.38 a 2.25)
Between 7 and 10 people	28	100	9	32	19	-	1.00
<b>Infections during pregnancy<sup>a</sup></b>							
Yes	39	100	10	26	29	-	1.00
No	141	100	50	36	91	p = 0.25	0.63 (0.28 a 1.39)
<b>Birth weight<sup>a</sup></b>							
< 2,500 grams	22	100	7	32	15	-	1.00
≥ 2,500 grams	158	100	53	34	105	p = 0.87	0.92 (0.36 a 2.40)
<b>Breastfeeding<sup>a</sup></b>							
Yes	80	100	26	32	54	-	1.00
No	100	100	34	34	66	p = 0.83	0.94 (0.50 a 1.4)
<b>Group Total</b>	<b>180</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>33</b>	<b>120</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

<sup>a</sup> Chi-square association test

<sup>b</sup> Binary logistic regression (variable with more than two categories)

**TABLE III.** Unadjusted odds ratios for risk of Acute Lymphoid Leukemia (ALL) in individuals with exposures for preceding history of allergy (by type) and IgE serum levels

Variable			Study Group		Chi-square test or			
	Total		Case		Control		Binary Logistic Regression	
	n	%	n	%	n	%	Sig p-value	OR (95%CI)
<b>Asthma<sup>a</sup></b>								
Yes	46	100	11	24	35	76	-	1.00
No	134	100	49	37	85	63	p < 0.20	0.54 (0.25 a 1.17)
<b>Allergic Rhinitis<sup>a</sup></b>								
Yes	48	100	10	21	38	79	-	1.00
No	132	100	50	38	82	62	p < 0.05	0.43 (0.20 a 0.94)
<b>Urticaria<sup>a</sup></b>								
Yes	26	100	3	12	23	88	-	1.00
No	154	100	57	37	97	63	p < 0.05	0.22 (0.06 a 0.77)
<b>Atopic Dermatitis<sup>a</sup></b>								
Yes	15	100	2	13	13	87	-	1.00
No	165	100	58	35	107	65	p < 0.20	0.28 (0.06 a 1.30)
<b>More than one allergy<sup>a</sup></b>								
Yes	49	100	9	18	40	82	-	1.00
No	131	100	51	39	80	61	p < 0.01	0.35 (0.16 a 0.79)
<b>IgE serum levels<sup>a</sup></b>								
No-exp (IgE < 52)	99	100	48	48	51	52	-	1.00
Exposed (IgE ≥ 52)	81	100	12	15	69	85	p < 0.001	5.41 (2.61 a 11.22)
<b>Group Total</b>	<b>180</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>33</b>	<b>120</b>	<b>67</b>	-	-

<sup>a</sup> Chi-square association test

<sup>b</sup> Binary logistic regression (variable with more than two categories)

**TABLE IV.** Adjusted odds ratios for risk of Acute Lymphoid Leukemia (ALL) in individuals with exposures for preceding history of allergy (by type) and IgE serum levels

<i>Variable</i>	<i>Group</i>				<i>Odds Ratio Adjusted</i>	<i>Multiple Logistic Regression Significance</i>		
	<i>Case</i>		<i>Control</i>					
	( <i>ALL</i> )	( <i>Healthy</i> )	n	%				
<b>• <i>Asthma</i></b>								
No	49	37	85	63	-			
Yes	11	24	35	76	0.14 (0.02 a 0.95)	P < 0.05		
<b>• <i>IgE serum levels</i></b>								
No-Exp (IgE < 52)	48	48	51	52	-			
Exposed (IgE ≥ 52)	12	15	69	85	0.10 (0.02 a 0.41)	P < 0.01		
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>33</b>	<b>120</b>	<b>67</b>	-	-		
<b>• <i>Allergic Rhinitis</i></b>								
No	50	38	82	62	-			
Yes	10	21	38	79	0.61 (0.09 a 4.08)	P = 0.61		
<b>• <i>Urticaria</i></b>								
Nao	57	37	97	63	-			
Yes	3	12	23	88	0.77 (0.16 a 3.67)	P = 0.74		
<b>• <i>Atopic Dermatitis</i></b>								
No	58	35	107	65	-			
Yes	2	13	13	87	0.54 (0.08 a 3.47)	P = 0.52		
<b>• <i>More than one allergy</i></b>								
No	51	39	80	61	-			
Yes	9	18	40	82	0.19 (0.02 a 2.20)	P = 0.18		
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>33</b>	<b>120</b>	<b>67</b>	-	-		

**4.2 Artigo 2: RISCO DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA ANALISANDO A PARTIR DA HIPÓTESE ADRENAL: ESTUDO TIPO CASO-CONTROLE**

NUNES<sup>1</sup>, JC; SARINHO<sup>2</sup>, ESC;

<sup>1</sup>Departamento de Pediatria e Genética da Universidade Federal da Paraíba

<sup>2</sup>Departamento de Pediatria da Universidade Federal de Pernambuco

Conflitos de interesse: os autores declaram não haver conflitos de interesse.

***Endereço para correspondência:***

Joacilda da Conceição Nunes

Universidade Federal da Paraíba

Departamento de Pediatria e Genética

Hospital Universitário Lauro Wanderley – 3º andar

Cidade Universitária, João Pessoa PB - Brasil

CEP: 58051-900 fone: +55 (83) 3216-7308

## RESUMO

**Introdução:** leucemia linfoide aguda (LLA) é o câncer pediátrico mais comum. Etiologicamente não apresenta um modelo definido, e diversos fatores têm sido relacionados ao sistema imunológico como risco/proteção. A hipótese da adrenal levanta o argumento de que a exposição a infecções promoveria ativação do eixo hipotálamo/hipófise/adrenal e elevaria os níveis séricos de cortisol, que eliminaria clones leucêmicos e pré-leucêmicos nos tipos de LLA predominantes entre os 2 e 5 anos de idade.

**Objetivo:** A proposta desse estudo foi investigar uma possível associação entre a hipótese adrenal com a leucemia linfoide aguda na infância e adolescência.

**Método:** estudo do tipo caso-controle não pareado de base hospitalar. A amostra foi constituída de 60 crianças e adolescentes com diagnóstico incidente de leucemia linfoide aguda *não T*, classificadas pela avaliação da medula óssea através do mielograma e imunofenotipagem e 120 controles selecionados com proporcionalidade com relação à idade e sexo a partir dos casos e oriunda dos estados de Pernambuco e Paraíba no nordeste brasileiro, entre 2008 e 2011. A coleta dos dados foi através da aplicação de um questionário estruturado, realização de exame clínico e dosagens séricas de cortisol basal e ACTH, além de investigação sobre o uso prévio de glicocorticoides e marcadores sorológicos de infecção prévia pelo EBV e parvovírus B19.

**Resultados:** Para o modelo não ajustado as variáveis de exposição que apresentaram (valor de  $p < 0.20$ ) foram: Nível Elevado de Cortisol basal ( $p < 0.01$ ), Infecção Prévia pelo EBV ( $p = 0,14$ ), Infecção Prévia por Parvovírus B19 ( $p = 0,07$ ). Após o modelo ajustado através da análise de regressão logística múltipla persiste a significância de uma relação inversa para níveis séricos elevados de cortisol basal quando comparados os casos com os controles apresentando  $p < 0.01$  e OR/IC 95% 0.16 (0.04 – 0.56). Para infecção prévia pelo parvovírus B 19 o resultado expressa risco com  $p < 0,05$  e OR/IC 95% 2.19 (1.05 – 4.57).

**Conclusão:** Níveis bastante elevados de cortisol basal, provavelmente por ativação crônica da glândula adrenal, parecem estar relacionados com modificações na resposta imune e consequentemente promover diminuição de clones leucêmicos, desempenhando um papel de proteção a crianças e adolescentes de LLA. Ao passo que a infecção prévia pelo parvovírus B 19 está associada com aumento de risco de LLA.

**PALAVRAS CHAVES:**Hipótese Adrenal. Leucemia Linfóide Aguda. Vírus de Epstein-Barr. Parvovírus B19. Risco

## ABSTRACT

**Introduction:** Acute Lymphoid Leukemia (LLA) is the most common pediatric cancer, etiologically it does not have a defined model and several factors have been related to the immune system as risk / protection. The adrenal hypothesis raises the argument that the exposure to infections would promote an activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and elevate the plasmatic cortisol levels, which would eliminate leukemic and pre-leukemic clones in ALL types prevailing between 2 and 5 years old.

**Objective:** This study proposal was to investigate a possible association between the adrenal hypothesis and acute lymphoid leukemia in childhood and adolescence.

**Methods:** It is an unpaired hospital-based case-control study. The sample was composed of 60 children and adolescents incidentally diagnosed with acute lymphoid leukemia *non T*, classified by the association of bone marrow through myelogram and immunophenotyping, and 120 healthy controls, selected in proportion to the cases' age and sex, from Pernambuco and Paraíba, Brazilian northeastern states, between 2008 and 2011. Data collection was done through the application of a standardized questionnaire, a clinical examination, tests to measure the levels of basal cortisol and Adrenocorticotropic Hormone (ACTH) and an investigation about previous use of glucocorticoids and about serological markers of previous infection from Epstein-Barr virus (EBV) and from B19 parvovirus.

**Results:** To the unadjusted model the exposure variables which have p-value < 0,20 were High Basal Cortisol Level (sig p-value = 0,004), Previous Infection from EBV (sig p-value = 0,14), Previous Infection from B19 Parvovirus (sig p-value = 0,07). After adjusting the model through the multiple logistic regression analysis, the significance of an inverse relation towards High Cortisol Levels still remains when comparing the cases with the controls showing sig p-value 0,01 and OR/CI 95% 0,16 (0,04 – 0,56). To Previous Infection from B19 parvovirus the results show risk (p-value = 0,05) and OR/CI 95% 2,19 (1,05 – 4,57).

**Conclusion:** High basal cortisol levels, probably due to chronic activation of adrenal gland, seem to be related to changes in the immune response and consequently it promotes leukemia clones' reduction, playing a protection role to ALL children and adolescents. On the other hand previous infection from B19 parvovirus is associated with the increase of ALL risk.

**KEYWORDS:** Adrenal. Acute Lymphoid Leukemia. Epstein-Barr virus. B19 parvovirus. Risk.

## INTRODUÇÃO

Apesar da incidência global da leucemia ser rara, é a mais comum neoplasia maligna da infância em crianças abaixo de 15 anos, sendo a leucemia linfoide aguda, responsável por 76 a 85% de todos os diagnósticos de leucemias em crianças e representa mais de 30% das doenças neoplásicas malignas nesse grupo etário.<sup>1,2,3,4</sup> Predisposição genética e susceptibilidade a desenvolver leucemias são apontadas, sobretudo em síndrome de Down, neurofibromatose tipo I, anomalias cromossômicas, ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi e imunodeficiência hereditária. Diversas outras doenças genéticas, sobretudo as que apresentam defeitos em genes de reparo no DNA ou as síndromes de instabilidade cromossômicas, apresentam também um alto potencial de induzirem à leucemia, entretanto estas desordens representam menos de 5% de todas as causas conhecidas de leucemias em crianças<sup>5</sup>.

A história natural da leucemia linfoide aguda aponta para o surgimento de um clone pré-leucêmico ainda na vida intrauterina, muito frequentemente por alterações cromossômicas numéricas e estruturais e um segundo evento pós-natal seria necessário para promover sucessivos eventos genéticos e desencadear o crescimento desordenado e aberrante dos clones de linfócitos imaturos. O período de latência entre o primeiro evento genético até o desencadeamento da doença é bastante variável, desde poucos meses a 15 anos.<sup>6</sup> Muitos fatores ambientais têm sido propostos para associação com risco de LLA. Hipóteses postuladas têm sido aceitas como tendo plausibilidade para explicar a relação das infecções na infância e o risco de LLA. A hipótese da “mistura populacional” proposta por Kinlen, a hipótese da “infecção tardia” proposta por Greaves e hipótese da “adrenal” postulada por Schmiegelow et al, mais recentemente, têm em comum o aspecto de que a resposta imunológica frente à infecção nos primeiros anos de vida estaria relacionada ao risco de leucemia linfoide aguda na infância.<sup>6,7,8,9</sup> A hipótese da adrenal levanta o argumento de que a exposição a infecções promoveria ativação do eixo hipotálamo/hipófise/adrenal e elevaria os níveis séricos de cortisol de forma persistente, que eliminaria clones leucêmicos e pré-leucêmicos nos tipos de LLA predominantes entre os 2 e 5 anos de idade.<sup>10</sup>

Este estudo teve como objetivo principal avaliar relação de risco entre crianças e adolescentes com leucemia linfoide aguda e crianças e adolescentes saudáveis quanto às variáveis: uso de glicocorticoides, níveis de cortisol sérico basal, níveis do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), no sentido de avaliar os aspectos da hipótese adrenal, que argumenta que a ativação do eixo adrenal suprimiria clones de células malignas. O estudo também avaliou infecção prévia pelo vírus de Epstein Barr e a infecção prévia pelo parvovírus B19, uma vez que já se tem estudos relacionando o papel desses vírus sobre o sistema imunológico e suas associações com neoplasias malignas de linfócitos.

## MÉTODO

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle não pareado de base hospitalar, cuja amostra foi constituída de 60 crianças e adolescentes com diagnóstico incidente de leucemia linfoide aguda *não T*, diagnosticadas e classificadas pela avaliação da medula óssea através do mielograma e imunofenotipagem e 120 controles selecionados com proporcionalidade com relação à idade e sexo a partir dos casos e oriunda dos estados de Pernambuco e Paraíba no nordeste brasileiro, entre 2008 e 2011.

Os dados foram coletados através de um questionário clínico estruturado, bem como da coleta de amostras de sangue para ensaio laboratorial. As variáveis estudadas para medir associação de risco com LLA foram: níveis séricos de cortisol basal, níveis séricos de ACTH, uso prévio de glicocorticoides, infecção prévia pelo vírus de Epstein Barr, infecção prévia pelo parvovírus B19. As dosagens de cortisol e ACTH séricos foram obtidas por método de quimiluminescência *kit assay* para cortisol e *kit assay* para ACTH. As amostras para cortisol e ACTH foram coletadas antes da 8 horas da manhã para respeitar o ciclo circadiano e foram considerados elevados os valores de cortisol  $\geq$  23 mcg/dL (valores elevados), e valores do hormônio adrenocorticotrófico até 40 mcg/dL foram considerados normais. Os ensaios para parvovírus B 19 e vírus de Epstein Barr foram feitas utilizando-se o método de enzima imuno ensaio (ELISA) com kit human® IgG para EBV e parvovírus B19 e foi caracterizada como tendo infecções prévias as crianças a adolescentes que apresentavam níveis de IgG acima do valor de referência para a técnica empregada.

**Análise estatística:** foi utilizado o software Excel - 2007 na construção de um banco de dados a partir das questões contidas nos instrumentos de coleta dos dados, bem como os resultados dos ensaios laboratoriais.

As variáveis estudadas foram mensuradas nos níveis das escalas: nominal, ordinal e intervalar e efetuou-se a codificação das variáveis pertinentes com avaliação da consistência dos dados para a proposta do estudo de caso-controle. Foram utilizadas técnicas da estatística inferencial bivariada e multivariada, com uso do pacote estatístico SPSS-versão 13.0, tendo sido aplicados o Teste de associação de  $\chi^2$  e/ou Regressão Logística Binária para o cálculo do Odds Ratio (OR) e seu Intervalo de Confiança de 95% considerando os fatores de forma isolados e significativo o valor  $p < 0,20$ . Para o

modelo ajustado foi utilizada a Regressão Logística Múltipla considerando-se o valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A tabela 1 mostra o perfil da amostra quanto a idade e sexo das crianças e adolescentes. Os controles foram selecionados na proporção de 1:2 pareados pelo sexo e idade, para uniformidade da amostra.

Podem ser observados na tabela 2 de forma univariada, utilizando-se o modelo não ajustado os resultados para as variáveis estudadas. As principais variáveis que apresentaram significância ( $p < 0.20$ ) quanto ao risco ou chance da ocorrência de LLA (Leucemia Linfóide Aguda) foram: *Nível Elevado de Cortisol* ( $p < 0.01$ ), *Uso Prévio de Corticoide* ( $p < 0.20$ ) e *Infecção Prévia por Parvovírus B19* ( $p < 0.20$ ). Os fatores de risco *Nível sérico de ACTH* ( $p = 0.46$ ) e *Infecção Prévia pelo EBV* ( $p = 0.46$ ) não apresentaram associação significativa com a Leucemia Linfóide Aguda (LLA). Portanto, apenas as variáveis com significância  $p < 0.20$  foram consideradas na avaliação do modelo de regressão logístico múltiplo ou multivariado.

Na Tabela 2 foram analisados OR ajustado para o de risco de LLA quanto as variáveis *Nível Elevado de Cortisol*, *Uso Prévio de Corticoide* e *Infecção Prévia por Parvovírus B19* para a ocorrência ou não de LLA (Leucemia Linfóide Aguda). Somente as variáveis *Nível Elevado de Cortisol* e *Infecção Prévia por Parvovírus B19* persistiram com associação significativa com a ocorrência de LLA quando o modelo foi ajustado. Para o Nível Elevado de Cortisol o resultado demonstra associação inversa com o risco de desenvolvimento de LLA.

## DISCUSSÃO

O presente estudo encontrou associação inversa entre níveis elevados de cortisol e desenvolvimento de LLA, além de risco aumentado de LLA nos sujeitos que apresentaram infecção prévia pelo parvovírus B 19 quando realizado o modelo ajustado

de regressão logística multivariada. Muitos estudos têm sido realizados no intuito de estabelecer uma etiologia para a LLA, entretanto algumas teorias são bem aceitas como possíveis fatores de explicação para o modelo de desenvolvimento da doença.

Alguns aspectos são plausíveis quanto à etiologia da LLA: a doença é biologicamente heterogênea e não foi isolado um mecanismo único causal; a história natural da LLA na infância aponta para o surgimento de um clone pré-leucêmico ainda na vida intrauterina, muito frequentemente por alterações cromossômicas numéricas e estruturais e um segundo evento pós-natal é necessário para promover novos eventos genéticos e desencadear o crescimento desordenado dos clones de linfócitos imaturos;<sup>3,4</sup> fatores de risco associados aos eventos da vida intrauterina que proporcionariam o surgimento da mudança genética também são amplamente estudados; o período de latência entre o primeiro evento genético até o desencadeamento da doença é bastante variável, desde poucos meses a mais de 15 anos; agentes físicos como a radiação ionizante e eletromagnética têm sido vistos como tendo fraca associação com LLA nesse grupo etário.<sup>13-6</sup>

Estudos epidemiológicos de caso-controle em populações diferentes apontam para vários fatores associados ao risco/proteção e hipóteses biológicas tem surgido para justificar a interação dos fatores genéticos e ambientais. Outro aspecto a ser considerado são as variações temporal e geográfica na incidência da LLA levando a crer que fatores ambientais inclusive socioeconômicos teriam papel na patogênese da LLA;<sup>3,4</sup> com estudos demonstrando forte evidência epidemiológica de que infecções nos primeiros anos de vida influenciariam no risco de LLA comum.<sup>13-16</sup>

A justificativa para essas hipóteses apontadas a partir de observações epidemiológicas e evidências biológicas estão embasadas na resposta do sistema imune frente as infecções, bem como a influência da higiene sobre essa imunomodulação. Na sua hipótese, Smith (1987), propôs que o pico de LLA na infância que comumente ocorre entre os 2 e 6 anos nas populações sócio economicamente desenvolvidas seria devido a exposição intra útero às infecções e que essa exposição com esse pico de incidência estaria relacionada principalmente ao subtípico de LLA pré B.<sup>17-19</sup> O modelo postulado por Kinlen, em 1988, defende que as populações de certos agrupamentos populacionais previamente não expostos a determinadas infecções quando se

misturavam com outras populações previamente expostas passavam a desencadear mudanças na função imune, e consequentemente um aumento na incidência de LLA nesses agrupamentos inicialmente isolados. Já o modelo postulado por Graves, em 1988, propõe que a falta de exposição a infecções pela “higiene” poderia evitar a exposição a agentes infecciosos comuns que por sua vez modificaria a resposta imunológica aumentando o risco de LLA. Essa hipótese é denominada de hipótese da “infecção atrasada”,<sup>6,7</sup>. Portanto, tanto a exposição a infecções em comunidades não previamente expostas, quanto a falta de exposição a certas infecções na infância pelo excesso de “higiene”, poderiam, segundo as hipóteses defendidas por Kinlen e Greaves, desencadear uma resposta imunológica aberrante, e com isso o aumento nos índices de leucemia linfoide aguda na infância. Para a hipótese defendida por Schmiegelow et al., 2008, a explicação para essa imunomodulação não seria o padrão de infecção nos primeiros anos de vida, com uma baixa incidência de infecções que levaria a uma modulação no sistema imune e, consequentemente, ligado a um maior risco de desenvolver LLA. Schmiegelow et al. apresentam uma nova interpretação para essas observações, a ‘hipótese adrenal’. A Hipótese Adrenal, preconiza que o risco de LLA estaria reduzido quando a elevada exposição a infecções nos primeiros anos de vida induziria a um aumento quantitativo e qualitativo nos níveis séricos de cortisol de forma persistente. Níveis elevados de cortisol, por sua vez, poderiam eliminar células leucêmicas, assim como células pré-leucêmicas em subgrupos de LLA predominante entre os 5 e 7 anos de idade e ainda suprimir a resposta pró-inflamatória às infecções via Th1 e reduzir o estresse proliferativo em células pré-leucêmicas se caso pré-existirem.

Uma possível explicação para as evidências epidemiológicas encontradas na nossa casuística, onde o cortisol sérico elevado apresentou relação inversa para o risco de LLA, poderia estar na interação entre a exposição a agentes biológicos e a resposta metabólica com ativação adrenal. O balanço entre imunidade humoral e celular, os linfócitos Th1/Th2 e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é relativamente imaturo por ocasião do nascimento e na medida em que a criança vai se expondo a carga infecciosa nos primeiros anos, essa exposição pode influenciar na extensão pelas quais subsequentes infecções promovem uma resposta pró-inflamatória mediada por Th1. A exposição a infecções na infância promoveria uma adaptação do sistema imune e evitaria uma hiperprodução de citocinas mediadas por Th1 tais como a IL12, fator de necrose tumoral alfa e interferon gama.<sup>20, 21</sup> O cortisol favorece a produção de citocinas

anti-inflamatórias mediadas por Th2, tais como IL4 e IL10, que preveniria o stress proliferativo ativado por Th1.<sup>22</sup> Esse balanço entre redução da expressão de Th1 e aumento da expressão de Th2, pode ser uma das explicações para redução de clones malignos, mediada pela ativação crônica da adrenal em resposta secundárias aos agentes infecciosos na infância. Já está demonstrado em modelos animais que estimulação intensa do sistema imune com agentes infecciosos promovem aumento mais sustentados nos níveis de cortisol e consequente redução da proliferação de linfócitos.<sup>23</sup>

Outro achado nesse estudo foi a associação de risco de LLA quando a presença do parvovírus B19 foi identificado como infecção prévia. Estudos demonstram essa relação de risco entre alguns vírus candidatos, que teriam ação sobre a modulação do ciclo celular nas crianças, entretanto as associações são mais fortes para leucemias de células T e quando de Células B encontram-se mais associadas a doença dos adultos do que com crianças e adolescentes a exemplo do estudo Daiabata, et al 1988 para o vírus herpes tipo 6 (HHV-6) em que foram detectados sequencias de DNA viral em pacientes com LLA de células T e em adultos com LLA de células B.<sup>24</sup>

Num estudo de sangue obtido dos cartões Guthrie (sangue em papel de filtro utilizado na triagem neonatal) de crianças que desenvolveram LLA e comparadas a controles normais não foi demonstrada a presença do DNA do parvovírus B19, o que direciona ao risco provavelmente associado a uma exposição não na vida intrauterina ou perinatal, mas posterior ao parvovírus B 19.<sup>25</sup> A infecção aguda pelo parvovírus B 19 está associada com uma significante cascata de citocinas, que pode encontrar-se relacionada com alterações da hematopoiese e ou supressão normal da função da medula óssea, que teoricamente poderia induzir a liberação dos clones malignos, bem como a proliferação celular, uma vez que outros fatores também estão associados na determinação da doença.<sup>26</sup>

Em nossa casuística não encontramos associação de risco de LLA com infecção pelo vírus de Epstein Barr, porém os estudos de caso-controle apresentam a limitação de temporalidade entre a exposição e o agravo. Além disso, a amostra estudada nessa casuística apresenta condições geopolíticas, climáticas, culturais, epidemiológicas e de organização do modelo de saúde que são próprias. Essas variáveis contribuem para a

forma como a qual essas crianças e adolescentes estão expostas as infecções na infância e como o sistema imunológico vai se comportar nesse cenário. Desse modo, fazem-se necessários estudos com modelos biológicos que possam identificar o padrão de resposta imunológica, sua interação com eixo adrenal-hipófise e o comportamento biológico envolvendo as alterações genéticas já conhecidas nessas neoplasias do sistema linfoide.

## REFERÊNCIAS

1. Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA, Terracini B, Young JL, editors. International incidence of childhood cancer. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 1988 (IARC. Scientific Publications n°87).
2. Parkin DM, Kramárová E. Materials and methods. In: Parkin DM, Kramárová E, Draper GJ, Masuyer E, Michaelis J, Neglia J, et al. International incidence of childhood cancer. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 1998:3-14.
3. Reis RS, Santos MO e Thuler LCS. Incidência de tumores pediátricos no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007; **53**(1): 5-15
4. Little J. Epidemiology of childhood cancer. Lyon: IARC; 1999. (Scientific Publications; no.149). p. 206-41.
5. Bain BJ. Leukaemia Diagnosis. Blackwell Science, London. 1997.
6. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006; **6**(3):193–203.
7. Greaves MF. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1988; **2**(2):120–125.
8. Kinlen L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet*. 1988; **2**(8624):1323–1327
9. Kinlen LJ. Infective cause of childhood leukaemia. *Lancet* 1989; **1**:378–379.
10. Schmiegelow K, Vestergaard T, Nielsen SM and Hjalgrim H. Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: the adrenal hypothesis. *Leukemia* (2008) **22**, 2137–2141.
11. Stiller CA, Parkin DM. Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. *Br Med Bull* 1996; **52**: 682–703.
12. IARC. International Incidence of Childhood Cancer. IARC Scientific Publications: Lyon, 1998, 1–391.
13. Edgar K, Morgan A. Does infections cause or prevent childhood leukemia? 2008, 1–43.

14. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 1999; 354: 1499–1503.
15. Wiemels JL, Ford AM, van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood* 1999; 94: 1057–1062
16. Hjalgrim LL, Madsen HO, Melbye M, Jørgensen P, Christiansen M, Andersen MT et al. Presence of clone specific markers at birth in children with acute lymphoblastic leukemia. *Br J Cancer* 2002; 97: 994–999.
17. Smith, M. (1997) Considerations on a possible viral etiology for B precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Journal of Immunotherapy*, **20**: 89–100.
18. Smith, M.A., Simon, R., Strickler, H.D., McQuillan, G., Ries, L.A. & Linet, M.S. (1998) Evidence that childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with an infectious agent linked to hygiene conditions. *Cancer Causes and Control*, 9, 285–298.
19. Smith, M.A., Strickler, H.D., Granovsky, M., Reaman, G., Linet, M., Daniel, R. & Shah, K.V. (1999) Investigation of leukemia cells from children with common acute lymphoblastic leukemia for genomic sequences of the primate polyomaviruses JC virus, BK virus, an simian virus 40. *Medical and Pediatric Oncology*, 33, 441–443.
20. Sherman B, Wysham C, Pfahl B. Age-related changes in the circadian rhythm of plasma cortisol in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; **61**: 439–443.
21. Lewis M, Ramsay DS. Developmental change in infants' responses to stress. *Child Dev* 1995; **66**: 657–670
22. Blotta MH, DeKruyff RH, Umetsu DT. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 1997; 158: 5589–5595.
23. Shanks N, Windle RJ, Perks PA, Harbuz MS, Jessop DS, Ingram CD et al. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamicpituitary- adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5645–5650.
24. Daibata, M., Taguchi, T., Kamioka, M., Kubonishi, I., Taguchi, H. & Miyoshi, I. (1998) Identification of integrated human herpes virus 6 DNA in early pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 12, 1002–1004.
25. Isa, V., Priftakis, P., Broliden, K., Gustafsson, B. Human parvovirus B19 DNA is not detected in Guthrie cards from children who have developed acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*. April 2004; 42 (4): 357–360.

26. McNally, R. J., Q., Eden, T. O. B. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. *British Journal of Haematology*. 2004, **127**: 243–263.

**TABELA 1-** Perfil da amostra de casos e controles n=180

PERFIL	GRUPO				Total	
	Caso (LLA)		Controle (S/Doença)			
	n	%	n	%	n	%
<i>SEXO</i>						
Feminino	26	43.3	52	43.3	78	43.3
Masculino	34	56.7	68	56.7	102	56.7
<i>FAIXA ETÁRIA</i>						
1 a < 7 anos	35	58.3	70	58.3	105	58.3
7 a < 12 anos	14	23.3	28	23.3	42	23.3
12 a 18 anos	11	18.3	22	18.3	33	18.3
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>100</b>	<b>180</b>	<b>100</b>

**TABELA 2** – OR não ajustado para risco de LLA quanto aos marcadores do eixo hipófise adrenal e de marcadores para infecção prévia pelo EBV e pelo parvovírus B 19

VARÍAVEL	Total	GRUPO				Teste de $\chi^2$	<i>Razão de chances</i> <i>não-ajustada</i>	
		Caso		Controle				
	n	%	n	%	N	%	Sig. p- valor	OR (IC. 95%)
<b>Nível Elevado de Cortisol</b>								
Exposto	29	100	3	10	26	90	-	1
Não exposto	151	100	57	38	94	62	p < 0.01	0.19 (0.06 – 0.66)
<b>Nível Elevado de ACTH</b>								
Exposto	29	100	8	28	21	72	-	1
Não exposto	151	100	52	34	99	66	p = 0.47	0.72 (0.30 – 1.75)
<b>Uso Prévio de Corticóide</b>								
Sim	35	100	8	23	27	77	-	1
Não	145	100	52	36	93	64	p < 0.20	0.53 (0.22 – 1.25)
<b>Infecção Prévia pelo EBV</b>								
Reagente	95	100	34	36	61	64	p = 0.46	1.26 (0.68 – 2.36)
Não reagente	85	100	26	30	59	69	-	1
<b>Infecção Prévia por Parvovírus B19</b>								
Reagente	45	100	20	44	25	56	p < 0.20	1.90 (0.95 – 3.80)
Não reagente	135	100	40	30	95	70	-	1
<b>Grupo Total</b>	<b>180</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>33</b>	<b>120</b>	<b>67</b>	-	-

**TABELA 3** – OR ajustado para o risco de LLA quanto nível de cortisol basal, uso prévio de corticosteróide e infecção prévia pelo parvovírus B 19

<b>FATORES DE RISCO</b>	<b>Total</b>	<b>GRUPO</b>				<b>Regressão Log. Múltipla</b>	<b>Razão de chance ajustada</b>	
		<b>Caso (LLA)</b>		<b>Controle</b>				
	n	%	n	%	n	%	<b>Sig. p-valor</b>	<b>OR (IC. 95%)</b>
<b>Nível Elevado de Cortisol basal</b>								
Exposto	29	100	3	10	26	90	-	1
Não exposto	151	100	57	38	94	62	p < .01	0.16 (0.04 – 0.56)
<b>Uso Prévio de Corticóide</b>								
Sim	35	100	8	23	27	77	-	1
Não	145	100	52	36	93	64	p = 0.07	0.45 (0.18 – 1.08)
<b>Infecção Prévia por Parvovírus B19</b>								
Reagente	45	100	20	44	25	56	p < 0.05	2.19 (1.05 – 4.57)
Não reagente	135	100	40	30	95	70	-	1
<b>Grupo Total</b>	<b>180</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>33</b>	<b>120</b>	<b>67</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

**Quadro 1:** Fatores de risco (ou de prevenção) da Leucemia Linfóide Aguda (LLA) em crianças e adolescentes. Modelo ajustado pela Regressão Logística Múltipla.

Fatores de risco ou prevenção	OR(IC95%)	Sig. p-valor
<i>Nível Elevado de Cortisol</i>	0.16 (0.04 – 0.56)	p < 0.01
<i>Infecção Prévia por Parvovírus B19</i>	2.19 (1.05 – 4.57)	p < 0.05

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

Mediante o cenário avaliado neste estudo, a leucemia linfoide aguda é uma doença maligna complexa, cujo determinante causal está longe de ser associado a um único fator, seja genético, seja ambiental.

Podemos estabelecer como conclusões, a partir dos resultados observados, que heterogeneidade de fatores associados ao risco de desenvolvimento de LLA na faixa pediátrica está intimamente ligado aos fenômenos do sistema imunológico. Seja na resposta mediante um quadro infeccioso, seja pela falta de agentes infecciosos imunomodulando essa resposta, seja pela exacerbação da resposta imune, como nas alergias, seja pela hiperativação do eixo adrenal por algumas, se não todas essas variáveis já apontadas interagindo em conjunto, de uma forma ou de outra. Essas evidências sugerem fortemente que essas interações possam estar relacionadas com o desenvolvimento da patogênese das leucemias linfoides.

Considerando-se que toda doença de alto impacto social ou letal, como é o caso da leucemia linfoide aguda, requer estudos em diferentes tipos de populações para traçar perfil da história natural da doença, associação com fatores inerentes aquelas populações e sobretudo ampliar os estudos de natureza epidemiológica mesmo em países com incidência menor, para que se possa efetivamente oferecer um novo olhar a luz desse perfil epidemiológico e estudos dessa natureza podem abrir caminhos impactantes na trajetória dessas morbidades.

Neste sentido, a partir dos resultados obtidos, embora o tipo de estudo retrospectivo tenha limitações com relação a temporalidade entre o fator de risco e a ocorrência do fenômeno, pudemos observar que a relação de proteção para desenvolvimento de LLA quando se tem estabelecidas alergias foi significativa, e corroborou com outros estudos em outras populações de países desenvolvidos. É notório que o aumento de doenças com alterações envolvendo o ambiente genético, ou redução da expressão delas, levaria muitos anos para ser efeito da evolução natural ou até mesmo por mudanças genéticas herdáveis. Sendo portanto, o impacto a curto prazo no aumento de incidência ou outras mudanças dessas morbidades, verdadeiramente atribuídas a fenômenos epigenéticos,

onde o ambiente físico destacando os aspectos biológicos e sua integração com esse meio, teria um papel fundamental.

Várias evidências apontam que na infância a modulação imunológica tem um papel crucial no desenvolvimento das neoplasias linfoides na infância.

Estudos com amostras mais ampliadas, bem como método de coleta de material biológico do tipo hormonal a partir de técnicas que possam avaliar as frações disponíveis na célula e não apenas em nível sérico, serão de grande contribuição para reforçar a hipótese de que a chave no gatilho para o desencadeamento dessa morbidade aqui estudada, está intimamente relacionado com as vias de sinalização imunológicas.

Necessário ainda se faz estabelecer estudos com base em modelos biológicos envolvendo aspectos do sistema imune, as vias mediadas por linfócitos e contextualizando com a resposta imune e o eixo adrenal e em populações variadas para garantir o efeito dos aspectos geopolíticos, sociais e ambientais.

## REFERÊNCIAS

- ABERG, N.; HESSELMAR, B.; ABERG, B.; ERIKSSON, B. Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. **Clin Exp Allergy**, v. 25(9), p. 815-19, 1995.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004** - Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Brasília, DF, 7 de dezembro de 2004.
- AHLBOM A, DAY N, FEYCHTING M, ROMAN E, SKINNER J, DOCKERTY J, et al. Pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. **Br J Cancer**, v. 83, p. 692-8, 2000.
- ALEXANDER, F. E.; CHAN, L. C.; LAM, T.H.; et al. Clustering of childhood leukaemia in Hong Kong: association with the childhood peak and common acute lymphoblastic leukaemia and with population mixing. **Br J Cancer**. v. 75; p. 457-763, 1997.
- AUVINEN, A.; HAKULINEN, T.; GROVES, F. Haemophilus influenzae type B vaccination and risk of childhood leukaemia in a vaccine trial in Finland. **British Journal of Cancer**, v. 83, p. 956–958, 2000.
- BAIN, B. J. Leukaemia Diagnosis. **Blackwell Science**, London. 1997.
- BENE, M.C.; CASTOLDI, G.; KNAPP. W.; MATUTES, E.; ORFÃO, A. et al. Proposal for immunological classification of acute leukemias. European Group for Immunological Characterization for Leukemias (EGIL). **Leukemia**. v. 9; p.1783-6, 1995.
- BLOTTA MH, DEKRUYFF RH, UMETSU DT. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. **J Immunol**, v. 158, p. 5589–5595, 1997.
- BUCKLEY, J. D.; BUCKLEY, C. M.; RUCCIONE, K. et al. Epidemiological characteristics of childhood acute lymphocytic leukemia. Analysis by immunophenotype. The Childrens Cancer Group. **Leukemia**, v. 8, p. 856–864,1994.
- BUSSE, W.W.; LEMANSKE, R. F. JR. Asthma. **N Engl J Med**, v. 344(5), p. 350-62, 2001.
- CHAN, L. C.; LAM, T. H.; LI, C. K et al. Is the timing of exposure to infection a major determinant of acute lymphoblastic leukaemia in Hon Kong? **Pediatric and Perinatal Epidemiology**. v.16; p.154-165, 2002.

CHANG JS, WIEMELS JL, BUFFLER PA. Allergies and childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis.*, p. 42(2), p. 99–104, 2009.

COOPER, G. S.; KAMEL, F.; SANDLER, D. P; DAVEY, F. R.; BLOOMFIELD, C. D. Risk of adult acute leukemia in relation to prior immune-related conditions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* v.5; p.867–872, 1996.

DAIBATA, M.; TAGUCHI, T.; KAMIOKA, M., et al. Identification of integrated human herpes virus 6 DNA in early pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, v. 12, p. 1002–1004, 1998.

DEMOLY P, ALLAERT FA, LECASBLE M, BOUSQUET J; PRAGMA. Validation of the classification of ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma). *Allergy*, v. 58(7), p.672-5, 2003.

Diagnosis and management of rhinitis: complete guidelines of the Joint Task Force on Practice Parameters in Allergy, Asthma and Immunology. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*, v. 81(5 Pt 2), p. 478-518, 1998.

Diagnóstico e tratamento da Asma Brônquica. *Projeto Diretrizes*. Associação Médica Brasileira/Conselho Federal de Medicina, 2001.

Diagnóstico e tratamento da urticária. *Projeto Diretrizes*. Associação Médica Brasileira/Conselho Federal de Medicina, 2001.

DJUKANOVIC, R.; ROCHE, W.R.; WILSON, J.W.; et al. Mucosal inflammation in asthma. *Am Ver Respir Dis*, v. 142, p. 434-57, 1990.

DOCKERTY, J. D.; SKEGG, D. C.; ELWOOD, J. M. et al.. Infections, vaccinations, and the risk of childhood leukaemia. *British Journal of Cancer*. v. 80; p. 1483–1489, 1999.

DUARTE, I.; PIRES, M. C.; LAZZARINI, R. et al. Dermatite de contato-artigo de revisão. *An Bras Dermatol*, v. 75, p. 529-48, 2000.

DYKEWICZ, M. S.; FINEMAN, S.; SKONER, D. P.; et al. Diagnosis and management of rhinitis: complete guidelines of the Joint Task Force on Practice Parameters in Allergy, Asthma and Immunology. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*, v. 81(5 Pt 2), p. 478-518, 1998.

DYKEWICZ, M. S.; FINEMAN, S. Executive Summary of Joint Task Force Practice Parameters on Diagnosis and Management of Rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*, v. 81, p. 463-8, 1998.

EDGAR K & MORGAN A. Does infections cause or prevent childhood leukemia? A review of the scientific evidence. London: Children with **Leukemia**; p.1–43, 2008.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA - GINA. National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI). **Global Strategy for asthma management and prevention.** Bethesda (MD), p. 339, 2006. Disponível em [http://www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA\\_Under5\\_Pocket\\_2009.pdf](http://www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA_Under5_Pocket_2009.pdf), acesso em 09.09.2008.

GRATTAN, C.; POWELL, S.; HUMPHREYS, F. Management and diagnostic guidelines for urticaria and angio-edema. **Br J Dermatol**, v.144, p.708-14, 2001.

GREAVES M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nature reviews cancer**, v. 6, p. 193-203, 2006.

GREAVES M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. **Eur J Cancer**, v. 35, p. 173-185, 1999.

GREAVES, M. F.; MAIA, A. T.; WIEMELS, J. L.; et al. Leukemia in twins: lessons in natural history. **Blood**, v. 102(7), p. 2321–2333, 2003.

GREAVES, M. F. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**. v.2(2); p.120–125, 1988.

GREAVES, M. F.; COLMAN, S. M.; BEARD, M. E. J.; et al. Geographical distribution of acute lymphoblastic leukaemia subtypes: second report of the Collaborative Group Study. **Leukemia**. v. 7; p.27-34, 1993.

GREAVES, M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. **Eur J Cancer**. v. 35; p.173-185, 1999.

GROVES, F.; SINHA, D.; AUVINEN, A. Haemophilus influenzae type b vaccine formulation and risk of childhood leukaemia. **British Journal of Cancer**. v. 87, p. 511–512, 2002.

GROVES, F.D., GRIDLEY, G., WACHOLDER, S. et al. Infant vaccinations and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia in the USA. **British Journal of Cancer**. v. 81; p. 175–178, 1999.

HAGAN, I. M.; BRIDGE, A. J.; MORPHEW, M.; BARTLLET, R. Cell cycle control and mitotic spindle. **Br J Cancer**. v. 1, 80 suppl; p.6-13, 1999.

HJALGRIM, L. L.; MADSEN, H. O.; MELBYE, M.; et al. Presence of clone specific markers at birth in children with acute lymphoblastic leukemia. **Br J Cancer**, v. 97, p. 994–999, 2002.

HUGHES, A. M.; LIGHTFOOT, T.; SIMPSON, J. et al., On behalf of the United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. Allergy and risk of childhood leukaemia: Results from the UKCCS. **Int. J. Cancer**, v. 121, p. 819–824, 2007.

IARC. International Incidence of Childhood Cancer. IARC Scientific Publications: Lyon, p. 1–39, 1998.

II Consenso Brasileiro sobre Rinites. **Rev Bras Alerg Imunopatol**, v.29(1), p.29-59, 2006.

INFANTE-RIVARD, C., FORTIER, I.; OLSON, E. Markers of infection, breast-feeding and childhood acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Cancer**. v. 83; p. 1559–1564, 2000.

INFANTE-RIVARD, C.; JACQUES, L. Empirical study of parental recall bias. **Am J Epidemiol**. v.152; p.480–486, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA - SISBASEPOP: **Sistema de Registro de Câncer de Base Populacional** [programa de computador] versão 5.3. Rio de Janeiro: INCA; 2003.

ISA, V.; PRIFTAKIS, P.; BROLIDEN, K.; Gustafsson, B. Human parvovirus B19 DNA is not detected in Guthrie cards from children who have developed acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 42(4), p. 357–360, April 2004.

JOURDAN-DA SILVA, N.; PEREL, Y.; MECHINAUD, F., et al. Infectious diseases in the first year of life, perinatal characteristics and childhood acute leukaemia. **British Journal of Cancer**. v. 90, p. 139– 145, 2004.

KAY, A. B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 344(1), p. 30-7, 2001.

KERSEY, J. H.; SHAPIRO, R. S.; FILIPOVICH, A. H. Relationship of immunodeficiency to lymphoid malignancy. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 7(5 suppl), p. S10–S12, 1988.

KINLEN, L. J.; BALKWILL, A. Infective cause of childhood leukaemia and wartime population mixing in Orkney and Shetland, Uk. **Lancet**, v. 357, p. 858, 2001.

KINLEN LJ. Infective cause of childhood leukaemia. **Lancet**, V. 1, P.378–379, 1989.

KINLEN, L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. **Lancet**. v. 2(8624); p.1323–1327, 1988.

KINLEN, L. J.; PETRIDOU, E. Childhood leukaemia and rural population mixing: Greece, Italy and other countries. **Cancer Causes and Control**. v.6; p. 445 -450, 1995.

KINLEN, L. J.; DICKSON, M.; STILLER, C. A. Childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma near large rural construction sites, with a comparison with Sellafield nuclear site. **BMJ**. v. 301; p.763-768, 1995.

- KINLEN, L. J.; O'BRIEN, F.; CLARKE, K.; BALKWILL, A.; MATTHEWS, F. Rural population mixing and childhood leukaemia: effects of the North Sea oil industry in Scotland, including the area near Dounreay nuclear site. **BMJ.** v. 306; p.743-748, 1993.
- KRAMÁROVÁ, E.; STILLER, C. A.; FERLAY, J.; PARKIN, D. M.; DRAPER, G. J.; MICHAELIS, J.; NEGLIA, J.; QURESHI, S. Classificação internacional do câncer na infância 1996. IARC Relatório Técnico N 29. Rio de Janeiro: INCA,1999.
- KUNZ B, ORANJE A.P, LABRÈZE L, STALDER J.F, RING J, TAÏEB A. Clinical Validation and Guidelines for the SCORAD Index: Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. **Dermatology**, v.195, p.10-19, 1997.
- LAITINEN, L. A.; HEINO, M.; LAITINEN, A. et al. Damage of epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. **Am Ver Respir Dis**, v. 131, p. 599-606, 1985.
- LANCASHIRE, R. J.; SORAHAN, T. Breastfeeding and childhood cancer risks: OSCC data. **British Journal of Cancer**, v.88, p.1035–1037,
- LEE, R.G. et al. Wintrobe Hematologia Clínica I Ed. São Paulo: Manole, 1998.
- LEHTINEN, M.; KOSKELA, P.; OGMUNDSDOTTIR, H. M.; et al. Maternal herpes virus infections and risk of acute lymphoblastic leukemia in the offspring. **American Journal of Epidemiology**. v. 158; p.207–213, 2003.
- LEUNG, L. Y.; BIEBER, T. Atopic dermatitis. **Lancet**, v. 361, p. 151-60, 2003.
- LEWIS, M.; RAMSAY, D. S. Developmental change in infants' responses to stress. **Child Dev.**, v. **66**, p.657–670, 1995.
- LINABERY, A. M.; JUREK, A. M.; DUVAL, S.; ROSS, J. A. The Association Between Atopy and Childhood/Adolescent Leukemia: A Meta Analysis. **Am J Epidemiol.**; v. 171, p. 749–764, 2010.
- LINDBLOM, A.; LILJEGREN, A. Regular review: Tumours markers in malignancies. **BMJ**. v. 320; p. 424-7, 2000.
- LINET, M. S.; MCCAFFREY, L. D.; HUMPHREY, R. L.; et al,. Chronic lymphocytic leukemia and acquired disorders affecting the immune system: a case-control study. **J Natl Cancer Inst.**, v. **77**, p. 371-16, 1986.
- LINET, M. S.; HARLOW, S. D.; MCLAUGHLIN, J. K. A case-control study of multiple myeloma in whites: chronic antigenic stimulation, occupation, and drug use. **Cancer Res.** v. 47; p.2978–2981, 1987.
- LITTLE, J. Epidemiology of childhood cancer. Lyon: IARC;. (Scientific Publications; no.149), p. 206-41, 1999.

- Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, p. 3-14, 1998.
- MACKENZIE, J.; GREAVES, M. F.; EDEN, T. O.; et al. The putative role of transforming viruses in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 91(2), p. 240–243, 2006.
- MAGALHÃES, I. Q.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. P.; BENNETT, C. A et al. TELAML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. **Br J Haematol**. v.111; p. 204-207, 2000.
- MALKIN, D. Cancer of childhood. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practice of oncology. 5th ed. New York: Lippincott-Raven. p. 2083-91, 1997.
- MARKIEWICZ, M. A.; GAJEWSKI, T. F. The immune system as antitumor sentinel: molecular requirements for an anti-tumor immune response. **Crit Rev Oncog**, v. 10(3), p. 247–260, 1999.
- MCKINNEY, P. A.; CARTWRIGHT.; R.A., SAIU, J. M. et al. The inter-regional epidemiological study of childhood cancer (IRESCC): a case-control study of aetiological factors in leukaemia and lymphoma. **Archives of Disease in Childhood**, v. 62, p. 279–287, 1987.
- MCKINNEY, P.A., JUSZCZAK, E., FINDLAY, E., SMITH, K. & THOMSON, C.SPre- and perinatal risk factors for childhood leukaemia and other malignancies: a Scottish case control study. **British Journal of Cancer**. v.80, p. 1844–1851, 1999.
- MCNALLY, R. J.; Q.; EDEN, T. O. B. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. **British Journal of Haematology**. v.127, p. 243–263, 2004.
- MURRAY, L.; MCCARRON, P.; BAILIE, K. et al. Association of early life factors and acute lymphoblastic leukaemia in childhood: historical cohort study. **British Journal of Cancer**. v. 86; p. 356–361, 2002.
- NAUMBERG, E.; BELLOCCO, R.; CNATTINGIUS, S.; JONZON, A.; EKBOM, A. Perinatal exposure to infection and risk of childhood leukaemia. **Medical and Pediatric Oncology**. v. 38, p.391–397, 2002.
- NISHI, M.; MIYAKE, H. A case-control study of non-T cell acute lymphoblastic leukaemia of children in Hokkaido, Japan. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 43, p. 352–355, 1989.
- PARKIN, D. M.; KRAMÁROVÁ, E. Materials and methods. In: Parkin DM, Kramárová E, Draper GJ, Masuyer E, Michaelis J, Neglia J, et al. International incidence of childhood cancer. Lyon (France): INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, p.3-14, 1998.

- PARKIN, D. M.; STILLER, C. A.; DRAPER, G. J.; BIEBER, C. A.; TERRACINI, B.; YOUNG, J. L. Editors International incidence of childhood cancer. Lyon (France): International Agency for Research Cancer; (IARC. Scientific Publications nº87), 1988.
- PERRILLAT, F.; CLAVEL, J.; JAUSSENT, I. et al. Breast-feeding, fetal loss and childhood acute leukaemia. *European Journal of Pediatrics*, 2003;161, 235–237, 2002b.
- PETRIDOU, E.; TRICHOPOULOS, D.; KALAPOTHAKI, V., et al. The risk profile of childhood leukaemia in Greece: a nationwide case-control study. ***British Journal of Cancer***. v. 76; p.1241–1247, 1997.
- PONTE, E. V.; RIZZO, J.A.; CRUZ A. A Inter-relação entre asma, atopia e infecções helmínticas. ***J Bras Pneumol***, v. 33(3), p. 335-342, 2007.
- PRESCOTT, S. L.; MACAUBAS, C.; SMALLACOMBE, T. Development of Allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. ***Lancet***, v. 353(9148), p. 196-200, 1999.
- REIS, R. S.; SANTOS, M. O. E.; THULER, L. C. S. Incidência de tumores pediátricos no Brasil. ***Revista Brasileira de Cancerologia***, v. 53(1), p. 5-15, 2007.
- Rinite Alérgica . *Projeto Diretrizes*. Associação Médica Brasileira/Conselho Federal de Medicina, 2002.
- ROBINSON, D. S. The Th1 and Th2 concept in atopic allergic disease. ***Chem Immunol.***; v. 78, p. 50–61, 2000.
- RUDANT, J.; ORSI, L.; MENEGAUX, F.; et al. Childhood Acute Leukemia, Early Common Infections, and Allergy: The ESCALE Study. ***Am. J. Epidemiol.***, v. 172(9), p. 1015-1027, 2010.
- SCHMIEGELOW, K.; VESTERGAARD, T.; NIELSEN, S. M.; HJALGRIM, H. Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: the adrenal hypothesis. ***Leukemia***. v. 22; p. 2137–2141, 2008.
- SCHULZ, K. F.; GRIMES, D. A. Case-control studies: research in reverse. ***Lancet***. v.359; p.431–434, 2002.
- SCHUZ, J.; MORGAN, G.; BOHLER, E.; KAATSCH, P.; MICHAELIS, J.; Atopic disease and childhood acute lymphoblastic leukemia. ***Int J Cancer***. v. 105; p. 255–260, 2003.
- SHANKS, N.; WINDLE, R.J.; PERKS, P. A.; HARBUZ, M. S. et al. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamicpituitary- adrenal function and predisposition to inflammation. ***Proc Natl Acad Sci USA***, v. 97, p. 5645–5650, 2000.
- SHERMAN, B.; WYSHAM, C.; PFOHL, B. Age-related changes in the circadian rhythm of plasma cortisol in man. ***J Clin Endocrinol Metab.***, v. 61, p. 439–443, 1985.

SHIRAKAWA, T.; ENOMOTO, T.; SHIMAZU, S.; HOPKIN, J. M. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. **Science**, v. 275(5296), p. 77-9, 1997.

SMITH, M. A. Considerations on a possible viral etiology for B precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood. **Journal of Immunotherapy**, v. 20, p. 89–100, 1997.

SMITH, M. A.; SIMON, R.; STRICKLER, H. D.; et al. Evidence that childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with an infectious agent linked to hygiene conditions. **Cancer Causes and Control**, v. 9, p. 285–298, 1998.

SMITH, M. A.; STRICKLER, H. D.; GRANOVSKY, M.; et al. Investigation of leukemia cells from children with common acute lymphoblastic leukemia for genomic sequences of the primate polyomaviruses JC virus, BK virus, an simian virus 40. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 33, p. 441–443, 1999.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE DERMATOLOGIE. Consensus Conference Management of chronic urticaria. **Eur J Dermatol.**, v.13, p.385-92, 2003

SOUZA, J.M; COELHO, C.J. Leucemias e leucoses. In XXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, Porto Alegre, Brasil, 1998.

STEWART, A.; WEBB, J.; HEWITT, D. A survey of childhood malignancies. **BMJ**, v. 1, p. 1495-508, 1958.

STILLER, C. A. Epidemiology and genetics of childhood cancer. **Oncogene**, v. 23, p. 6429-6444, 2004.

STILLER, C. A.; PARKIN, D. M. Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. **Br Med Bull** v.52; p.682–703, 1996.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene and household size. **BMJ**, v. 299(6710), p. 1259-60, 1989.

TAYLOR, G. M.; et al. Genetic susceptibility to childhood commum acute lymphoblastic leukemia is associated with polymorphic peptide-binding pocket profiles in HLA DPB1\*0201. **Hum Mol. Genet**, v. 11, p. 1585-1597, 2002.

THE EAACI / GALEN / EDF / WAO guideline: definition, classification and diagnosis of urticaria. **Allergy**, v.64 Issue 10, p.1417 – 1426, Oct 2009.

TURNER, M. C.; CHEN, Y.; KREWSKI, D.; et al. An overview of the association between allergy and cancer. **Int J Cancer**, v. 118(12), p.3124–3132, 2006.

UKCCS Investigators. Breastfeeding and childhood cancer. **British Journal of Cancer**. v. 85; p. 1685–1694, 2001.

VASCONCELOS, G. M.; KANG, M.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; et al. Adenovirus detection in Guthrie cards from paediatric leukaemia cases and controls. *Br J Cancer*, v. 99(10), p. 1668–1672, 2008.

VON MUTIUS, E.; WEILAND, S.K.; FRITZSCH, C.; DUHME, H.; KEIL, U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet*, v. 351(9106), p. 862-6, 1998.

WANG, H.; DIEPGEN, T. L. Is atopy a protective or a risk factor for cancer? A review of epidemiological studies. *Allergy*. v. 60 p.1098 –1111, 2005.

WEN, W.; SHU, X. O.; LINET, M. S.; NEGLIA, J.P.; POTTER, J. D.; TRIGG, M. E.; et al. Allergic disorders and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia (United States). *Cancer Causes Control*. v.11; p. 303– 307, 2000.

WIEMELS, J. L.; CAZZANIGA, G.; DANIELLI, M.; et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*, v. 354, p. 1499–1503, 1999.

WIEMELS, J. L.; FORD, A. M.; VAN WERING, E. R.; POSTMA, A.; GREAVES, M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood*, v. 94, p. 1057–1062, 1999.

WILSON, A. M.; DEMPSEY, O. J.; SIMS, E. J.; LIPWORTH, B. J. A comparison of topical budesonide and oral montelukast in seasonal allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy*, v. 31(4), p. 616-24, 2001.

Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*, v. 351(9111), p. 1225-32, 1998.

## APÊNDICES

Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido



UNVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
 CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
 PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE  
*Associação entre alergia prévia e o desenvolvimento de leucemia linfóide aguda na infância e adolescência*

### APÊNDICE A

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- 1- Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa:  
**ASSOCIAÇÃO ENTRE ALERGIA PRÉVIA E O DESENVOLVIMENTO DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA**
- 2- A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS: A existência dessa pesquisa se faz necessária para caracterizar possíveis exposições ambientais com o desenvolvimento de leucemias na infância. O objetivo desse projeto é estabelecer a relação existente entre alergia prévia e o desenvolvimento de leucemias agudas na infância e adolescência. O (os) procedimento(s) de coleta de material e de dados serão da seguinte forma: será coletada uma pequena amostra de sangue para pesquisa em laboratório e em seguida será aplicado um questionário com perguntas relacionadas a mãe e ao filho.
- 3- DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS: Existe um pequeno desconforto e risco mínimo para seu filho que será submetido a punção venosa periférica para retirada de uma amostra de sangue com profissional devidamente qualificado para tal atividade.
- 4- FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSINTÊNCIA: para as crianças e adolescentes já diagnosticados com o agravo, o seu processo normal de acompanhamento e tratamento não sofrerá nenhuma interferência da pesquisa e caso alguma patologia seja detectada durante o estudo, seu filho será devidamente encaminhado para tratamento com profissionais especializados

- 5- GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:** Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.
- 6- O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade e do seu filho com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da avaliação clínica e laboratorial da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. O nome do seu filho ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você e os dados do menor, que você é responsável, não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Curso de Pós–graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal de Pernambuco e outra será fornecida a você.
- 7- CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS:** A participação no estudo não acarretará custos para você e seu filho e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional caso haja gasto de transporte, de alimentação.
- 8- DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE**  
 Eu, \_\_\_\_\_ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O professor orientador Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho e a médica pesquisadora JOACILDA DA CONCEIÇÃO NUNES certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.
- 9- Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a médica JOACILDA DA CONCEIÇÃO NUNES o(a) professor(a) orientador(a) DR.EMANUEL SÁVIO CAVALCANTI SARINHO no telefone (\_83\_) 9342-9663/\_ ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Paraíba, no qual a pesquisa está cadastrada contendo todas as informações sobre o pesquisador.
- 10- Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante OU	Data

---

**DIGITAL**

---

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

---

Apêndice B – Questionário para identificação da exposição nos casos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE  
*Associação entre alergia prévia e o desenvolvimento de leucemia linfóide aguda na infância e adolescência*

APÊNDICE B

**QUESTIONÁRIO PARA IDENTIFICAÇÃO DA EXPOSIÇÃO NOS CASOS**

Número do questionário

NUM

--	--	--	--

NOME: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ idade: \_\_\_\_\_

IDADE

--	--

Escolaridade: \_\_\_\_\_

Peso ao nascer

1-<2.500 g [ ]

2->2.500 g [ ]

PESONASC

--

**DADOS DA MÃE**

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

IDADEMAT

--	--

**Escolaridade materna**

Ens. Fundam 1 [ ] 1 – 2 – 3 – 4

ESCOLA

--	--

Ens. Fundam 2 [ ] 1 – 2 – 3 - 4

Ens. Médio [ ] 1 – 2 – 3

Ens. Superior [ ] 1 – 2 – 3 - 4 – 5 – 6

**Número de pessoas no domicílio**

PESSOAS

Codificação 1/2/3/4

1-até 3 pessoas no domicílio [ ]

2-entre 4 e 6 pessoas no domicílio [ ]

3-entre 7 e 10 pessoas no domicílio [ ]

4 acima de 10 pessoas no domicílio [ ]

**Infecções materna durante a gestação**

**Codificação 1/2/3/4/5**

1-Doença febril com rash cutâneo na gravidez [ ]

INFECMAT

2-Infecção urinária na gravidez [ ]

3-Outro tipo de infecção na gravidez [ ]

4-Nenhum tipo de infecção na gravidez [ ]

5-Mais de um tipo de infecção na gravidez [ ]

**VACINAÇÃO DA CRIANÇA/ADOLESCENTE**

Codificação 1/2

1- Calendário vacinal básico completo [ ]

VACINA

2- Calendário vacinal básico incompleto [ ]

**ALEITAMENTO MATERNO:**

codificação 1-não 2/3/4 sim e depende do tempo e se exclusivo ou não

1-A sua criança ou adolescente mamou no peito? NÃO [ ]

ALEIT

2-Se sim mamou exclusivo > de 3 meses [ ]

3-Se sim mamou exclusivo > ou igual a 6 meses [ ]

4-Se sim, mamou com aleitamento misto [ ]

**CARACTERIZANDO A EXPOSIÇÃO:**

**Perguntar aos pacientes (ou pais) para se estabelecer o diagnóstico clínico de asma:**

ASMA

1 – Apresenta **qualquer um desses** sinais ou sintomas abaixo:

A-Tem ou teve episódios recorrentes de falta de ar (dispnéia)? [ ]sim [ ] não

B-Tem ou teve crises ou episódios recorrentes de chiado no peito (sibilância)?

[ ]sim [ ]não

C-Tem tosse persistente, particularmente à noite ou ao acordar? [ ]sim [ ]não

D-Acorda por tosse ou falta de ar? [ ]sim [ ]não

E-Tem tosse, sibilância ou aperto no peito após atividade física? [ ]sim [ ]não

F-Apresenta tosse, sibilância ou aperto no peito após exposição a alérgenos como mofo, poeira domiciliar ou animais, irritantes como fumaça de cigarro ou perfumes, ou após resfriados ou alterações emocionais como riso ou choro?

[ ]sim [ ]não

G-Usa alguma medicação quando os sintomas ocorrem, e com que freqüência? Há alívio dos sintomas após o uso de medicação? [ ]sim [ ]não

H-Tem antecedentes familiares de doenças alérgicas ou asma? [ ]sim [ ]não

I-Tem ou teve sintomas de doenças alérgicas (especialmente rinite ou dermatite atópica)? [ ]sim [ ]não

2-Não apresenta nenhum desses sinais ou sintomas acima

Perguntar aos pacientes (ou pais) para se estabelecer o **diagnóstico clínico de rinite alérgica:**

RINITE

1-Apresenta qualquer um desses sinais ou sintomas abaixo?

A-Apresenta prurido (coceira) no nariz com certa freqüência? [ ]sim [ ]não

B-Apresenta queixa de obstrução nasal com freqüência? [ ]sim [ ]não

C-Tem espirros com muita freqüência, principalmente ao acordar e quando se expõe a odores fortes, ar frio, perfumes e certos ambientes? [ ]sim [ ]não

D-Tem coriza, semelhante a um resfriado, mais freqüentemente do que as outras pessoas? [ ]sim [ ]não

E-Apresenta alguns desses sintomas: coceira no ouvido, nos olhos ou história de outras alergias? [ ]sim [ ]não

2-Não apresenta nenhum desses sinais ou sintomas acima?

Perguntar aos pacientes (ou pais) para se estabelecer o **diagnóstico clínico de urticária**

URTIC

1-As respostas A, B e C foram positivas?

A-Apresenta história de lesões na pele semelhante ao contato com urtiga?

[ ]sim [ ]não

B-Essas lesões se apresentaram com duração rápida, não permanecendo mais de três dias, embora pudesse aparecer de novo?

[ ]sim [ ]não

C-As lesões eram acompanhadas de relevo, coceira ou queimor, mudavam de lugar com facilidade e apareciam e desapareciam sem mudar de cor ou deixar marcas?

[ ]sim [ ]não

D-As lesões na pele apareciam de forma generalizada e às vezes com edema nos lábios, orelhas ou algum outro lugar? [ ]sim [ ]não

2-As respostas A, B e C acima não foram positivas

Perguntar aos pacientes (ou pais) para se estabelecer o **diagnóstico clínico**  
**dermatite atópica:**

**DERMATOP**

1-As respostas abaixo foram sim

A-Apresenta coceira na pele, mais freqüentemente em regiões de dobras, com vermelhidão, bolhas, pele ressecada **sem nenhuma** história de contato com substâncias, vestimentas, cosméticos ou outros? [ ]sim [ ]não

B-Essas lesões permanecem de forma crônica, mesmo sem contato algum com substâncias e/ou vestimentas e cosméticos? [ ]sim [ ]não

C-Esse quadro já foi identificado como dermatite atópica e tratado?  
[ ]sim [ ] não

Usou medicações para tratar a lesão? [ ]sim [ ]não

Quais ? \_\_\_\_\_

2-As respostas A, B e C acima foram negativas

Uso de corticóides para qualquer alergia dessas ou qualquer causa?

**CORTIC**

Qual(is)\_\_\_\_\_

1-Inalatório(bombinha) [ ]0-2meses por ano [ ] 3-5 meses/ano [ ]>de 5 meses/ano

2-Oral [ ] 0-2 vezes/ano [ ]3 a 5 vezez/ano [ ]> 5vezes/ano

3-Intramuscular [ ] 0-2 vezez/ano [ ] 3-5 vezes/ano [ ]>5vezes/anos

4-Pulsoterapia endovenosa [ ] 1vez/ano [ ]>2vezes/ano

### **INFORMAÇÕES ADICIONAIS RELATIVAS A EXPOSIÇÃO:**

Dosagem de IgE total:\_\_\_\_\_

ASLO:\_\_\_\_\_ PCR:\_\_\_\_\_

Sorologia para EBV: IgM\_\_\_\_\_ e IgG:\_\_\_\_\_

Sorologia para parvovírus B19: IgG:\_\_\_\_\_

Dosagem de cortisol sérico:\_\_\_\_\_

Dosagem de ACTH:\_\_\_\_\_

### **CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA:**

Classificação da doença:\_\_\_\_\_

Manifestação(ões) iniciais:\_\_\_\_\_

Tempo de diagnóstico:\_\_\_\_\_

Mielograma:\_\_\_\_\_

Imunofenotipagem:\_\_\_\_\_

---

Estudo citogenético ou cariótipo:

---

Tratamento:

---

---

## Apêndice C – Questionário para identificação da exposição nos controles



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE  
***Associação entre alergia prévia e o desenvolvimento de leucemia linfóide aguda na infância e adolescência***

## APÊNDICE C

## QUESTIONÁRIO PARA IDENTIFICAÇÃO DA EXPOSIÇÃO NOS CONTROLES

Número do questionário

NUM

--	--	--	--

NOME: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ idade: \_\_\_\_\_

IDADE

--	--

Escolaridade: \_\_\_\_\_

Peso ao nascer

1-&lt;2.500 g [ ]      2-&gt;2.500 g [ ]

PESONASC

--

## DADOS DA MÃE

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

IDADEMAT

--	--

**Escolaridade materna**

Ens. Fundam 1 [ ]      1 – 2 – 3 – 4

ESCOLA

Ens Fundam 2 [ ]      1 – 2 – 3 - 4

--	--

Ens. Médio [ ] 1 – 2 – 3  
 Ens. Superior [ ] 1 – 2 – 3 - 4 – 5 – 6

**Número de pessoas no domicílio**

PESSOAS

Codificação 1/2/3/4

- 1-até 3 pessoas no domicílio [ ]
- 2-entre 4 e 6 pessoas no domicílio [ ]
- 3-entre 7 e 10 pessoas no domicílio [ ]
- 4 acima de 10 pessoas no domicílio [ ]

**Infecções materna durante a gestação**

Codificação 1/2/3/4/5

- |  |          |                          |
|--|----------|--------------------------|
| 1-Doença febril com rash cutâneo na gravidez [ ] | INFECMAT | <input type="checkbox"/> |
| 2-Infecção urinária na gravidez [ ]              |          |                          |
| 3-Outro tipo de infecção na gravidez [ ]         |          |                          |
| 4-Nenhum tipo de infecção na gravidez [ ]        |          |                          |
| 5-Mais de um tipo de infecção na gravidez [ ]    |          |                          |

**VACINAÇÃO DA CRIANÇA/ADOLESCENTE**

Codificação 1/2

- |   |        |                          |
|---|--------|--------------------------|
| 3- Calendário vacinal básico completo [ ]   | VACINA | <input type="checkbox"/> |
| 4- Calendário vacinal básico incompleto [ ] |        |                          |

**ALEITAMENTO MATERNO:**

codificação 1-não 2/3/4 sim e depende do tempo e se exclusivo ou não

- |  |       |                          |
|--|-------|--------------------------|
| 1-A sua criança ou adolescente mamou no peito? NÃO [ ] | ALEIT | <input type="checkbox"/> |
| 2-Se sim mamou exclusivo > de 3 meses [ ]              |       |                          |
| 3-Se sim mamou exclusivo > ou igual a 6 meses [ ]      |       |                          |
| 4-Se sim, mamou com aleitamento misto [ ]              |       |                          |

**CARACTERIZANDO A EXPOSIÇÃO:**

Perguntar aos pacientes (ou pais) para se estabelecer o diagnóstico clínico de asma:

ASMA

1 – Apresenta **qualquer um desses** sinais ou sintomas abaixo:

A-Tem ou teve episódios recorrentes de falta de ar (dispnéia)? [ ]sim [ ]não  
 B-Tem ou teve crises ou episódios recorrentes de chiado no peito (sibilância)?  
 [ ]sim [ ]não  
 C-Tem tosse persistente, particularmente à noite ou ao acordar? [ ]sim [ ]não  
 D-Acorda por tosse ou falta de ar? [ ]sim [ ]não  
 E-Tem tosse, sibilância ou aperto no peito após atividade física? [ ]sim [ ]não  
 F-Apresenta tosse, sibilância ou aperto no peito após exposição a alérgenos como mofo, poeira domiciliar ou animais, irritantes como fumaça de cigarro ou perfumes, ou após resfriados ou alterações emocionais como riso ou choro?  
 [ ]sim [ ]não  
 G-Usa alguma medicação quando os sintomas ocorrem, e com que freqüência? Há alívio dos sintomas após o uso de medicação? [ ]sim [ ]não  
 H-Tem antecedentes familiares de doenças alérgicas ou asma? [ ]sim [ ]não  
 I-Tem ou teve sintomas de doenças alérgicas (especialmente rinite ou dermatite atópica)? [ ]sim [ ]não  
 2-Não apresenta nenhum desses sinais ou sintomas acima

Perguntar aos pacientes (ou pais) para se estabelecer o **diagnóstico clínico de rinite alérgica:**

RINITE

1-Apresenta qualquer um desses sinais ou sintomas abaixo?  
 A-Apresenta prurido (coceira) no nariz com certa freqüência? [ ]sim [ ]não  
 B-Apresenta queixa de obstrução nasal com freqüência? [ ]sim [ ]não  
 C-Tem espirros com muita freqüência, principalmente ao acordar e quando se expõe a odores fortes, ar frio, perfumes e certos ambientes? [ ]sim [ ]não  
 D-Tem coriza, semelhante a um resfriado, mais freqüentemente do que as outras pessoas? [ ]sim [ ]não  
 E-Apresenta alguns desses sintomas: coceira no ouvido, nos olhos ou história de outras alergias? [ ]sim [ ]não  
 2-Não apresenta nenhum desses sinais ou sintomas acima?

Perguntar aos pacientes (ou pais) para se estabelecer o **diagnóstico clínico de urticária**

URTIC

1-As respostas A, B e C foram positivas?  
 A-Apresenta história de lesões na pele semelhante ao contato com urtiga?  
 [ ]sim [ ]não  
 B-Essas lesões se apresentaram com duração rápida, não permanecendo mais de três dias, embora pudesse aparecer de novo?  
 [ ]sim [ ]não  
 C-As lesões eram acompanhadas de relevo, coceira ou queimor, mudavam de lugar com facilidade e apareciam e desapareciam sem mudar de cor ou deixar marcas?  
 [ ]sim [ ]não  
 D-As lesões na pele apareciam de forma generalizada e às vezes com edema nos lábios, orelhas ou algum outro lugar? [ ]sim [ ]não  
 2-As respostas A, B e C acima não foram positivas

Perguntar aos pacientes (ou pais) para se estabelecer o **diagnóstico clínico dermatite atópica**:

**DERMATOP**

1-As respostas abaixo foram sim

A-Apresenta coceira na pele, mais freqüentemente em regiões de dobras, com vermelhidão, bolhas, pele ressecada **sem nenhuma** história de contato com substâncias, vestimentas, cosméticos ou outros? [ ]sim [ ]não

B-Essas lesões permanecem de forma crônica, mesmo sem contato algum com substâncias e/ou vestimentas e cosméticos? [ ]sim [ ]não

C-Esse quadro já foi identificado como dermatite atópica e tratado?

[ ]sim [ ] não

Usou medicações para tratar a lesão? [ ]sim [ ]não

Quais ? \_\_\_\_\_

2-As respostas A, B e C acima foram negativas

Uso de corticóides para qualquer alergia dessas ou qualquer causa?

**CORTIC**

Qual(is)\_\_\_\_\_

1-Inalatório(bombinha) [ ]0-2meses por ano [ ] 3-5 meses/ano [ ]>de 5 meses/ano

2-Oral [ ] 0-2 vezes/ano [ ]3 a 5 vezez/ano [ ]> 5vezes/ano

3-Intramuscular [ ] 0-2 vezez/ano [ ] 3-5 vezes/ano [ ]>5vezes/anos

4-Pulsoterapia endovenosa [ ] 1vez/ano [ ]>2vezes/ano

### **INFORMAÇÕES ADICIONAIS RELATIVAS A EXPOSIÇÃO:**

Dosagem de IgE total:\_\_\_\_\_

ASLO:\_\_\_\_\_ PCR:\_\_\_\_\_

Sorologia para EBV: IgM\_\_\_\_\_ e IgG:\_\_\_\_\_

Sorologia para parvovírus B19: IgG:\_\_\_\_\_

Dosagem de cortisol sérico:\_\_\_\_\_

Dosagem de ACTH:\_\_\_\_\_

## ANEXOS

### ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY - HULW  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS - CEP

#### PARECER CONSUBSTANIADO

##### *I - Identificação*

**Título do projeto:** ASSOCIAÇÃO ENTRE ALERGIA PRÉVIA E DESENVOLVIMENTO DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA.

**CAAE:**0088.0.126.172-09

**Classificação no fluxograma:** Grupo III - FR: 277221

**Área de conhecimento:** Ciências da Saúde- Medicina - Epidemiologia

**Finalidade:** Tese de Doutorado em Saúde da Criança e Adolescente - UFPE

**Pesquisadora responsável:** Joacilda da Conceição Nunes

**Orientador:** Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

**Local de realização:** Centro de Oncologia do Hospital Universitário Osvaldo Cruz - UPE/PE e Hospital Napoleão Laureano - João Pessoa/PB.

**Protocolo no CEP:** Nº 082/09

**Data de recebimento no CEP-HULW:** 14/07/2009

**Data da apreciação:** 21/07/2009

**Apoio:** CNPQ

##### *II - Sumário do projeto*

O objeto de estudo envolve a Leucemia Linfóide em crianças e adolescentes e os potenciais fatores de risco e proteção associados a essa enfermidade. Sabe-se que o desenvolvimento de leucemias abrange uma série de eventos complexos, com componentes genéticos e ambientais. Dentre eles, marcadores preditivos de risco, como é o caso do complexo de histocompatibilidade maior, através da expressão de alguns haplótipos, têm sido descritos como possíveis maçadores de risco de leucemia Linfóide em crianças.

##### *III - Objetivos principais:*

Estabelecer a relação de risco existente entre o desenvolvimento de Leucemia Linfóide Aguda na infância e alergia prévia, além de identificar os haplótipos do lócus DR4 da classe B do sistema HLA e suas possíveis relações de risco com o desenvolvimento de LLA em infantes.

##### *III - Metodologia*

Estudo epidemiológico retrospectivo, do tipo caso-controle, de base populacional, envolvendo 206 crianças com diagnóstico de leucemia Linfóide Aguda e 206 controles normais pareadas por idade e sexo e os controles selecionados na mesma área de estudo. Serão analisadas amostras de material biológico para identificação molecular do lócus DR4 do sistema HLA, bem como aplicação de um questionário para caracterização das alergias, tais como asma, rinite alérgica, eczema de contato, dermatite atópica e urticária. Os dados serão analisados tendo como variável de desfecho a Leucemia Linfóide Aguda e serão utilizados a razão de produtos cruzados e o intervalo de confiança de 95%.

#### **IV - Aspectos éticos**

Aspectos relevantes para avaliação	Situação
<b>1. Título</b>	Adequado
<b>2. Objetivos</b>	Adequados
<b>3. Método</b>	
• <i>Tipo de projeto</i>	Pesquisa em seres humanos
• <i>Delineamento</i>	Adequado
• <i>Cálculo do tamanho da amostra</i>	Adequado
• <i>Participantes pertencentes a grupos especiais</i>	Sim - crianças
• <i>Critérios de inclusão e exclusão</i>	Adequados
• <i>Relação risco-benefício</i>	Adequada
• <i>Uso de placebo</i>	Não
• <i>Período de suspensão de uso de drogas(wash out)</i>	Não se aplica
• <i>Monitoramento da segurança e dados</i>	Adequado
• <i>Armazenamento de material biológico</i>	Adequado
• <i>Instrumento de coleta de dados</i>	Adequado
• <i>Plano de análise dos dados</i>	Adequado
• <i>Privacidade e confidencialidade</i>	Adequada
• <i>TCLE</i>	Adequado às normas e diretrizes Resolução 196/CNS
<b>4. Cronograma</b>	Adequado
<b>5. Orçamento</b>	
• <i>Solicita recursos à instituição</i>	Não
• <i>Fonte de financiamento</i>	CNPQ
<b>6. Referências bibliográficas</b>	Adequada - estilo Vancouver
<b>7. Currículo lattes</b>	Entregue
<b>8. Carta de anuência</b>	Entregue (2)

Considerando que os procedimentos adotados por esta pesquisa não causarão riscos previsíveis para os indivíduos pesquisados e que a participação das pessoas selecionadas na amostra é inteiramente voluntária,

Considerando que todos os indivíduos poderão a qualquer momento desistir da pesquisa sem sofrer nenhum dano ou prejuízo e que por ocasião da publicação dos resultados da pesquisa será assegurado o anonimato dos participantes;

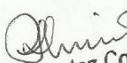
Considerando, ainda, que o projeto se encontra metodologicamente estruturado e de acordo com os aspectos éticos para a realização de pesquisas envolvendo seres humanos, recomendados pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, somos do parecer favorável à aprovação.

**PARECER DO CEP/HULW: APROVADO**

**Diante do exposto, o CEP/HULW solicita**

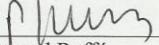
1. Comunicar qualquer alteração no projeto de pesquisa e no TCLE
2. Enviar um resumo sucinto dos resultados em CD, no final da pesquisa.

João Pessoa, 22 de Julho de 2009.

  
 Iaponira Cortez Costa de Oliveira  
 Coordenadora do Comitê de Ética  
 em Pesquisa - CEP/HULW

**Iaponira Cortez Costa de Oliveira**  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-HULW

## ANEXO B –AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DOS DADOS

		
<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS COMPLEXO HOSPITALAR HUOC/PROCAPE</b>		
<b>Reunião:</b> 23/02/2011	<b>Protocolo CEP – HUOC/PROCAPE:nº 005/2011</b>	
<p><b>Projeto:</b> Associação entre alergia prévia e desenvolvimento de leucemia linfóide aguda na infância e adolescência</p> <p><b>Pesquisador Principal:</b> Joacilda Da Conceição Nunes</p> <p><b>Resultado:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Projeto APROVADO pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB) Hospital Universitário Lauro Wanderley – HULW com o nº 082/2009 e como o CAAE: 0088.0.126.172-09 no dia 21/07/2009.</li> <li>• CIENTE para a pesquisa no Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) no serviço de oncologia pediátrica.</li> </ul>		
<b>Recife, 16/03/2011</b>		
 Ráquel Roffé Coordenadora CEP-HUOC/PROCAPE		
	Pavilhão Ovidio Montenegro – 1º andar Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE. Fone: (81) 3184.1460 – Fone/Fax: (81) 3184.1271 E-mail: cep_huoc.procape@yahoo.com.br	

## ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

19/05/12

[Imprimir](#)

**Assunto:** JACI Submission Confirmation  
**De:** J Allergy Clin Immun (jacistaff@njhealth.org)  
**Para:** joacildamed@yahoo.com.br;  
**Data:** Sábado, 19 de Maio de 2012 10:38

Joacilda Nunes  
Universidade Federal da Paraíba  
Genetics and Pediatrics  
Centro de Ciências Médicas  
Departamento de Pediatria e Genética  
Cidade Universitária  
Campus I  
João Pessoa, PB 58051-900  
BRAZIL

**TITLE:** Preceding History of Allergy and Acute Lymphoid Leukemia in Childhood and Adolescence  
**TYPE:** Original Article

Dear Dr. Nunes:

The Journal has received your submission. Thank you.

To track the progress of your manuscript and receive current information on its status, log in to the JACI electronic editorial system, Elsevier Editorial System (EES), as an Author. Your username is: joacilda

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/jaci/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/jaci/automail_query.asp)

Elsevier Editorial System (EES) is at <http://ees.elsevier.com/jaci/>.

Typically, decisions are rendered within 6 weeks of receipt of a manuscript. If you have not received notice of the Editors' decision within 8 weeks, or if you need to contact us regarding the manuscript, send a message to [jacistaff@njhealth.org](mailto:jacistaff@njhealth.org) and please refer to the manuscript number and title in your correspondence. You will receive an email answer within 1 business day.

Best regards,

The Editors of  
The Journal of Allergy and Clinical Immunology

## ANEXO D- INSTRUÇÕES DO JACI

TITLE PAGE

Page numbering

Original Article

Food allergens, immunotherapy, and receptor polymorphisms: A new understanding of  
complex relationships

The title of the submission should consist of no more than 15 words.

Frederick Austerlitz, BSc,<sup>a</sup> Judith Tuvim, MD,<sup>b</sup> Archibald Leach, PhD,<sup>a</sup> and Emmanuel Goldenberg, MD, PhD<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Department of Immunology, Zyxwvzyxwv Medical Center, Ridgeville, New York

<sup>b</sup>Division of Pediatric Allergy, Department of Medicine, Utsrqutsrq University Medical School,  
Kjhigfkjihg, The Netherlands

Line numbering should be continuous from the first page through the final page.

Corresponding author

Emmanuel Goldenberg, MD, PhD

Department of Immunology

Zyxwvzyxwv Medical Center

148 Bonnie Meadow Road

Ridgeville, NY

Telephone: 914-555-9876

Fax: 914-555-4321

E-mail: egoldenbergo1@abcde.edu

A telephone number, a fax number, and an e-mail address must be provided.

Declaration of all sources of funding: Frederick Austerlitz has consulting arrangements

with Gnxntxch/Nvxrtxs, Cxrxtgxc, GlxxxSmxthKlxnx, Infzlzmxm Pharmaceuticals, Dxy

Laboratories, Dxnvxx Technologies, and Schrxng-Plxxgh. Judith Tuvim has received grant

support from Dxy Laboratories, MxdxcxNvxx, Wyxth, Spxrcxr, Gnxntxch, Schrxng-Plxxgh,

Nvxrtxs, AstrxZnxcx, SkxPhxrmx, and Rxchx and is on the speakers' bureau for

GlxxxSmxthKlxnx and AstrxZnxcx. Emmanuel Goldenberg has served as an expert witness for

Lxmxcxrp Pharmaceutical Labs. Archibald Leach has no relationships to declare.

Word count: 3280

The number of words in the **body of the manuscript**  
(Introduction through Discussion)

**Abstract**

The **abstract** should begin on a new page.

**Background:** This is the 1st sentence of the Background paragraph of the Abstract. This is the 2nd sentence of the Background paragraph of the Abstract. This is the 3rd sentence of the Background paragraph of the Abstract. This is the 4th sentence of the Background paragraph of the Abstract.

**For an Original Article, the abstract should consist of no more than 250 words and should be structured exactly as follows:**  
**Background, Objective, Methods, Results, Conclusions.**

**Objectives:** This is the 1st sentence of the Objectives paragraph of the Abstract. This is the 2nd sentence of the Objectives paragraph of the Abstract. This is the 3rd sentence of the Objectives paragraph of the Abstract. This is the 4th sentence of the Objectives paragraph of the Abstract.

**Methods:** This is the 1st sentence of the Methods paragraph of the Abstract. This is the 2nd sentence of the Methods paragraph of the Abstract. This is the 3rd sentence of the Methods paragraph of the Abstract. This is the 4th sentence of the Methods paragraph of the Abstract.

**Results:** This is the 1st sentence of the Results paragraph of the Abstract. This is the 2nd sentence of the Results paragraph of the Abstract. This is the 3rd sentence of the Results paragraph of the Abstract. This is the 4th sentence of the Results paragraph of the Abstract.

**Conclusions:** This is the 1st sentence of the Conclusions paragraph of the Abstract. This is the 2nd sentence of the Conclusions paragraph of the Abstract. This is the 3rd sentence of the Conclusions paragraph of the Abstract.

Conclusions paragraph of the Abstract. This is the 4th sentence of the Conclusions paragraph of the Abstract.

**Clinical Implications**

The **Clinical Implications** paragraph should begin on a new page and should consist of no more than 30 words.

This is the 1st sentence that is to appear within the Clinical Implications box. This is the 2nd

sentence that is to appear within the Clinical Implications box.

**Capsule Summary**

The **Capsule Summary** should consist of no more than 35 words.

This is the 1st sentence of the Capsule Summary. This is the 2nd sentence of the Capsule Summary. This is the 3rd sentence of the Capsule Summary. Here's the 4th sentence of the Capsule Summary.

**Key words**

A **Key words list** is required.

Asthma, allergy, atopy, immunotherapy, polymorphism

**Abbreviations used**

ARIA: Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma

BAL: Bronchoalveolar lavage

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

MCP: Monocyte chemoattractant protein

NSAID: Nonsteroidal anti-inflammatory drug

**INTRODUCTION**

**The body of the manuscript should begin on a new page.**

This is the 1st sentence of the 1st paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 1st paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 1st paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 1st paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 1st paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article).

This is the 1st sentence of the 2nd paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 2nd paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 2nd paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 2nd paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 2nd paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article), as noted by Smith<sup>1</sup> (in connection with asthma).

**Citation of an article or book with exactly one author**

This is the 1st sentence of the 3rd paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 3rd paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 3rd paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 3rd paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 3rd paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article).

This is the 1st sentence of the 4th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 4th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 4th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 4th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 4th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article), as noted by Jones et al<sup>2</sup> (in connection with atopy).

**Citation of an article or book with three or more authors**

This is the 1st sentence of the 5th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 5th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 5th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 5th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 5th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article).

This is the 1st sentence of the 6th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 6th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 6th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 6th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 6th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article), as noted by Rodriguez and Schwartz.<sup>3</sup>

This is the 1st sentence of the 7th paragraph of the Introduction section o

Citation of an article or book with exactly two authors

Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 7th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 7th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 7th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 7th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article).

This is the 1st sentence of the 8th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 8th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 8th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 8th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 8th paragraph of the Introduction section of this New MS Submission (Original Article), as noted by Kuopen,<sup>4</sup> Grimaldi et al,<sup>5</sup> and Li and Norigata.<sup>6</sup>

Citation of multiple references

**METHODS**

The **METHODS** section should begin on a new page.

This is the 1st sentence of the 1st paragraph of the Methods section of this New MS

Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 1st paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). Please note that the name of this section should NOT be "Material and Methods"; likewise, it should NOT be "Patients and Methods."

paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 1st paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 1st paragraph of the Methods section of this New MS

Submission (see additional Methods information in the Online Repository).

Citation of supplementary text to appear in the JACI's Online Repository

**Allergens**

This is the 1st sentence of the 2nd paragraph of the Methods section of this New MS

Submission (Original Article). This is the heading for a subsection within the METHODS section.

section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 2nd paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 2nd paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 2nd paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article).

This is the 1st sentence of the 3rd paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 3rd paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 3rd paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 3rd paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article).

Article). This is the 5th sentence of the 3rd paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article).

## Reagents

This is the 1st sentence of the 4th paragraph of the Methods section of this New MS

This is the heading for a subsection within the METHODS section.

section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 4th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 4th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 4th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article).

This is the 1st sentence of the 5th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 5th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 5th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 5th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 5th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article).

## Skin prick testing

This is the 1st sentence of the 8th paragraph of the Methods section of this New MS

This is the heading for a subsection within the METHODS section.

section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 6th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 6th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 6th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article).

This is the 1st sentence of the 7th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 7th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 7th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 7th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 7th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article).

### Statistical analysis

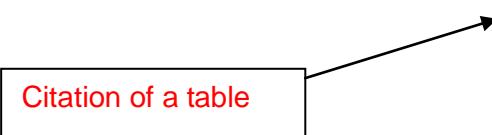
This is the 1st sentence of the 8th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 8th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 8th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 8th paragraph of the Methods section of this New MS Submission (Original Article).

**This is the heading for a subsection within the METHODS section.**

**RESULTS**

The **RESULTS** section should begin on a new page.

This is the 1st sentence of the 1st paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 1st paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 1st paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 1st paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 1st paragraph of the Results section of this New MS Submission (**see Table I**).



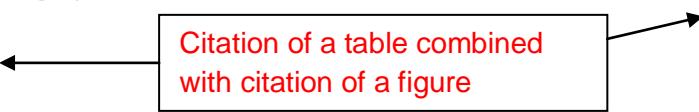
**Citation of a table**

This is the 1st sentence of the 2nd paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 2nd paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 2nd paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 2nd paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 2nd paragraph of the Results section of this New Submission (**see Figure 1**).



**Citation of a figure**

This is the 1st sentence of the 3rd paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 3rd paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 3rd paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 3rd paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 3rd paragraph of the Results section of this New MS Submission (**see Table II and Figure 2**).



**Citation of a table combined with citation of a figure**

This is the 1st sentence of the 4th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 4th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 4th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 4th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 4th paragraph of the Results section of this New MS Submission (see Figure 3A and 3B).

**Citation of specific panels  
within a figure**

This is the 1st sentence of the 5th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 5th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 5th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 5th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 5th paragraph of the Results section of this New MS Submission (see Table E1 in the Online Repository).

**Citation of a supplementary  
table to appear in the JACI's  
Online Repository**

This is the 1st sentence of the 6th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 6th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 6th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 6th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 6th paragraph of the Results section of this New MS Submission (see Figure E1 in the Online Repository).

**Citation of a supplementary  
figure to appear in the JACI's  
Online Repository**

This is the 1st sentence of the 7th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 7th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 7th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 7th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 7th paragraph of the Results section of this New MS Submission (see Table E2 and Figure E2 in the Online Repository).

Citation of a table to appear  
in the JACI's Online  
Repository combined with  
citation of a figure to appear  
in the JACI's Online  
Repository

This is the 1st sentence of the 8th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 8th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 8th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 8th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 8th paragraph of the Results section of this New MS Submission (Original Article).

**DISCUSSION**

The **DISCUSSION** section should begin on a new page.

This is the 1st sentence of the 1st paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 1st paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 1st paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 1st paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 1st paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article).

**Throughout the manuscript, 12-point Times New Roman font is preferred**

This is the 1st sentence of the 2nd paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 2nd paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 2nd paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 2nd paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 2nd paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article).

**Throughout the manuscript, all line spacing should be double (that is, 2.0).**

This is the 1st sentence of the 3rd paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 3rd paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 3rd paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 3rd paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 3rd paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article).

**All margins should be one inch wide.**

The name of the first author of the submission should appear on every page.

161

A page number should appear on every page.

This is the 1st sentence of the 4th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 4th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 4th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 4th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 4th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article).

Line numbering should be continuous from the first page through the final page.

This is the 1st sentence of the 5th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 5th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 5th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 5th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 5th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article).

This is the 1st sentence of the 6th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 6th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 6th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 6th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 6th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article).

This is the 1st sentence of the 7th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 7th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 7th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 7th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 7th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article).

**This is the heading for a subsection within the DISCUSSION section.**



**Conclusions**

This is the 1st sentence of the 8th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 2nd sentence of the 8th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 3rd sentence of the 8th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 4th sentence of the 8th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article). This is the 5th sentence of the 8th paragraph of the Discussion section of this New MS Submission (Original Article).

**References**

The list of references should begin on a new page.

1. Smith A. Milk allergens and asthma. J Lycanthropy 2001;21:321-9.
2. Jones BC, Brown DE, Green FG, White HJ, Silver LM, Gold N. Hen's egg allergens and atopy. J Lycanthropy 2002;23:432-40.
3. Rodriguez O, Schwartz P. Peanut allergens and immunotherapy. J Lycanthropy 2003;25:598-606.
4. Kuopen QR. Tree nut allergens and asthma. J Lycanthropy 2004;27:123-4.
5. Grimaldi S, Jones BC, Brown DE, Green FG, White HJ, Silver LM, et al. Fish allergens and atopy. J Lycanthropy 2005;29:234-42.
6. Li T, Norigata Y. Wheat allergens and immunotherapy. J Lycanthropy 2006;31:399-408.

When the number of authors is **six or fewer**,  
show the names of **ALL** of the authors.

When the number of authors is **more than six**,  
show the first six author names and then use "**et  
al.**"

**Each table should begin on a new page.**

**Table I.** Numbers of subjects treated by month (n = 26).

Month	No. of children (M/F)	No. of adults (M/F)
January	6 (4/2)	3 (2/1)
February	5 (3/2)	2 (1/1)
March	4 (2/2)	1 (1/0)
April	3 (2/1)	0
May	2 (1/1)	—
June	1 (0/1)	—

**Tables should be numbered I, II, III, and so forth.**

M, Male; F, female.

**Each table should begin on a new page.**

**Table II.** Numbers of subjects all aged 12 years or less who had reactions to various foods.

Food	No. of children	No. of adults
Milk	16	8
Hen's egg	14	—
PN	12	6
TN	10	5
Fish	8	4
Shellfish	6	3

**Tables should be numbered I, II, III, and so forth.**

PN, Peanut; TN, tree nut.

**Figure legends**

The figure **legends** should begin on a new page.

**Figure 1.** This is the 1st sentence of the legend to Figure 1. This is the 2nd sentence of the legend to Figure 1.

A figure legend should consist of **no more than 60 words**.

**Figure 2.** This is the 1st sentence of the legend to Figure 2. This is the 2nd sentence of the legend to Figure 2. This is the 3rd sentence of the legend to Figure 2. This is the 4th sentence of the legend to Figure 2.

Figures should be numbered 1, 2, 3, and so forth.

**Figure 3.** This is the 1st sentence of the legend to Figure 3. **A,** This is the 2nd sentence of the legend; it indicates what is to be seen in panel A of Figure 3. **B,** This is the 3rd sentence of the legend; it indicates what is to be seen in panel B of Figure 3.

Line numbering should be continuous from the first page though the final page.