

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



POLIMORFISMOS GENÉTICOS, SUSCEPTIBILIDADE E
RESPOSTA AO TRATAMENTO EM CRIANÇAS PORTADORAS DE
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Vanessa da Silva Silveira Andrade

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Genética.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

RIBEIRÃO PRETO

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Andrade, Vanessa da Silva Silveira
Polimorfismos genéticos, susceptibilidade e resposta ao
tratamento em crianças portadoras de leucemia
linfoblástica aguda. Ribeirão Preto, 2006

113 pp. 28cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências, área de
concentração Genética.

Orientador: Tone, Luiz Gonzaga

1. Polimorfismos genéticos. 2. Leucemia Linfóide Aguda. 3.
Susceptibilidade. 4. PCR-RFLP

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- ✓ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 04/05312-1).
- ✓ Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto/USP – FAEPA.
- ✓ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
- ✓ Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vanessa da Silva Silveira Andrade
Polimorfismos genéticos, susceptibilidade e resposta ao
tratamento em crianças portadoras de leucemia
linfoblástica aguda

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

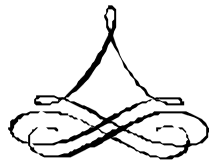
Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico especialmente



Aos meus pais José Silveira e Maria Amélia

*Pelo amor, carinho e apoio incondicional em todos os
momentos da minha vida!*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone, pela orientação deste trabalho, oportunidade de aperfeiçoamento e maturidade profissional, além do grande exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa.

À Profa. Dra. Rosane Gomes de Paula Queiroz, pela disponibilidade e dedicação prestadas desde o início do desenvolvimento desse trabalho até a sua conclusão.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli, que participou ativamente deste trabalho com sugestões e fundamental assistência na parte clínica.

À Profa. Dra. Lucia Regina Martelli, Coordenadora da Pós-Graduação do Departamento de Genética, pela atenção e apoio.

À Profa. Dra. Denise Crispim Tavares, pelo início de tudo, a base profissional, o incentivo e acima de tudo pela confiança!

À Profa. Dra. Andréa de Oliveira Cecchi, pelo apoio, colaboração e ensinamentos essenciais durante essa fase, e além de tudo pela amizade tão especial!

À Profa. Dra. Renata Canalle, por toda paciência e acima de tudo companheirismo e amizade durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Profa. Dra. Agda Karina Brodoloni Eterovic, pela participação na revisão final desse trabalho.

Aos Membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade de análise desse trabalho, enriquecendo-o com suas críticas e sugestões.

Às funcionárias Cleusa S. Mazzucatto Motta, Maria Aparecida O. S. Elias e Susie Adriana R. P. Nalon, da secretaria do Departamento de Genética da FMRP-USP, pela atenção e ajuda prestada em todos os momentos.

À todo pessoal do laboratório de biologia molecular: Angélica, Daniela, Elvis Valera, Fabiana, Fábio, Juliana, Karina, Priscilla, Renata e os que não são da 218 mas que conviveram em tempo integral: Camila, Juliano, Lúcia, Patrícia e Virgínia pela convivência, incentivo, colaboração e acima de tudo pela grande amizade.

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas - FMRP: Aidê, Elvis Fábio Morato, Livia, Lucimar, Malu e Sônia pela convivência tão agradável.

À secretária do laboratório de Pediatria, Helena, por todo auxílio prestado durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos grandes amigos que me apoiaram durante todo esse tempo: Ceci, Cris, Érica, Ivan, Joana, Luly, Marcelo (ah essa informática!), Paulinha, Rinaldo (pelo companheirismo e pela grande amizade durante esses anos!) Sérgio, e em especial ao Umberto.

Ao Guilherme, por todos esses anos de convivência, o enorme carinho, amizade e, acima de tudo, pelo incentivo incondicional à minha carreira!

Aos pacientes que gentilmente forneceram o material indispensável para a realização deste estudo.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho

Muito Obrigada!

Agradeço especialmente...

À Rosane, exemplo de amiga e profissional, por todos esses anos agradáveis de convivência com muita dedicação, confiança e acima de tudo pela grande amizade.

"A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos,

depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós"

Marcel Proust

RESUMO

ANDRADE, V. S. S. Polimorfismos Genéticos, Susceptibilidade e Resposta ao Tratamento em Crianças Portadoras de Leucemia Linfoblástica Aguda. 2006. 100f. Dissertação Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

As leucemias constituem o câncer mais comum da infância, representando 30% de todas as neoplasias infantis. Dentre elas, a leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a mais freqüente, atingindo 75% dos casos pediátricos de leucemias. A ocorrência da LLA tem sido relacionada com a exposição a alguns fatores ambientais (químico, físico e biológicos) e maternos (uso de drogas e dieta) tanto no desenvolvimento intra-útero como após o nascimento. No entanto, o processo de leucemogênese, particularmente com relação à importância da susceptibilidade genética herdada e fatores ambientais, ainda não foi elucidado. As enzimas do citocromo P450 (CYP), assim como outras enzimas das fases I e II do metabolismo estão envolvidas na biotransformação de uma variedade de xenobióticos presentes na alimentação, no cigarro, nas drogas, nas bebidas alcoólicas e nos poluentes ambientais. Polimorfismos em genes responsáveis por codificar essas enzimas de metabolismo têm sido associados com um aumento na susceptibilidade a diferentes tipos de câncer e a doenças hematológicas em adultos e crianças. Similarmente, a capacidade diferencial de crianças portadoras de leucemia aguda para metabolizar carcinógenos e drogas quimioterápicas, a qual é influenciada pelos polimorfismos dos genes que codificam enzimas de metabolização, podem modificar a resposta à terapia. Sendo assim, é importante a realização de investigações epidemiológicas moleculares em crianças portadoras de leucemia, pois estes estudos poderão fornecer informações sobre a etiologia e os mecanismos que levam a esta doença, e sobre as respostas adversas ou inadequadas a certos agentes terapêuticos, com o intuito de buscar tratamentos mais específicos e eficazes. O presente trabalho teve por objetivo estimar a freqüência dos polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO* (responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos) e *TS* (associado à síntese de DNA) e investigar a associação destes polimorfismos com o efeito do tratamento quimioterápico. Foram genotipados através da técnica de PCR-RFLP 132 pacientes portadores de LLA e 300 indivíduos controles. Analisando o gene *CYP2D6* foi observada uma prevalência significativa do alelo *CYP2D6*3* no grupo dos pacientes. Em relação ao gene *EPHX1*, o alelo polimórfico *2 foi mais freqüente no grupo de indivíduos controles, assim como a repetição tripla (3R) do gene *TS*. O genótipo heterozigoto para o gene *TS* e o homozigoto selvagem para o gene *MPO* foram mais freqüentes em indivíduos do sexo feminino, sugerindo uma associação destes genótipos com o sexo. Não foi encontrada nenhuma associação dos polimorfismos estudados com a resposta ao tratamento quimioterápico. Com base nestes dados, é possível sugerir uma associação destes polimorfismos com a susceptibilidade ao desenvolvimento da LLA, destacando a importância da sua determinação para o prognóstico bem como para o caráter preventivo relacionado ao risco aumentado de doenças associadas à exposição ambiental.

ABSTRACT

ANDRADE, V. S. S. Genetic polymorphisms, susceptibility and treatment outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. 2006. 100f. Maester's Dissertation - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

The leukemias are the most common type of cancer in children, representing above 30% of all the pediatric malignancies. Among them, the acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent, with a percentage of 75% of the total pediatric cases of leukemia. Its occurrence is closely related to the exposure to chemical, physical and biological environmental factors and so maternal factors either, such as drugs, alcohol even in the uterine phase or after birth. Despite all the investigations made until now, little is known about the leucemogenous process, in particular about the importance of heritable genetic susceptibility and environmental factors. The cytochrome P450 enzymes, as well as other phase I and II enzymes are involved on the biotransformation process of a huge variety of xenobiotics on food, smoke, alcohol, drugs and chemical pollutants. Polymorphisms on these genes have been associated to the increased susceptibility to different kind of adult cancers and hematological diseases in adults and child. Similarly, the differential capacity of children with ALL to metabolize carcinogen compounds and chemotherapy drugs, which is influenced by polymorphisms on genes that encode metabolizing enzymes, can modify the individual risk of relapse and therapy response. Thus, molecular epidemiological investigations in children with acute leukemia became so important to help clinicians answer questions about the etiology and the right mechanisms that induce this malignance and about the adverse responses to therapy found in huge number of patients, trying to reach more specific treatments. So, the present study objective is to evaluate the polymorphism frequency on the following genes *CYP2D6*, *EPHX1* and *MPO* (xenobiotic metabolizing genes) and *TS* gene (DNA synthesis) in patients with ALL and in controls individuals. We analyzed 132 patients and 300 health controls by PCR-RFLP technique. The *CYP2D6*3* variant was more frequent on the case group. The *EPHX1*2* and the triple repeat (3R) of *TS* gene were more frequent on the control group. The heterozygous genotype for the *TS* gene and the homozygous for the *MPO* gene were more prevalent on the female group, suggesting an association of these polymorphisms with the gender. We did not find any association with the studied polymorphisms and the response to therapy. Beyond these data, is it possible to suggest an association of these polymorphisms and the leukemia development susceptibility, emphasizing the importance of the polymorphism determination for prognosis and for the prevention, related to the increased risk of the diseases related to environmental exposure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1: Principais conseqüências de mutações em genes associados ao metabolismo..... 12
- FIGURA 2: Timidilato sintase (TS) catalisa a metilação da 2'-deoxiuridina 5-monofosfato (dUMP) pela transferência de um radical metil do cofator 5,10-metilenotetrahidrofolato para produzir 2'-deoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP). dTMP é posteriormente fosforilado a trifosfato (dTTP) que é o precursor direto da síntese de DNA..... 19
- FIGURA 3: PCR-RFLP em gel de agarose convencional 2% para detecção do polimorfismo *CYP2D6-Bst*M, onde M= marcador de peso molecular (100 pb). Linhas 1, 2, 4, 6-11: homocigotos para o alelo selvagem (*EM*); Linhas 5, 12: heterocigoto (*HEM*); Linha 3: homocigoto para o alelo polimórfico (*PM*); Linha 13: branco..... 37
- FIGURA 4: PCR-RFLP em gel de poliácridamida 10% para detecção do polimorfismo *CYP2D6-Msp*A, onde M= marcador de peso molecular (100 pb). Linhas 1, 3-5, 7-12: homocigoto para o alelo selvagem (*EM*); Linhas 2, 6: heterocigoto (*HEM*); Linha 13: branco..... 38
- FIGURA 5: PCR-RFLP em gel de poliácridamida 10% para detecção do polimorfismo *EPHX1-Eco*RV, onde M= marcador de peso molecular (100 pb); Linhas 2, 9: homocigotos selvagens (**1/*1*); Linhas 1, 3, 4, 9: homocigotos para o alelo polimórfico (**3/*3*); Linhas 5- 8: heterocigotos (**1/*3*); Linha 11: branco..... 39
- FIGURA 6: PCR-RFLP em gel de agarose convencional 2% para detecção do polimorfismo *EPHX1-Rsa*I, onde M= marcador de peso molecular (100 pb); Linhas 1,2,5-9: homocigotos selvagens (**1/*1*); Linhas 3 e 4: homocigotos para o alelo polimórfico (**3/*3*); Linhas 10- 12: heterocigotos (**1/*3*); Linha 13: branco..... 39
- FIGURA 7: PCR-RFLP em gel de agarose convencional 2% para detecção do polimorfismo *MPO-Acl*I, onde M= marcador de peso molecular (100 pb); Linhas 1-3, 6-8, 11: homocigotos selvagens (**1/*1*); Linhas 4, 5, 10 e 13: heterocigotos (**1/*2*); Linha 12: homocigoto para o alelo polimórfico (**2/*2*); Linha 9: branco..... 40
- FIGURA 8: PCR em gel de agarose convencional 2% para detecção do polimorfismo 3R, onde M= marcador de peso molecular (100 pb); Linhas 1-4, 6, 8, 9: heterocigotos 2R3R; Linha 5: homocigoto 2R2R; Linha 7: homocigoto 3R3R; Linha 10: branco..... 41
- FIGURA 9: Curvas de sobrevivência. A-E: representação dos genes estudados *CYP2D6*2*, *CYP2D6*3*, *MPO*, *TSe* *EPHX1*, respectivamente. F: curva de sobrevivência associada aos grupos de risco..... 65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Distribuição das freqüências dos polimorfismos dos genes <i>CYP2D6</i> , <i>EPHX1</i> , <i>MPO</i> e <i>TS</i> , em crianças portadoras de LLA e indivíduos controles.....	44
TABELA 2: Associação entre os genótipos e o risco de LLA.....	47
TABELA 3: Distribuição das crianças portadoras de LLA e indivíduos controles, em relação às freqüências dos polimorfismos dos genes <i>CYP2D6</i> , <i>TS</i> , <i>EPHX1</i> e <i>MPO</i> , de acordo com o sexo.....	51
TABELA 4: Distribuição das crianças portadoras de LLA e indivíduos controles, em relação às freqüências dos polimorfismos dos genes <i>CYP2D6</i> , <i>TS</i> , <i>EPHX1</i> e <i>MPO</i> de acordo com a etnia.....	53
TABELA 5: Distribuição das crianças portadoras de LLA e indivíduos controles, em relação às freqüências dos polimorfismos dos genes <i>CYP2D6</i> , <i>TS</i> , <i>EPHX1</i> e <i>MPO</i> de acordo com a etnia.....	55
TABELA 6: Distribuição das crianças portadoras de LLA e indivíduos controles, em relação às freqüências dos polimorfismos dos genes <i>CYP2D6</i> , <i>TS</i> , <i>EPHX1</i> e <i>MPO</i> de acordo com a etnia.....	57
TABELA 7: Distribuição das crianças portadoras de LLA em relação às freqüências dos polimorfismos dos genes <i>CYP2D6</i> , <i>TS</i> , <i>EPHX1</i> e <i>MPO</i> de acordo com o grupo de risco de recidiva.....	62
TABELA 8: Distribuição das crianças portadoras de LLA em relação às freqüências dos polimorfismos dos genes <i>CYP2D6</i> , <i>TS</i> , <i>EPHX1</i> e <i>MPO</i> de acordo com a remissão clínica completa da ou recidiva da doença + óbitos.....	63
TABELA 9: Associação entre os genótipos <i>CYP2D6</i> *3, <i>CYP2D6</i> *4, <i>EPHX1</i> *2, <i>EPHX1</i> *3 e <i>MPO</i> combinados e o risco de LLA em crianças.....	68
TABELA 10: Associação entre os genótipos <i>EPHX1E3</i> e <i>EPHX1E4</i> combinados e o risco de LLA em crianças.....	69
TABELA 11: Associação entre os genótipos <i>CYP2D6</i> *3, <i>CYP2D6</i> *4, <i>EPHX1</i> *2, <i>EPHX1</i> *3 e <i>MPO</i> combinados e os grupos de risco de recidiva em crianças portadoras de LLA.....	69
TABELA 12: Associação entre os genótipos <i>CYP2D6</i> *3, <i>CYP2D6</i> *4, <i>EPHX1</i> *2, <i>EPHX1</i> *3 e <i>MPO</i> combinados e a remissão clínica completa ou recidiva + óbitos em crianças com LLA.....	70

LISTA DE SIGLAS

AR – alto risco de recidiva
CALLA – antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda
CD - *cluster* de diferenciação
CYP – citocromo P450
ET – em tratamento
EPHX1 – epóxido hidrolase
FAB - grupo Francês-Americano-Britânico
FT – fora de tratamento
GBTLI – grupo brasileiro de tratamento de leucemia da infância
IC – intervalo de confiança
LLA – leucemia linfoblástica aguda
LMA – leucemia mielóide aguda
LMC- leucemia mielóide crônica
MPO –mieloperoxidase
pb –pares de base
PCR – reação em cadeia da polimerase
RB – risco básico de recidiva
RCC – remissão clínica completa
RFPL – polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
SNPs – polimorfismo de único nucleotídeo
TS – timidilato sintase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA NA INFÂNCIA.....	2
1.2. ENZIMAS DE METABOLISMO ASSOCIADAS AO AUMENTO DA SUSCEPTIBILIDADE À LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	10
1.3. POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO.....	13
1.3.1. POLIMORFISMO DO CITOCROMO P450 2D6.....	13
1.3.2. POLIMORFISMO DA EPÓXIDO HIDROLASE	15
1.3.3. POLIMORFISMO DO GENE DA MIELOPEROXIDASE HUMANA	17
1.3.4. POLIMORFISMO DO GENE TIMIDILATO SINTASE.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	24
3.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	26
3.3. GENOTIPAGEM – PCR - RFLP.....	26
3.3.1. DETECÇÃO DOS GENÓTIPOS <i>CYP2D6</i>	27
3.3.2. DETECÇÃO DOS GENÓTIPOS <i>EPHX1</i>	30
3.3.3. DETECÇÃO DOS GENÓTIPOS <i>MPO</i>	32
3.3.4. DETECÇÃO DOS GENÓTIPOS <i>TS</i>	33
4. RESULTADOS.....	36
4.1. DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS.....	37
4.2. DISTRIBUIÇÕES DOS GENÓTIPOS <i>CYP2D6</i> , <i>EPHX1</i> E <i>MPO</i> EM PORTADORAS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E CONTROLES.....	42
4.3. DISTRIBUIÇÕES DOS GENÓTIPOS <i>CYP2D6</i> , <i>EPHX1</i> E <i>MPO</i> EM CRIANÇAS PORTADORAS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E CONTROLES EM RELAÇÃO AO SEXO E ETNIA.....	47

5. DISCUSSÃO.....	72
-------------------	----

5.1 POLIMORFISMOS DE ENZIMAS METABOLIZADORAS DE XENOBIÓTICOS E A SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA.....	73
---	----

5.2 POLIMORFISMOS DE ENZIMAS METABOLIZADORAS DE XENOBIÓTICOS E DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E A RESPOSTA AO TRATAMENTO.....	88
--	----

6. CONCLUSÕES.....	92
--------------------	----

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
------------------------------------	----

8. ANEXOS.....	111
----------------	-----

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA NA INFÂNCIA

A leucemia é o tipo de câncer mais comum descrito em crianças e representa cerca de 35% de todas as doenças malignas da infância. As leucemias podem ser agudas, caracterizadas pela presença de células imaturas no sangue ou crônicas, caracterizadas por um excesso de células maduras e diferenciadas com lenta progressão da doença (Gunz, 1990). Elas são divididas, de acordo com a linhagem celular, em mielóides e linfóides caracterizando os seguintes subtipos leucêmicos: leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfoblástica crônica (LLC), leucemia mieloblástica aguda (LMA) que é subdividida em M0 – M7, e leucemia mieloblástica crônica (LMC). As leucemias linfoblásticas crônicas não acometem a faixa pediátrica (Pui, 2002).

Dentre os subtipos de leucemia acima descritos, a linfoblástica aguda (LLA) é a mais freqüente, totalizando 75% dos casos (Pui, 2002) e é caracterizada pelo acúmulo clonal de linfócitos imaturos na medula óssea. O clone maligno que sofre a transformação pode ser tanto uma célula pluripotente como uma célula progenitora mais madura (Lightfoot T., 2005; Kebriaei et al., 2003). Aberrações na proliferação e na diferenciação dessas células são comuns e torna a hematopoiese normal comprometida. A sintomatologia é bastante variável, dependendo das alterações das

séries vermelha, branca e megacariocítica. São freqüentes palidez, apatia, taquicardia (devido à diminuição da produção da série vermelha), febre e infecções recorrentes (ocasionadas pela falência da série branca e conseqüente diminuição dos leucócitos normais). Além desses sintomas, o paciente pode apresentar ainda sangramento, petéquias disseminadas (causados pela falência da série megacariocítica) e sintomas associados ao acometimento de órgãos específicos como testículos e periósteo. O acometimento do sistema nervoso central também é comum nas LLAs (Downing Jr. *et al*, 1999; Kebriaei *et al*, 2003).

Para se estabelecer o diagnóstico definitivo é necessário um exame de medula óssea, realizado através de um aspirado ou de uma biópsia. O diagnóstico é baseado na avaliação morfológica e imunofenotípica dos blastos leucêmicos, sendo que a presença de 25% ou mais de blastos na medula óssea caracteriza a doença. A natureza do clone leucêmico vai determinar a progressão da doença e, conseqüentemente, o curso clínico da leucemia (Pui, 2002).

Como a avaliação dos aspectos morfológicos pode muitas vezes ser subjetiva, o grupo Francês-Americano-Britânico (FAB) padronizou a nomenclatura de acordo com a característica morfológica dos blastos, subdividindo as LLAs em três grupos: L1, L2 e L3. Os linfoblastos L1 são células pequenas, com citoplasma escasso e nucléolo regular, linfoblastos L2 são células maiores, heterogêneas, com citoplasma variável e nucléolos maiores e os linfoblastos L3, apresentam células grandes, basofilia citoplasmática intensa e freqüentemente vacuolização (Bennett *et al*, 1976). A morfologia L1 está associada a maiores índices de remissão e sobrevida quando

comparada à morfologia L2, entretanto ainda não foi identificada nenhuma base biológica que explique essas diferenças morfológicas (Margolin; Poplack, 1997).

A transformação leucêmica pode ocorrer nos diversos estágios de maturação do processo de diferenciação dos linfócitos B e T. A análise imunofenotípica é crítica para confirmar o diagnóstico da LLA e sub-classificar a linhagem como precursora de células B ou células T. Os antígenos associados com as diferentes fases de maturação podem ser detectados por anticorpos monoclonais. Tais anticorpos são agrupados conforme a molécula que reconhecem sob um número de *cluster* de diferenciação (CD) existindo diversos marcadores para a imunofenotipagem nas leucemias (Pileri *et al*, 1999).

A vasta maioria dos casos de LLA (~75%) é de linhagem B e foram divididas de acordo com os estágios de diferenciação normal dos progenitores B na medula óssea, classificando-se em: pró-B, precursor B comum, pré-B e B-maduro. Na LLA do tipo pró-B as células expressam: HLA-DR, Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT), CD34, CD19 e CD22. A LLA do tipo comum (CALLA) expressa CD10, CD22, CD19 e/ou CD20. A leucemia pré-B expressa cadeia μ citoplasmática, em adição a CD19, CD20 e CD10. Finalmente, a LLA do tipo B maduro, caracteriza-se pela expressão de cadeias leves de imunoglobulina na superfície de membrana (smlg) (Kotilo, 1995; Vasef, MA *et al*, 1998).

As LLAs de linhagem T representam apenas 15% do total dos casos e são divididas em três subgrupos, de acordo com os antígenos de diferenciação correspondentes ao estágio de maturação dos timócitos: LLA pré-T, T-intermediário ou comum e maduro. Na LLA pré-T, as células expressam CD3 no citoplasma, mas

não na superfície celular, expressando caracteristicamente CD7, CD2, CD5 e TdT. Na LLA do tipo T intermediário, as células passam a expressar fortemente CD3c, CD2, CD1a e podem co-expressar CD4 e CD8. A LLA do terceiro grupo corresponde aos tímocitos maduros, expressa CD2, CD5, CD7, CD3, sendo duplamente positiva para CD4 e CD8. (Pui *et al.*, 1993; Stasi *et al.*, 1995; Margolin; Poplack, 1997).

Anormalidades genéticas também são encontradas nas células blásticas na maioria dos casos de leucemia, tendo sido descritas aproximadamente 200 alterações, incluindo mutações de ponto, deleções gênicas e inversões. Alterações cromossômicas numéricas como hiperploídia e estruturais como as translocações, também são encontradas.

Aproximadamente 90% das crianças com LLA apresentam anormalidades cromossômicas, sendo as numéricas, as mais freqüentemente encontradas. Dessa forma as LLAs podem ser classificadas, de acordo com o número de cromossomos, em 5 subtipos: hiperdiploíde com mais de 50 cromossomos, hiperdiploíde com 47-50, pseudodiploídes, diploídes e hipodiploídes (Trueworthy *et al.*, 1992). Cariótipos hiperdiploídes com contagem cromossômica superior a 50 cromossomos são os mais freqüentes, encontrados em cerca de 20% dos casos. Aproximadamente metade de todos os casos de hiperdiploidia está associada com bom prognóstico, contrariamente aos casos hipodiploídes que representam cerca de 8% dos casos pediátricos e são considerados de mau prognóstico (Margolin; Pollack, 1997; Raimondi, 1997).

As anormalidades estruturais representadas por translocações cromossômicas, resultam em proteínas quiméricas que estão implicadas com a gênese das LLAs.

Estudos já demonstraram que as translocações são os primeiros eventos nas leucemias, ocorrendo durante o desenvolvimento fetal (Wiemels *et al.*, 1999; Greaves, 2003). Dentre elas, a alteração mais comum, encontrada em 25% dos casos, é a fusão dos genes *TEL-AML1* que é considerada como fator prognóstico favorável. A translocação t(9;22) (cromossomo Philadelphia), resultante da fusão *BCR-ABL* é encontrada em aproximadamente 5% das crianças com LLA e está associada a um prognóstico desfavorável, assim como a translocação t(4;11) (q21;23), que pode ser observada em cerca de 3% das LLAs em crianças, principalmente nos lactentes (Raynaud *et al.*, 1996; Pui *et al.*, 2002; Pui *et al.*, 2003). Outras translocações que podem estar envolvidas são: t(8;14), t(2;8) e t(8;22) (envolvem o proto-oncogene *MYCC*) e também a t(11;14) com ponto de quebra no cromossomo 14 no locus / do gene *TCR*, representando a translocação mais freqüente entre as LLAs de linhagem T da infância (Privitera *et al.*, 1992; Pui, 1995; Margolin; Poplack, 1997; Pui *et al.*, 2004; Lightfoot, 2005). O tratamento utilizado para a LLA é a quimioterapia e a sobrevida livre de eventos por mais de cinco anos é considerada o critério de cura. A doença é classificada em duas categorias de risco: alto e baixo risco, que são estabelecidas através de parâmetros clínicos e biológicos e que vão determinar a intensidade da terapia. Os dois fatores mais importantes associados ao grupo de risco são: idade e a contagem leucocitária. Pacientes com idade entre 1 e 10 anos e contagem leucocitária inferior a 50.000/mm³ são considerados, inicialmente, como de baixo risco; Por outro lado, crianças com idade inferior a 1 ano ou superior a 10 anos e contagem leucocitária superior a 50.000/mm³, são consideradas de alto risco (Smith *et al.*, 1996). Além destes fatores, outras características também podem interferir ou modificar o

prognóstico dos pacientes, como o imunofenótipo, as alterações cromossômicas, o índice de DNA e o padrão inicial de resposta ao tratamento.

A base do tratamento da LLA foi inicialmente descrita por Pinkel e colaboradores em 1971. O tratamento determina o uso da "terapia total", que é baseada na combinação de drogas com diferentes mecanismos de ação, e a administração da quimioterapia intratecal e da radiação do crânio como medida de profilaxia para o sistema nervoso central.

O tratamento quimioterápico compreende as etapas de indução, consolidação da remissão, intensificação, consolidação tardia e manutenção. Utiliza-se um esquema de tratamento com o uso de poliquimioterápicos que combinam diversos grupos de quimioterápicos, dentre eles, agentes alquilantes, antimetabólicos, antracíclicos, epipodofilotóxicos entre outros. São utilizados os seguintes quimioterápicos: indução: dexametasona, vincristina, asparaginase e daunorrubicina; consolidação da remissão: ciclofosfamida, citarabina e 6-Mercaptopurina (6-MP); Intensificação: metotrexato e 6-MP; consolidação tardia: dexametasona, vincristina, doxorubicina, asparaginase, ciclofosfamida e 6-Tioguanina (6-TG); manutenção: vincristina e dexametasona. O esquema de quimioterápicos é modificado conforme o grupo de risco. A duração do tratamento pode compreender de 2 a 3 anos, a depender do grupo de risco. No tratamento direcionado ao sistema nervoso central, a radioterapia craniana, antes extensivamente utilizada, tem sido substituída por regimes de quimioterapia sistêmica e intratecal mais intensivos, com o objetivo de diminuir as complicações

neurológicas e a incidência de neoplasias secundárias (Relling *et al.*, 1999; Carroll *et al.*, 2003).

A incidência da leucemia é bastante variável quando avaliada em diferentes populações. Populações caucasianas apresentam incidência mais freqüente quando comparadas às africanas, e essa variação ocorre devido a diversos fatores como variações geográficas, socioeconômicas e sexo, fato que demonstra a presença de outros fatores que podem atuar no processo de susceptibilidade à doença (Kebriaei *et al.*, 2003).

Diversos fatores têm sido associados com o aumento da susceptibilidade a LLA. Dentre eles pode-se destacar inúmeras síndromes monogênicas como a síndrome de Down, síndrome de Bloom, Ataxia-Telangectasia, Anemia de Fanconi, síndrome de Klinefelter, neurofibromatose e síndrome de Schwachman, entre outras, as quais estão associadas com o risco aumentado de desenvolvimento da LLA. Também têm sido relatados fatores como idade materna elevada e história materna de perda fetal (Margolin; Poplack, 1997; Bathia *et al.*, 1999), além de leucemia familiar e alta concordância de LLA em gêmeos monozigóticos, principalmente nos primeiros anos de vida, sugerindo que fatores genéticos atuam como importantes causas de LLA (Greaves, 2002).

Outros fatores associados com o aumento do risco de LLA incluem exposição à radiação ionizante e a certos compostos químicos, particularmente solventes orgânicos como o benzeno, a exposição parental aos hidrocarbonetos e pesticidas, o uso materno de drogas, como álcool e cigarro durante a gravidez, ou ainda, fatores relacionados à dieta materna e da criança. Diversos mecanismos de

ação de agentes endógenos e exógenos já foram identificados e a exposição materna a substâncias tóxicas ou carcinogênicas, podem causar danos permanentes (Lightfoot, 2005). Além disso, Greaves (1993) propôs que a maioria dos casos de LLA infantil é consequência de respostas imunológicas anormais a infecções comuns, precedidas por um evento de mutação inicial no útero.

Durante a gestação, o feto é exposto através da placenta a diferentes substâncias encontradas na circulação materna (Hakkola *et al.*, 1998), induzindo a formação de aductos de DNA na placenta (Barnea, 1994; Arnould *et al.*, 1997; Topinka *et al.*, 1997; Whyatt *et al.*, 1998; Lagueux *et al.*, 1999). Dessa forma, exposições no útero, e após o nascimento, a vários fatores biológicos, físicos e químicos podem ser determinantes para o desenvolvimento de leucemias na infância (Whyatt; Perera, 1995).

A exposição a campos eletromagnéticos, o alto peso ao nascimento e a exposição paterna pré-concepção à radiação, também têm sido propostos como fatores possíveis de risco, porém controversos (Margolin; Poplack, 1997; Sandler; Ross, 1997; Shu, 1997; Bhatia *et al.*, 1999; Infante-Rivard *et al.*, 1999; Severson; Ross, 1999). Infecções virais (Epstein-Barr vírus, HTLV I e II, HIV) e imunodeficiências (síndrome de Wiscott-Aldrich, tratamento crônico com drogas imunossupressoras), também estão envolvidas na patogênese de alguns casos da doença (Margolin; Poplack, 1997; Severson; Ross, 1999). Dessa forma, a leucemia linfoblástica aguda pode ser considerada como uma doença genética complexa, em que genes de baixa penetrância modulados por uma série de fatores externos modificam o risco individual de acometimento. O homem está exposto a milhares de compostos

químicos incluindo fármacos, aditivos alimentares, herbicidas, pesticidas, e agentes industriais (Schoket *et al.*, 2001). Estes compostos podem desencadear eventos que são caminhos diretos ou indiretos para o surgimento de vários tipos de doenças, dentre elas as leucemias (Bonassi; Au, 2002).

1.2. ENZIMAS DE METABOLISMO ASSOCIADAS AO AUMENTO DA SUSCEPTIBILIDADE À LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

A metabolização de compostos xenobióticos representa um dos mais versáteis mecanismos de proteção das células (Hayes; Pulford, 1995). A maior parte dos carcinógenos químicos requer ativação metabólica antes de interagir com as macromoléculas celulares e desencadear o processo de proliferação celular (Raunio *et al.*, 1995; van Iersel *et al.*, 1999).

A biotransformação dos xenobióticos, em especial os que são processados no fígado, é comumente agrupada em duas fases. A fase I envolve as enzimas microsossomais e inclui as reações de oxidação, de redução ou de hidrólise, que podem ativar os compostos, inativá-los ou deixar inalteradas suas atividades. A fase II inclui as reações de conjugação e é caracterizada pela inativação do produto da fase I, caso este ainda não tenha sido inativado (Kalant, 1991).

A grande variabilidade na capacidade de ativar ou inativar compostos com potencial genotóxico ou carcinogênico é, provavelmente, influenciada pelos polimorfismos dos genes que codificam as enzimas de metabolização (Lang;

Pelkonen, 1999; Canalle *et al.*, 2004). Estes polimorfismos são a base para um metabolismo deficiente, eficiente ou ultra-rápido da droga e com suas interações com os receptores. Estima-se que os fatores genéticos sejam responsáveis por cerca de 20 a 40% das diferenças individuais do metabolismo e da resposta a drogas e outros compostos (Ingelman-Sundberg, 2004). Sendo assim, dependendo do tipo de reação mediada por essas enzimas, tais polimorfismos poderão conferir vantagens ou desvantagens na susceptibilidade a certas patologias (Daly *et al.*, 1993).

Dentre os genes relacionados com o desenvolvimento de vários tipos de câncer muitos são polimórficos, apresentando a substituição de uma única base de um nucleotídeo ou uma variação do número de pequenas seqüências repetitivas de DNA. Estas variações podem influenciar a taxa de transcrição gênica, a estabilidade do RNA mensageiro, ou a quantidade e atividade das proteínas (FIGURA 1) (Witkin *et al.*, 2002). Polimorfismos de um único nucleotídeo - SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) têm sido identificados em genes responsáveis pelo metabolismo, proliferação celular, transporte, resposta inflamatória e reparo do DNA, que podem estar relacionados com o desenvolvimento do câncer, progressão da doença e resposta ao tratamento. (Perera, 1996).

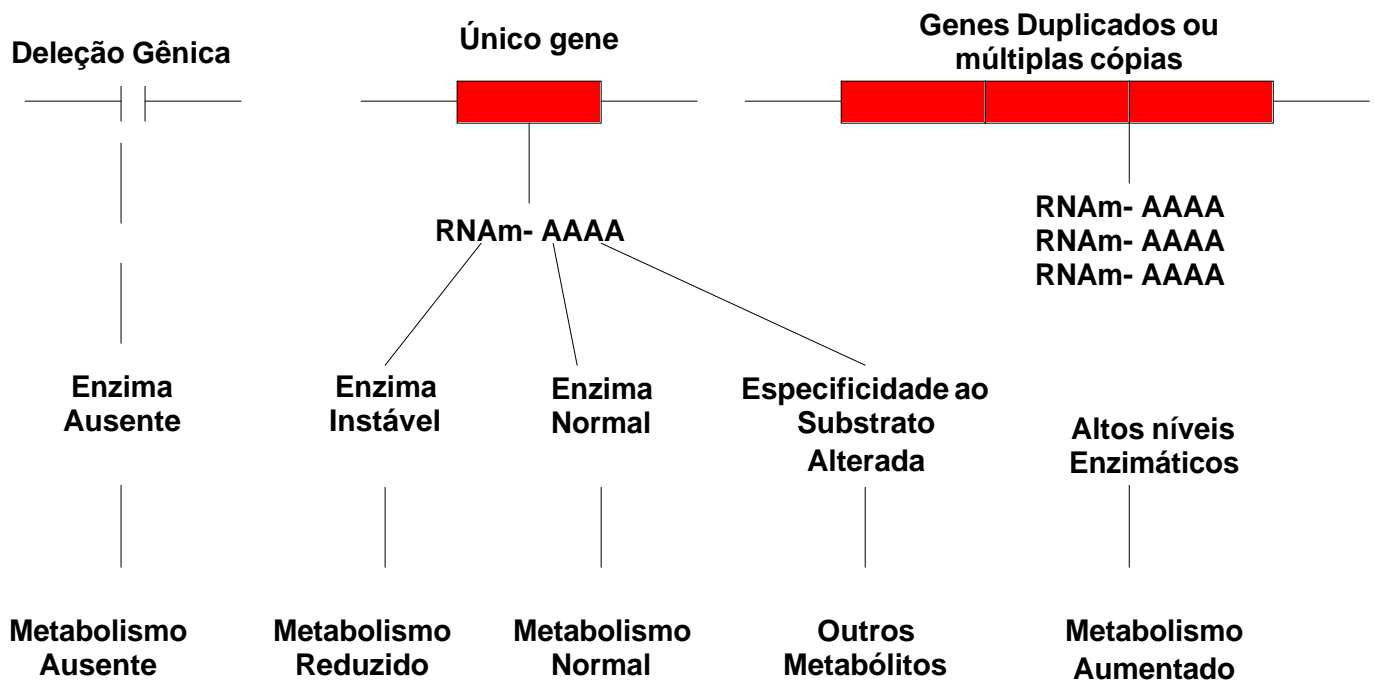


FIGURA 1: Principais conseqüências de alterações em genes associados ao metabolismo.

Finalmente, os distúrbios causados no balanço entre os processos de ativação e detoxificação podem explicar as variações individuais em resposta à exposição aos carcinógenos e à variabilidade na farmacocinética das drogas antineoplásicas (Perera, 1997; Perera *et al.*, 1999). Existem poucos dados na literatura a respeito do possível envolvimento destes polimorfismos no desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda em crianças, assim como na resposta ao tratamento quimioterápico. Tendo em vista o fato de que as crianças são particularmente vulneráveis aos compostos ambientais tóxicos, devido à imaturidade do seu metabolismo e às taxas mais elevadas de crescimento e de divisão celular, é muito

importante que se realizem investigações epidemiológicas moleculares em crianças portadoras de leucemia. Esses estudos podem fornecer informações sobre a etiologia desta doença bem como sobre a resposta aos agentes quimioterápicos, contribuindo para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

1.3 POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO

1.3.1 POLIMORFISMO DO CITOCROMO P450 2D6

Os citocromos P450 (CYPs) compreendem uma superfamília de enzimas que estão envolvidas no metabolismo de compostos endógenos como esteróides, além de compostos exógenos como drogas, carcinógenos químicos, produtos naturais, agentes mutagênicos e poluentes ambientais (Nebert; Gonzales, 1987; Guengerich; Shimada, 1998; Lewis *et al.*, 1998; Van Iersel *et al.*, 1999). As enzimas do citocromo P450 são responsáveis por 70-80% de todo metabolismo de fase I de drogas usadas clinicamente (Evans; Relling, 2004; Ingelman-Sundberg, 2004).

As formas polimórficas do P450 são muitas vezes responsáveis pelas reações adversas a determinadas drogas. Phillips *et al.* (2001) demonstraram que 56% das drogas que são destacadas nos estudos de reação adversa a drogas são metabolizadas por enzimas de fase I, sendo 86% delas, enzimas da família P450 (Ingelman-Sundberg, 2001). Os polimorfismos nos genes *CYP* influenciam a capacidade dos indivíduos de converter diferentes compostos pró-carcinogênicos em

carcinogênicos e assim, são os principais fatores para a susceptibilidade do indivíduo para o desenvolvimento de câncer induzido quimicamente (Ingelman-Sundberg, 2001).

Uma das enzimas com características polimórficas mais estudadas é a CYP2D6 (citocromo P450 –debrisoquina - 4 - hidroxilase), responsável pela metabolização da debrisoquina e de, no mínimo, outros 80 fármacos. O número desses compostos identificados como sendo afetados pelo polimorfismo do gene *CYP2D6* tem aumentado e inclui diversas classes, tais como agentes beta-bloqueadores, agentes cardiovasculares, antidepressivos, antipsicóticos, dextrometorfan, codeína, entre outros (Autrup, 2000). Em adição, a enzima CYP2D6 está envolvida no metabolismo do carcinógeno nitrosamina NNK (4-metil-nitrosamino-1(3-piridil)-1-butanona), um componente da fumaça do cigarro (Crespi *et al.*, 1991).

Os indivíduos que apresentam metabolismo normal são denominados de metabolizadores extensivos (EMs, *extensive metabolisers*); os indivíduos heterozigotos são denominados HEM e os indivíduos deficientes geneticamente, apresentando metabolismo menos eficiente desses compostos, são denominados metabolizadores pobres (PMs, *poor metabolisers*) (Daly *et al.*, 1993). Os PMs apresentam risco maior para o acúmulo e conseqüente toxicidade de drogas metabolizadas pela enzima CYP2D6. Uma outra conseqüência do genótipo PM é que, durante o tratamento quimioterápico, quando a formação de um metabólito ativo é essencial para a ação da droga, esses indivíduos podem exibir uma menor resposta à terapia quando comparados aos EMs (Cupp; Tracy, 1998).

Aproximadamente 50-80% da população mundial apresenta o genótipo do tipo selvagem EM para o gene *CYP2D6*, sendo encontrada uma variação étnica na frequência do fenótipo PM. O fenótipo PM ocorre em 3-10% da população europeia e norte-americana (Alván *et al.*, 1990), enquanto está presente em menos de 1% dos chineses e japoneses (Lou, 1990) e em 1,8% dos negros americanos (Evans *et al.*, 1993).

Pelo menos 15 variantes alélicas do gene *CYP2D6* associadas com o genótipo PM têm sido identificadas e caracterizadas (Skoda *et al.*, 1988), e resultam em uma menor capacidade para hidroxilação dos compostos ou de seus metabólitos (Sachse *et al.*, 1997). Os três alelos mutantes mais comuns são denominados *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4* e *CYP2D6*5*. O alelo *CYP2D6*3* contém uma deleção de 1 par de bases no éxon 5 (delA2637), causando uma mutação *frameshift*, com frequência alélica de 0,05 (Kagimoto *et al.*, 1990). No caso do *CYP2D6*4*, ocorre uma mudança de base G₁₉₃₄→A na junção do íntron 3 com o éxon 4, alterando o *splicing* de RNA que causa uma proteína truncada, e com frequência alélica de aproximadamente 0,8 (Hanioka *et al.*, 1990). O *CYP2D6*5* apresenta deleção completa da região que codifica o gene *CYP2D6*, com frequência alélica de aproximadamente 0,1 (Gaedigk *et al.*, 1991).

1.3.2 POLIMORFISMO DA EPÓXIDO HIDROLASE

O gene *EPHX1* é responsável pela expressão das enzimas epóxido hidrolases que catalisam a hidrólise de intermediários epóxidos reativos como

arenos, alquenos e epóxidos alifáticos, em compostos dihidrodiois menos reativos e mais solúveis em água (Oesch, 1973; Hassett *et al.*, 1994). As epóxido hidrolases representam uma categoria do grupo de enzimas hidrolíticas que também inclui as esterases, proteases, halogenases e lipases (Beetham *et al.*, 1995). A enzima EPHX1 converte o composto benzo (a)pireno, produto da combustão do tabaco, em benzo (a)pireno 7,8 diol, que é um composto transdihidrodiol derivado menos tóxico. Esses compostos diois, no entanto, podem servir de substrato primário para as enzimas do citocromo P450 e gerar compostos altamente reativos como o benzo (a)pireno 7,8 dihidrodiol 9,10-epóxido (BPDE) (Cortesis *et al.*, 2001). Além disso, esta enzima também participa da ativação metabólica dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) abundantes no cigarro, resultando na formação de metabólitos mutagênicos altamente reativos, assim como os compostos diois formados. Dessa forma a enzima EPHX1 pode ser classificada como enzima de atividade bifásica no processo de metabolização de pró - carcinógenos e seu papel no processo de carcinogênese pode depender da exposição a diferentes substratos (Sims *et al.*, 1974; Morisseau *et al.*, 2005).

Dois alelos variantes têm sido associados com a atividade alterada da enzima EPHX1 em populações caucasianas (Hassett *et al.*, 1994). O primeiro alelo, denominado EPHX1*2, apresenta a mutação T→C no éxon 3, que resulta na mudança do aminoácido tirosina para histidina no códon 113 e na redução da atividade da enzima em pelo menos 50%. O segundo alelo, EPHX1*3, é caracterizado pela transição A→G no éxon 4, que resulta na substituição do códon 139 de histidina para arginina, aumentando a atividade da enzima. Quando ambas as mutações estão

presentes, a atividade da EPHX1 é praticamente normal. Recentemente, o envolvimento do gene EPHX1 tem sido descrito em alguns tipos de câncer como o de pulmão, faringe e laringe (Persson *et al.*, 1999; Amador *et al.*, 2002; To-Figueras *et al.*, 2002).

1.3.3 POLIMORFISMO DO GENE DA MIELOPEROXIDASE HUMANA

O gene *MPO*, localizado no cromossomo 17 (q 22-24), é responsável por codificar a enzima mieloperoxidase (MPO). A MPO é uma enzima lisossomal, encontrada em neutrófilos e monócitos, e expressamente ativa na medula óssea. Ela atua pró -carcinógenos presentes no tabaco, tais como o benzo(a)pireno, 4-aminobifenil e arilaminas (Schabath *et al.*, 2002); catalisa a transformação de solventes orgânicos em compostos intermediários altamente reativos e, além disso, contribui para o estresse oxidativo pela catálise da formação de radicais livres (Sarah *et al.*, 1999). Esta enzima também está envolvida na produção de ácido hipocloroso, um potente oxidante, e de outras espécies reativas ao oxigênio (Reynolds *et al.*, 1997).

No entanto, uma alteração na região promotora do gene pode ser responsável pela redução da atividade transcricional da mieloperoxidase resultando na diminuição da bioativação de carcinógenos (Schabath *et al.*, 2002). O polimorfismo G→A, localizado a -463 pb do éxon 1 (Austin *et al.*, 1993; Piedrafita *et al.*, 1996), altera o sítio de ligação para o seu fator de transcrição denominado SP1.

Recentemente, o envolvimento do gene *MPO* tem sido descrito em numerosas doenças que apresentam susceptibilidade associada à exposição à pró - carcinógenos, tais como leucemia mielóide aguda, arteriosclerose, doença de Alzheimer e esclerose múltipla. A atividade reduzida da mieloperoxidase em portadores do alelo mutante (alelo A) já foi descrita por London *et al* (1997) como fator de proteção e também como provável marcador clínico e alvo terapêutico (Hoy *et al.*, 2002).

1.3.4 POLIMORFISMO DO GENE TIMIDILATO SINTASE

O gene *TS* está localizado no cromossomo 18p11.32 e é responsável por codificar a enzima timidilato sintase (TS). A enzima TS é conhecida como uma das diversas enzimas - chave do metabolismo do folato e tem como função catalisar a conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP), utilizando o 5,10 metilenotetrahidrofolato como doador de radicais metil (Sharp; Little, 2004). Essa reação é uma fonte *de novo* de timidina celular, que é um precursor essencial para o fornecimento de nucleotídeos necessários para a síntese de DNA (FIGURA 2).

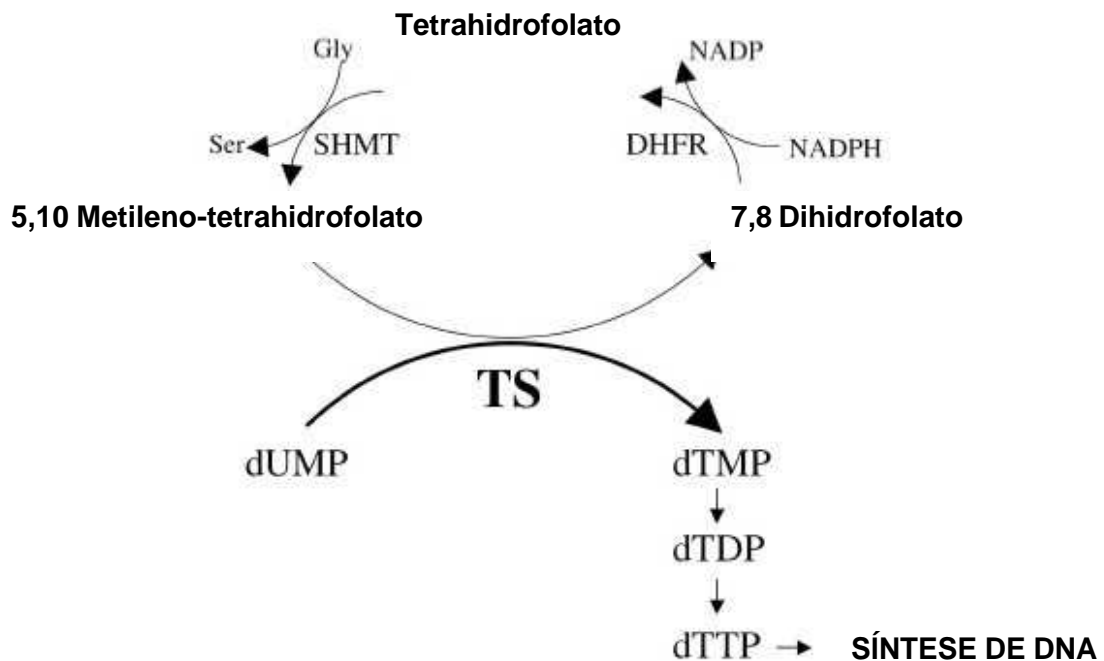


FIGURA 2: Timidilato sintase (TS) catalisa a metilação da 2'-deoxiuridina 5-monofosfato (dUMP) pela transferência de um radical metil do cofator 5,10-metilenotetrahydrofolate para produzir 2'-deoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP). dTMP é posteriormente fosforilado a trifosfato (dTTP) que é o precursor direto da síntese de DNA (Rahman *et al.*, 2004).

A TS é uma enzima essencial na proliferação celular e, assim, um alvo importante para várias drogas antitumorais, incluindo o metotrexato e principalmente o 5-fluoracil (5-FU) (Rots *et al.*, 2000; Welsh *et al.*, 2000). A principal causa de resistência às drogas é a ausência de inibição desta enzima, assim, a expressão de TS tem sido relatada como prognóstico para a resposta ao tratamento citotóxico. A variabilidade interindividual na resposta à quimioterapia também pode ser resultado de variações na concentração da enzima timidilato sintase (TS). Uma seqüência repetitiva foi identificada na região promotora do gene *TS* (Horie *et al.*, 1995). Esta seqüência mostrou ser polimórfica, contendo 2, 3 ou 8 repetições de 28 pb.

A presença de 3 repetições (3R) está associada com maior expressão da enzima TS. Krajinovic *et al.* (2002) observaram que a presença do genótipo homozigoto (3R/3R) está associada com pior prognóstico em crianças portadoras de LLA quando comparadas com crianças que apresentavam no mínimo um alelo da repetição dupla. Resultado semelhante foi relatado para pacientes com câncer de cólon que receberam quimioterapia. A expressão aumentada da enzima TS pode ser um mecanismo pelo qual indivíduos com o genótipo 3R/3R desenvolvem resistência à quimioterapia (Iacopetta *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

Com base nos dados até aqui apresentados, a determinação dos polimorfismos genéticos dos genes *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO* e *TS* pode ser de alto valor clínico no prognóstico de respostas adversas ou inadequadas à certos agentes terapêuticos, bem como quanto ao caráter preventivo relacionado ao risco aumentado de doenças ligadas à exposição ambiental ou ocupacional.

Assim, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Realizar a genotipagem de 132 pacientes de LLA e 300 controles para os genes *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO*, e *TS*.
2. Determinar se as frequências dos genótipos referentes aos genes *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO*, e *TS* mutantes, e de seus respectivos genótipos selvagens, são diferentes em crianças com leucemia linfoblástica aguda em relação aos controles saudáveis, podendo afetar o risco de desenvolvimento desta doença.
3. Investigar a associação entre os polimorfismos funcionais nestes genes e o risco de recidiva da doença e a curva de sobrevida dos pacientes.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

O estudo foi realizado utilizando amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes portadores de LLA, com idade entre 0 e 18 anos, admitidos para tratamento no Serviço de Hematologia/Oncologia do Departamento de Puericultura e Pediatria do HCFMRP-USP. Os pacientes com suspeita de LLA foram diagnosticados de acordo com o quadro clínico e laboratorial. Os exames laboratoriais foram realizados pelo Laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP.

Os pacientes foram agrupados de acordo com o risco de recidiva da doença em grupos de alto risco e baixo risco de recidiva. Como controle foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos com idade entre 0 e 18 anos, representados por pacientes do mesmo hospital, portadores de doenças não hematológicas, não oncológicas e não genético-hereditárias. Os pacientes e os indivíduos controles receberam informações sobre os objetivos da pesquisa e também os formulários para a assinatura do consentimento pós-informação. O projeto em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas, FMRP-USP (processo número 4273/2003), assim como os termos de consentimento pós-informação referentes aos controles e pacientes (Anexos A e B).

A coleta do material foi realizada sob a responsabilidade de médicos e funcionários do Hospital das Clínicas, FMRP-USP. As amostras de sangue periférico

foram coletadas por punção venosa em tubos vacutainer de 5ml contendo *ethylene diamine tetra-acetic acid*(EDTA).

A casuística desse estudo é composta de 132 crianças portadoras de LLA e 300 crianças livres de doenças hematológicas e oncológicas que compuseram o grupo controle. Foram analisados números diferentes de pacientes para cada gene, sendo distribuídos da seguinte forma: 132 pacientes analisados para o gene *CYP2D6*, 123 para o gene *EPHX1*2*, 125 para o gene *EPHX1*3*, 124 para o gene *MPO* e 127 para o gene *TS*.

Os 132 pacientes portadores de LLA, foram distribuídos da seguinte forma: 84 meninos e 48 meninas, com idades entre 4 e 216 meses, sendo 114 brancos, 12 pardos e 6 negros. Foram considerados de alto risco de recidiva os pacientes que apresentaram um ou mais dos seguintes critérios ao diagnóstico: idade inferior a 1 ano ou superior a 10 anos e contagem leucocitária superior a 50.000 leucócitos/mm³. Dentre os pacientes estudados 76 foram considerados de alto risco e 56 considerados de baixo risco de recidiva.

O tratamento dos pacientes com LLA foi realizado de acordo com o protocolo proposto pelo Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia da Infância – (GBTLI LLA-93 e 99). Para o tratamento foi utilizado um esquema de tratamento com o uso de poliquimioterápicos que combinam diversos grupos de quimioterápicos, dentre eles, agentes alquilantes, antimetabólicos, antracíclicos, epipodofilotóxicos entre outros. Pacientes de alto risco de recidiva também receberam radioterapia no crânio (1.800cGy).

No grupo de indivíduos controles, somente foram incluídos na pesquisa aqueles pacientes que seriam submetidos à coleta de sangue periférico para a realização de exames pertinentes ao tratamento a que eles estavam sujeitos. Dessa forma nenhum paciente foi submetido à coleta de sangue apenas para a participação nessa pesquisa.

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A extração do DNA foi feita a partir de amostras de medula óssea e de sangue periférico, utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen) e o kit de extração de DNA (*Wizard[®] Genomic* – Promega), conforme especificações do protocolo fornecido pelo fabricante. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria e as amostras de DNA foram estocadas em alíquotas de 200µl, à concentração de 100ng/µl, e mantido à -20°C até o uso.

3.3 GENOTIPAGEM E PCR – RFLP

Os polimorfismos foram analisados em DNA genômico através da técnica de PCR – RFLP detalhada para cada polimorfismo como descrito a seguir.

Para todos os polimorfismos estudados, os fragmentos foram co-amplificados em termociclador e submetidos à eletroforese (95V) em cuba contendo

tampão TBE 1,0X, para a detecção de alguns genótipos, ou para verificação de amplificação no caso de posterior digestão por enzimas de restrição.

As reações foram visualizadas em gel de agarose convencional ou poliacrilamida, dependendo do tamanho dos fragmentos a serem visualizados. O gel de agarose foi feito com tampão TBE 1,0X e corado com 10µl de brometo de etídio (na concentração de 10 mg/ml), e 4 µl de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol, 40% sacarose em água) para a visualização da corrida.

Para identificar o peso das bandas foram utilizados marcadores de peso molecular de 100 e 50 pares de base (pb) diluídos (216 µl de TE 1X, 40 µl de tampão de amostra, 24 µl de marcador de peso molecular), dependendo do polimorfismo estudado. Em todos os casos, foi usado também um controle negativo, "branco" (todos os reagentes, exceto o DNA), com o intuito de assegurar que não houve contaminação das amostras. Os géis foram então observados e fotografados com filme Polaroid® em transiluminador de luz ultravioleta.

3.3.1 DETECÇÃO DOS GENÓTIPOS *CYP2D6*

CYP2D6 *2 Mutação G>A:  xon 3/  ntron 4

A amplifica o do fragmento correspondente   região polimórfica do éxon 3 do gene *CYP2D6*(G1934A) foi feita baseada nos métodos de Gough *et al.* (1990) e Smith *et al.* (1992) modificados, conforme descrito a seguir:

Para rea o de PCR (25 µl) foram utilizadas as seguintes condi es:

- ✓ 15,80 µl de H₂O MilliQ estéril,
- ✓ 2,5 µl de tampão (20mM Tris-HCl, 50mMKCl, pH 8,4)
- ✓ 0,75 µl (1,5mM) de MgCl₂,
- ✓ 0,5 µl (2mM) de dNTPs (Invitrogen)
- ✓ 1,0 µl (100ng/µl) de cada "primer" (Invitrogen) ,
- ✓ 1,25 (2mM) de dimetil sulfoxido (DMSO),
- ✓ 0,2 µl (1,0U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen),
- ✓ 2,0 µl (200ng) de DNA genômico,
- ✓ O ciclo de amplificação foi: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 62°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e 94°C por 1 minuto, seguidos de 7 minutos a 72°C.
- ✓ A seqüência dos "primers" utilizados foi:

PF: 5'-GCCTTCGCCAACCACTCCG-3'

PR: 5'-AAATCCTGCTCTTCCGAGGC-3'

Após a reação de amplificação do fragmento de interesse, a reação de digestão foi realizada com 20 µl do produto de PCR, utilizando 1,75 µl de H₂O, 2,5 µl de tampão da enzima, 0,25 µl de BSA (*bovine serum albumin*) e 5U da enzima de restrição *Bst*I (New England BioLabs). Para evitar evaporação das amostras adicionamos 50µl de óleo mineral em cada tubo; A reação foi incubada à 60°C por 3 horas e posteriormente analisado em gel de agarose 2,0%.

O produto amplificado gera um fragmento de 334 pb. O polimorfismo do gene *CYP2D6* é caracterizado pela presença ou ausência do sítio para a enzima de restrição *Bst*I. A ausência do sítio de restrição em ambos os alelos representa o genótipo homozigoto para o alelo polimórfico (*PM*), o qual é caracterizado pela presença de um fragmento de 334 pb. A presença do sítio *Bst*I em ambos os alelos,

reflete a ausência do polimorfismo, originando o genótipo tipo selvagem (*EM*), que apresenta dois fragmentos: 230 e 104 pb. Um alelo polimórfico e outro normal caracterizam o genótipo heterozigoto (*HEM*), mostrando os três padrões de bandamento: 334, 230 e 104 pb.

CYP2D6 deleção: éxon 5/íntron 5

As condições de reação de PCR (25 µl) para detecção do polimorfismo no éxon 5 do gene *CYP2D6* foram seguidas baseadas no seguinte protocolo :

- ✓ 15,80 µl de H₂O MilliQ estéril,
- ✓ 2,5 µl de tampão (20mM Tris-HCl, 50mMKCl, pH 8,4)
- ✓ 0,75 µl (1,5mM) de MgCl₂,
- ✓ 0,5 µl (2mM) de dNTPs (Invitrogen),
- ✓ 1,0 µl (100ng/µl) de cada "primer" (Invitrogen),
- ✓ 1,25 µl (5%) de dimetil sulfoxido (DMSO),
- ✓ 0,2 µl (1,0U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen),
- ✓ 2,0 µl (200ng) de DNA genômico,
- ✓ O ciclo de amplificação foi: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 60°C por 1 minuto, 72°C por 3 minutos e 94°C por 1 minuto, seguidos de 7 minutos a 72°C.
- ✓ A seqüência dos "primers" utilizados foi:

PF: 5'- GATGAGCTGCTAACTGAGCCC-3'

PR: 5'- CCGAGAGCATACTCGGGAC-3'

Após a reação de amplificação, a reação de digestão foi realizada com 20 µl do produto de PCR. A reação foi realizada com 5U da enzima MspI, 2,25 µl de

H₂O e 2,5 µl de tampão da enzima à uma temperatura de 37°C por 3 horas. Nessa reação não foi necessária a utilização de óleo mineral. O polimorfismo do gene *CYP2D6* (E5) é caracterizado pela presença de um ou mais sítios para a enzima de restrição *MspI*. A amplificação gera um produto constante de 270 pb. O genótipo homozigoto para o alelo polimórfico (**3/*3*) possui dois sítios para esta enzima, que cliva o produto da amplificação, gerando uma banda de 166pb, uma de 82pb e outra de 22pb. O genótipo homozigoto selvagem (**1/*1*) apresenta duas bandas: uma de 188pb e outra de 82pb; o genótipo heterozigoto apresenta quatro bandas: 188pb, 166pb, 82pb e 22pb.

3.3.2 DETECÇÃO DOS GENÓTIPOS *EPHX1*

A amplificação dos fragmentos correspondentes às regiões polimórficas dos éxons 3 (T/C) e 4 (A/G) do gene *EPHX1* foi feita pelo método de Smith & Harrison (1997) modificado, conforme descrito a seguir:

- ✓ 16,05 µl de H₂O MilliQ estéril,
- ✓ 2,5 µl de tampão (20mM Tris-HCl, 50mMKCl, pH 8,4)
- ✓ 0,75 µl (1,5mM) de MgCl₂,
- ✓ 0,5 µl (2mM) de dNTPs (Invitrogen),
- ✓ 1,0 µl (100ng/µl) de cada "primer" (Invitrogen),
- ✓ 1,0 µl (4%) de dimetil sulfoxido (DMSO),
- ✓ 0,2 µl (1,0U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen),
- ✓ 2,0 µl (200ng) de DNA genômico,

- ✓ O ciclo de amplificação foi: 94°C por 5 minutos, 38 ciclos de 56°C por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e 94°C por 1 minuto, seguidos de 5 minutos a 72°C.
- ✓ A seqüência dos "primers" utilizados foi:

EPHX1*2 *mutação T>C éxon 3*

PF: 5'-GATCGATAAGTTCCGTTTCACC-3'

PR: 5'-ATCCTTAGTCTTGAAGTGAGGAT-3'

A reação de digestão foi realizada com 5U da enzima *EcoRV*, 1,9µl de H₂O e 2,5 µl de tampão da enzima, à uma temperatura de 37°C por 3 horas. A amplificação gera um produto de 162 pb. O homozigoto selvagem apresenta o sítio para a enzima, sendo caracterizado por dois fragmentos: 140 pb e 20pb. O homozigoto mutante não apresenta sítio para a enzima, apresentando um único fragmento de 162 pb. O genótipo heterozigoto apresenta os três fragmentos.

EPHX1 *3 *mutação A>G éxon 4*

- ✓ A seqüência dos "primers" utilizados foi:

PF: 5'-ACATCCACTTCATCCACGT-3'

PR: 5'-ATGCCTCTGAGAAGCCAT-3'

Após a reação de amplificação do fragmento de interesse, a reação de digestão foi realizada com 20 µl do produto de PCR. A reação foi realizada com 6U da enzima *RsaI*, 2,0 µl de H₂O, 2,5 µl de tampão da enzima e 0,25 µl de BSA à uma

temperatura de 37°C por 3 horas. O polimorfismo do gene *EPHX1* (E4) é caracterizado pela presença ou ausência do sítio para a enzima de restrição *RsaI*. A amplificação gera um produto constante de 210 pb, referente ao genótipo selvagem (**1/*1*), o qual não sofre ação da enzima *RsaI*, originando um fragmento único. O genótipo homocigoto para o alelo polimórfico (**3/*3*) possui um sítio para esta enzima, que cliva o produto da amplificação, gerando uma banda de 164 e outra de 46 pb, e o genótipo heterocigoto (**1/*3*) apresenta as três bandas (210, 164 e 46pb).

3.3.3 DETECÇÃO DOS GENÓTIPOS *MPO*

MPO mutação *G>A*

O polimorfismo do gene *MPO* e a reação de amplificação em cadeia por PCR foram obtidos baseados em London et al., (1997), e o protocolo modificado conforme descrito a seguir:

- ✓ 17,05 µl de H₂O MilliQ estéril,
- ✓ 2,5 µl de tampão (20mM Tris-HCl, 50mMKCl, pH 8,4)
- ✓ 0,75 µl (1,5mM) de MgCl₂,
- ✓ 0,5 µl (2mM) de dNTPs (Invitrogen),
- ✓ 1,0 µl (100ng/µl) de cada "primer" (Invitrogen),
- ✓ 0,2 µl (1,0U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen),
- ✓ 2,0 µl (200ng) de DNA genômico,
- ✓ O ciclo de amplificação foi: 94°C por 5 minutos, 38 ciclos de 57°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 94°C por 1 minuto, seguidos de 5 minutos a 72°C.

- ✓ A seqüência dos “primers” utilizados foi:

PF: 5'-CGGTATAGGCACACAATGGTGAG-3'

PR: 5'-GCAATGGTTCAAGCGATTCTTC-3'

Após a reação de amplificação do fragmento de interesse, a reação de digestão foi realizada com 20 µl do produto de PCR. A reação foi realizada com 6U da enzima *AclI*, 2,4 µl de H₂O e 2,0 µl de tampão da enzima, à uma temperatura de 37°C por 3 horas. O polimorfismo do gene *MPO* é caracterizado pela presença ou ausência de um ou dois sítios para a enzima de restrição *AclI*. A amplificação gera um produto constante de 350 pb. Após a digestão, o genótipo selvagem (**1/*1*), sofre ação da enzima *AclI* em dois sítios, originando fragmentos de 169pb, 120pb e 61pb. O genótipo homozigoto para o alelo polimórfico (**3/*3*) possui um sítio para esta enzima, que cliva o produto da amplificação, gerando um fragmento de 289pb e outro de 61 pb; e o genótipo heterozigoto (**1/*3*) apresenta os quatro fragmentos.

3.3.4 DETECÇÃO DOS GENÓTIPOS *TS*

A amplificação do fragmento correspondente à região polimórfica do gene *TS* foi feita baseada nos métodos de Villafranca *et al.*, (2001) modificados, conforme descrito a seguir:

- ✓ 16,80 µl de H₂O MilliQ estéril,
- ✓ 2,5 µl de tampão (20mM Tris-HCl, 50mMKCl, pH 8,4)

- ✓ 0,75 µl (1,5mM) de MgCl₂,
- ✓ 0,5 µl (2mM) de dNTPs (Invitrogen),
- ✓ 1,0 µl (100ng/µl) de cada "primer" (Invitrogen),
- ✓ 1,25 µl (5%) de DMSO
- ✓ 0,2 µl (1,0U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen),
- ✓ 2,0 µl (200ng) de DNA genômico,
- ✓ O ciclo de amplificação foi: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 62°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e 94°C por 1 minuto, seguidos de 7 minutos a 72°C.
- ✓ A seqüência dos "primers" utilizados foi:

PF: 5'-GTGGCTCCTGCGTTTCCCC-3'

PR: 5'CCAAGCTTGGCTCCGAGCCGGCCACAGGCATGGCGCGG-3'

O polimorfismo do gene *TS* caracteriza-se por uma repetição em tandem, podendo apresentar uma repetição dupla (2R2R) ou uma repetição tripla (3R3R). Homozigotos para a repetição dupla produzem um fragmento de 220pb; heterozigotos (2R3R) produzem dois fragmentos, sendo um de 220 e outro de 250 pb. Finalmente o homozigoto para a tripla repetição apresenta um fragmento de 250pb.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A freqüência dos polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO* e *TS* foi calculada para a amostra total de 132 crianças portadoras de LLA e para os 300 indivíduos controles. Os pacientes e controles foram analisados de acordo com o sexo (masculino e feminino), idade e etnia (brancos, negros ou mulatos). Os pacientes

foram divididos de acordo com o risco de recidiva da doença (alto e baixo risco) e resposta ao tratamento (remissão clínica completa ou recidiva + óbitos).

A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui Quadrado, que foi aplicado para verificar a significância estatística das associações quando se comparou as frequências de cada genótipo e alelo estudados na amostra total de pacientes e controles. O nível de probabilidade (P) menor ou igual a 0,05 foi usado como critério de significância. A "odds ratio" (OR) (razões de probabilidade) e o intervalo de confiança (IC) de 95%, de acordo com Kleinbaum *et al.* (1982), foram calculados como uma estimativa de risco relativo e grau de associação. A estimação das curvas de sobrevivência foi determinada pelo método de Kaplan-Meier e comparação entre as mesmas pelo teste do Log-Rank.

A assessoria estatística foi prestada pelo estatístico Geraldo Cássio Reis.

4. RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS

O polimorfismo do gene *CYP2D6* é caracterizado pela presença ou ausência do sítio para as enzimas *Bst*M e *Msp*I. No polimorfismo *Bst*M, o genótipo tipo selvagem (*EM*), apresenta dois fragmentos, 230 e 104 pb; o genótipo heterozigoto (*HEM*), apresenta três fragmentos: 334, 230 e 104 pb e finalmente o homozigoto mutante (*PM*) apresenta apenas um fragmento de 334pb. Para o polimorfismo *Msp*I, o genótipo homozigoto polimórfico apresenta uma banda de 166pb, uma de 82pb e outra de 22pb. O genótipo homozigoto selvagem apresenta duas bandas (188pb e 82pb) e o genótipo heterozigoto apresenta quatro bandas: 188pb, 166pb, 82pb e 22pb. As FIGURAS 3 e 4 mostram os polimorfismos *Bst*M e *Msp*I respectivamente.

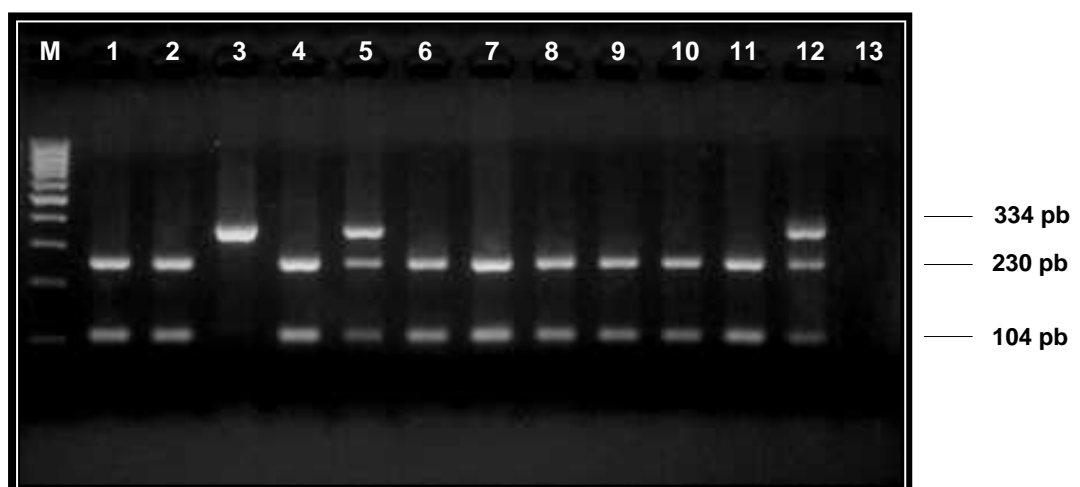


FIGURA 3: PCR-RFLP em gel de agarose convencional 2% para detecção do polimorfismo *CYP2D6-Bst*M, onde M= marcador de peso molecular (100 pb). Linhas 1, 2, 4, 6-11: homozigotos para o alelo selvagem (*EM*); Linhas 5, 12: heterozigoto (*HEM*); Linha 3: homozigoto para o alelo polimórfico (*PM*); Linha 13: branco.



FIGURA 4: PCR-RFLP em gel de poliacrilamida 10% para detecção do polimorfismo *CYP2D6-MspI*, onde M= marcador de peso molecular (100 pb). Linhas 1, 3-5, 7-12: homozigoto para o alelo selvagem (*EM/EM*); Linhas 2, 6: heterozigoto (*HEM/EM*); Linha 13: branco.

A FIGURA 5 representa o polimorfismo para o gene *EPHX1*2*. A amplificação gera um produto de 162 pb. O homozigoto selvagem apresenta o sítio para a enzima *EcoRV*, sendo caracterizado por dois fragmentos: 140 pb e 20pb. O homozigoto mutante não apresenta sítio para a enzima, apresentando um único fragmento de 162 pb. O genótipo heterozigoto apresenta três fragmentos (162 pb, 140pb e 20pb). O polimorfismo do gene *EPHX1(E4)* é caracterizado pela presença ou ausência do sítio para a enzima de restrição *RsaI*. A amplificação gera um produto constante de 210 pb, referente ao genótipo selvagem (**1/*1*), o qual não sofre ação da enzima *RsaI*, originando uma banda não clivada. O genótipo homozigoto para o alelo polimórfico (**3/*3*) possui um sítio para esta enzima, que cliva o produto da amplificação, gerando uma banda de 164 e outra de 46 pb, e o genótipo heterozigoto (**1/*3*) apresenta as três bandas (FIGURA 6).

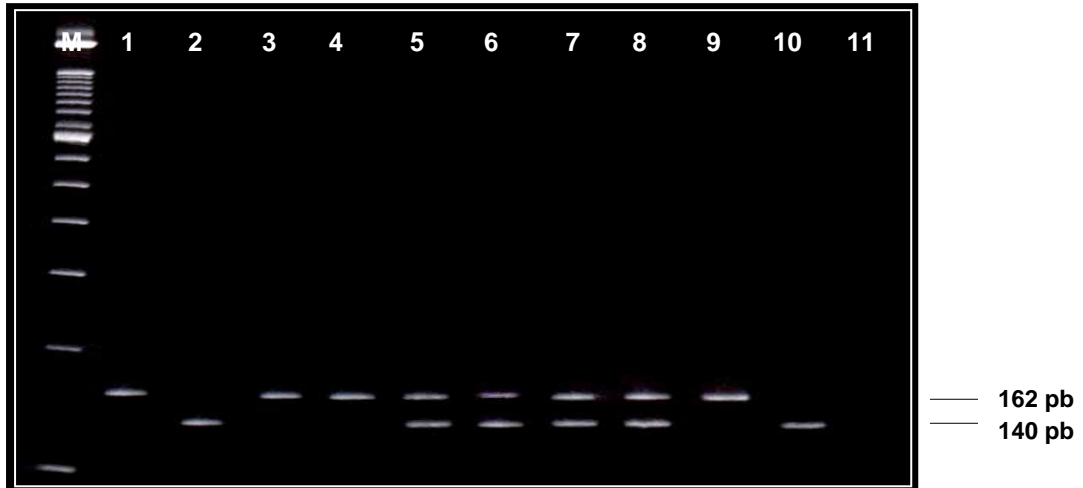


FIGURA 5: PCR-RFLP em gel de poliacrilamida 10% para detecção do polimorfismo *EPHX1-EcoRV*, onde M= marcador de peso molecular (100 pb); Linhas 2, 9: homocigotos selvagens (**1/*1*); Linhas 1, 3, 4, 9: homocigotos para o alelo polimórfico (**3/*3*); Linhas 5- 8: heterocigotos (**1/*3*); Linha 11: branco.

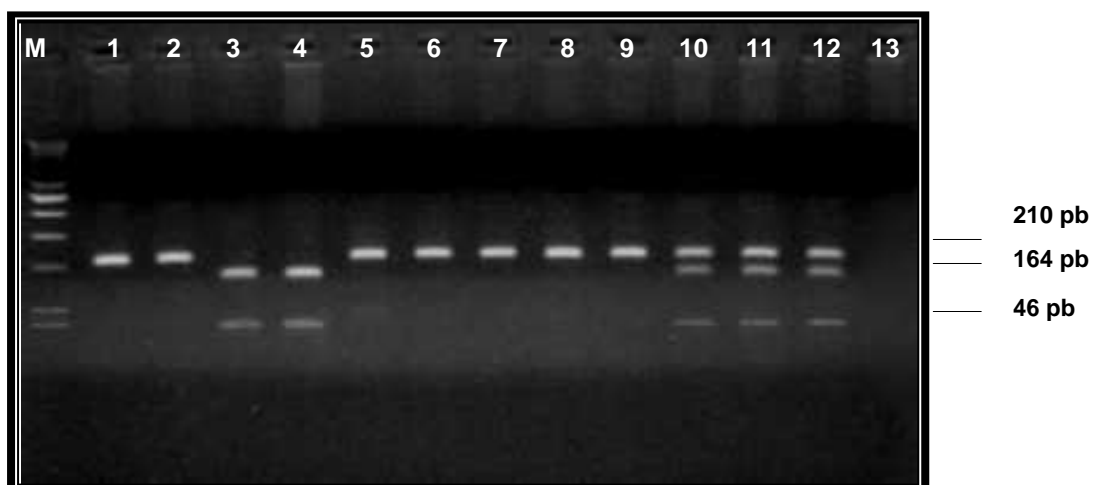


FIGURA 6: PCR-RFLP em gel de agarose convencional 2% para detecção do polimorfismo *EPHX1-RsaI*, onde M= marcador de peso molecular (100 pb); Linhas 1,2,5-9: homocigotos selvagens (**1/*1*); Linhas 3 e 4: homocigotos para o alelo polimórfico (**3/*3*); Linhas 10- 12: heterocigotos (**1/*3*); Linha 13: branco.

O polimorfismo do gene *MPO* é caracterizado pela presença ou ausência de um ou dois sítios para a enzima de restrição *AclI*. A amplificação gera um produto constante de 350 pb. Após a digestão, o genótipo selvagem ($*1/*1$), sofre ação da enzima *AclI* em dois sítios, originando fragmentos de 169pb, 120pb e 61pb. O genótipo homozigoto para o alelo polimórfico ($*3/*3$) possui um sítio para esta enzima, que cliva o produto da amplificação, gerando um fragmento de 289pb e outro de 61 pb; e o genótipo heterozigoto ($*1/*3$) apresenta os quatro fragmentos. A FIGURA 7 apresenta um perfil de PCR-RFLP para o polimorfismo do gene *MPO*.

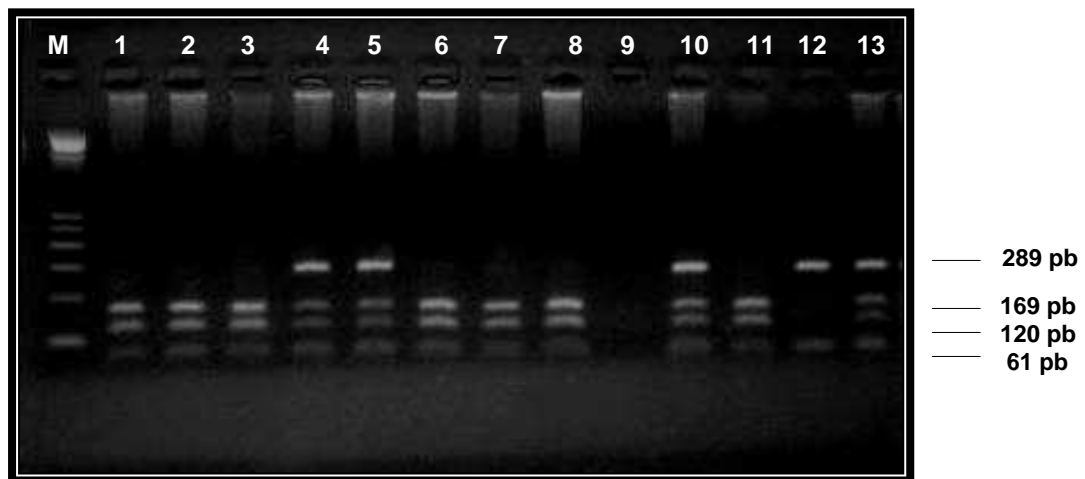


FIGURA 7: PCR-RFLP em gel de agarose convencional 2% para detecção do polimorfismo *MPO-AclI*, onde M= marcador de peso molecular (100 pb); Linhas 1-3, 6-8, 11: homozigotos selvagens ($*1/*1$); Linhas 4, 5, 10 e 13: heterozigotos ($*1/*3$); Linha 12: homozigoto para o alelo polimórfico ($*2/*2$); Linha 9: branco.

A FIGURA 8 apresenta um perfil do polimorfismo do gene *7S*. O polimorfismo do gene *7S* caracteriza-se por uma repetição em tandem, podendo apresentar uma repetição dupla (2R2R) ou uma repetição tripla (3R3R). Homozigotos para a repetição dupla produzem um fragmento de 220pb; heterozigotos (2R3R) produzem dois fragmentos, sendo um de 220 e outro de 250 pb. Finalmente o homozigoto para a tripla repetição apresenta um fragmento de 250pb.



FIGURA 8: PCR em gel de agarose convencional 2% para detecção do polimorfismo 3R, onde M= marcador de peso molecular (100 pb); Linhas 1-4, 6, 8, 9: heterozigotos 2R3R; Linha 5: homozigoto 2R2R; Linha 7: homozigoto 3R3R; Linha 10: branco.

4.2. DISTRIBUIÇÕES DOS GENÓTIPOS *CYP2D6*, *TS*, *EPHX1* E *MPO*

As distribuições das freqüências genotípicas e alélicas para os genes *CYP2D6* (polimorfismos *BstM* e *MspI*), *EPHX1* (polimorfismos *EcoRV* e *RsaI*), *TS* (*3R*) e *MPO* (polimorfismo *AciI*), para a amostra total de crianças portadoras de LLA e controles de um grupo étnico similar estão apresentadas na TABELA 1.

Quando foi analisada a freqüência do polimorfismo para o gene *CYP2D6* – *BstM* para a amostra total de LLA (n = 132) e controles (n = 300), o genótipo homocigoto para o alelo polimórfico (*PM*) foi detectado em 3,8% das crianças com LLA e em 2,0% dos controles livres de neoplasias (TABELA 1). Para o genótipo heterocigoto (*HEM*) verificou-se que a freqüência deste foi maior entre os pacientes com LLA (27,3%) comparados aos indivíduos controles (20,3%), entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p = 0,10$).

As freqüências alélicas para o alelo polimórfico raro no locus *BstM* (*PM*) foram 0,20 para as crianças com LLA e 0,13 para os controles. Os dados mostram que não houve diferença significativa na freqüência deste alelo raro entre os grupos, embora com maior prevalência entre os casos de LLA ($p = 0,25$) (TABELA 1).

Para o polimorfismo *CYP2D6* – *MspI* não foram observados genótipos homocigotos para o alelo polimórfico. Quanto ao genótipo heterocigoto, a freqüência foi maior nos casos (13,6%) quando comparada aos controles (5,3%) ($p = 0,003$), mostrando uma diferença estatisticamente significativa.

Quanto ao polimorfismo para o gene *EPHX1* foram analisadas duas variantes alélicas sendo uma responsável pelo metabolismo lento e a outra pelo metabolismo rápido. Para o *EPHX1*(E3) – alelo lento, de acordo com a amostra total de crianças portadoras de LLA (n = 123) e controles (n = 300), encontramos uma prevalência aumentada do genótipo selvagem ($*1/*1$) entre os pacientes (43,9%) com relação aos controles (17,0%). Por outro lado, obtiveram-se frequências maiores do genótipo heterozigoto ($*1/*2$) nos indivíduos controles (81%) em comparação com as crianças portadoras de LLA (55,3%) (TABELA 1). Com relação ao genótipo homozigoto polimórfico ($*2/*2$), o mesmo foi extremamente raro e somente encontrado em 6 controles e em apenas 1 paciente, entretanto não apresentou diferença estatisticamente significativa.

O teste do qui quadrado aplicado sobre estes resultados, mostrou que o aumento na frequência do genótipo heterozigoto entre os indivíduos controles foi estatisticamente significativo ($p = 0,001$). A frequência do alelo polimórfico raro ($*2$), foi significativamente maior ($p = 0,0001$) entre os indivíduos controles sem neoplasias comparados aos pacientes de LLA. A distribuição das frequências genotípicas entre os controles encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em relação ao polimorfismo para a variante rápida *EPHX1*(E4), considerando o número amostral (LLA: 125; Controles: 300), as frequências do genótipo homozigoto selvagem ($*1/*1$) encontradas para as crianças portadoras de LLA (62,4%) e para os controles (70,0%) foram similares. Para o genótipo heterozigoto ($*1/*3$) verificou-se que a prevalência deste também não diferiu de forma significativa entre os dois grupos estudados (35,2%, LLA; 25,6%, controles; $p =$

0,07), o mesmo ocorrendo para o genótipo homocigoto polimórfico (**3/*3*) (2,4%, LLA; 4,4%, controles; $p=0,65$).

TABELA 1: Distribuição das frequências dos polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO* e *TS*, em crianças portadoras de LLA e indivíduos controles

LOCUS	GENÓTIPO	NÚMERO (%)		OR (95% IC)	P
		LLA	Controles		
<i>CYP2D6</i> (G1934A) <i>BstM</i>	EM	91/132 (68,9)	233/300(77,7)	1,0 (referência)	-
	HEM	36/132 (27,3)	61/300 (20,3)	0,66 (0,41 -1,06)	0,10
	PM	5/132 (3,8)	6/300 (2,0)	0,46 (0,13 -1,57)	0,30
	PM/HEM	41/132 (31,06)	67/300 (23,3)	0,63 (0,40-1,00)	0,07
	<i>A</i> <i>lelos</i>				
	Wt	0,80	0,87	-	
	M	0,20	0,13	-	0,25
<i>CYP2D6</i> (Deleção E5) <i>MspI</i>	*1/*1	114/132 (86,4)	284/300 (94,7)	1,0 (referência)	-
	*1/*3	18/132 (13,6)	16/300 (5,3)	2,8 (1,38 - 5,69)	0,0003
	*3/*3	-	-	-	
	*1/*3 + *3/*3	-	-	-	
	Alelos				
	*1	0,92	0,97	-	
	*3	0,08	0,03	-	0,21
<i>EPHX1</i> (E3) <i>EcoRV</i>	*1/*1	54/123 (43,9)	51/300 (17,0)	1,0 (referência)	-
	*1/*2	68/123 (55,3)	243/300 (81,0)	3,78(2,3-6,04)	0,0001
	*2/*2	1/123 (0,8)	6/300 (2,0)	6,35(0,73-54,0)	0,11
	*1/*2 + *2/*2	69/123 (56,0)	249/300 (83,0)	3,82(2,39-6,09)	0,0001
	Alelos				
	*1	0,91	0,86	-	
	*2	0,09	0,14	-	0,37
<i>EPHX1</i> (E4) <i>RsaI</i>	*1/*1	78/125 (62,4)	210/300 (70,0)	1,0 (referência)	-
	*1/*3	44/125 (35,2)	77/300 (25,6)	0,65(0,41-1,02)	0,07
	*3/*3	3/125 (2,4)	13/300 (4,4)	1,6(0,44-5,08)	0,65
	*1/*3 + *3/*3	47/130 (37,6)	90/300 (30,0)	0,71(0,45-1,10)	0,13
	<i>A</i> <i>lelos</i>				

*1	0,85	0,80	-	
*3	0,15	0,20	-	0,45

continuação

LOCUS	GENÓTIPO	NÚMERO (%)			P
		LLA	Controles	OR (95% IC)	
<i>TS (2R, 3R)</i>	2R/2R	33/127 (26,0)	53/300 (17,7)	1,0 (referência)	-
	2R/3R	65/127 (51,2)	169/300(56,3)	1,61 (0,96-2,72)	0,07
	3R/3R	29/127 (22,8)	78/300 (26,0)	1,67 (0,91-3,07)	0,12
	2R3R+3R/3R	94/127 (74,0)	247/300(82,3)	1,64 (1,03-2,55)	0,05
	Alelos				
	2R	0,51	0,45	-	
	3R	0,49	0,55	-	1,00
<i>MPO Acil</i>	*1/*1	71/124(57,3)	159/300(53,0)	1,0 (referência)	-
	*1/*2	46/124(37,1)	124/300(41,3)	1,24(0,77-1,88)	0,43
	*2/*2	7/127 (5,6)	17/300(5,7)	1,08 (0,43 -2,73)	1,00
	*1/*2 + *2/*2	53/124(42,7)	141/300(47,0)	1,18(0,78-1,81)	0,45
	<i>A lelos</i>				
*1	0,75	0,72	-		
*2	0,25	0,28	-	0,74	

LLA = leucemia linfoblástica aguda; EM = metabolizador rápido; HEM = heterozigoto; PM = metabolizador pobre; wt = alelo selvagem; m = alelo polimórfico; 2R/2R, *1/*1 = homozigotos para o alelo selvagem; 2R/3R, *1/*2, *1/*3 = heterozigotos; 3R/3R, *2/*2, *3/*3 = homozigotos para o alelo polimórfico. OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste do χ^2 . † = estatisticamente significativo.

As frequências alélicas para o alelo polimórfico no locus *RsaI* (*3) foram 0,15 e 0,20 para pacientes com LLA e controles, respectivamente (TABELA 1), não observando diferença significativa do alelo raro *3 entre os grupos ($p = 0,45$). Esta distribuição encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na análise do fenótipo, os genótipos dos exóons 3 e 4 foram combinados e os grupos foram classificados da seguinte maneira: metabolizador lento, muito lento, rápido e normal (TABELA 2). A frequência dos metabolizadores normais foi levemente maior no grupo de casos (50,4%) em relação aos controles (32,0 %). A frequência do fenótipo rápido foi inferior (9,0%) no grupo de controles comparada no grupo de pacientes portadores de LLA (16,3 %), embora esse resultado não seja significativo estatisticamente. Foi observada uma frequência significativamente maior ($p= 0,0001$) do fenótipo lento entre os controles (57,7%) quando comparados aos pacientes portadores de LLA (32,5%).

A análise do gene da mieloperoxidase (*MPO*, polimorfismo-Aci I), foi realizada em uma amostra de 300 indivíduos controles e 124 pacientes de LLA. Foi observada uma frequência equivalente do genótipo selvagem entre os casos e controles (57,3% e 53,0% respectivamente). A frequência do alelo mutante também foi similar entre os dois grupos analisados (0,25 e 0,28 para casos e controles respectivamente).

Quanto ao polimorfismo para o gene *TS*, a frequência alélica da tripla repetição *in tandem* (3R) foi de 55,0% nos controles e de 49,0% nos pacientes com LLA. O genótipo 2R3R esteve presente em 169 dos 300 controles e em 65 dos 127 pacientes. O genótipo homozigoto para a tripla repetição esteve presente em 26% dos controles e em 22,8% dos pacientes, mostrando que não houve diferença significativa entre os grupos ($p= 0,12$). Entretanto, quando agrupamos os genótipos que apresentaram pelo menos uma repetição tripla (2R3R e 3R3R), os controles

apresentaram uma frequência significativamente maior em relação ao grupo de pacientes com LLA ($p = 0,05$; OR = 1,64, IC = 1,03-2,55), indicando um efeito protetor.

TABELA 2: Associação entre os genótipos e o risco de LLA

LOCUS	FENÓTIPO	NÚMERO (%)		OR (95% IC)	<i>P</i>
		LLA	Controles		
<i>EPHX1</i> Éxon 3 e 4	Rápido	20/123(16,3)	27/300 (9,0)	0,84 (0,45-1,68)	0,73
	Normal	62/123 (50,4)	96/300(32,0)	1,0 (referência)	-
	Lento	40/123 (32,5)	173/300 (57,7)	2,79 (1,74-4,46)	0,0001
	Muito lento	1/123 (0,8)	4/300 (1,3)	2,58 (0,28-23,67)	0,64
Genótipos combinados					

LLA = leucemia linfoblástica aguda; Determinação fenotípica: rápido: exon3 *1/*1 e exon 4 *3/*3 ou *1/*3; normal: exon 3 *1/*1 e exon 4 *1/*1 ou exon 3 *1/*2 e exon 4 *1/*3; lento: exon 3 *1/*2 e exon 4 *1/*1; muito lento: exon 3 *2/*2 e exon 4 *1/*1. OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; *P*= os valores foram calculados pelo teste do χ^2 . Negrito = estatisticamente significativo.

4.3. DISTRIBUIÇÕES DOS GENÓTIPOS *CYP2D6*, *TS*, *EPHX1* E *MPO* EM RELAÇÃO AO SEXO E ETNIA

As frequências dos genótipos *CYP2D6*, *TS*, *EPHX1* e *MPO*, para as crianças com leucemia e controles também foram correlacionados com sexo (TABELA 3) e etnia (TABELAS 4, 5, 6 e 7). As frequências de *CYP2D6* *1/*3, *1/*4 e *4/*4 foram 15,5%, 28,6% e 4,8%, respectivamente, em crianças com LLA do sexo masculino; 6,6%, 22,1% e 2,2% em controles do mesmo sexo (TABELA 3).

As frequências correspondentes para o sexo feminino foram 10,4%, 25,0% e 2,1%, respectivamente, em crianças portadoras de LLA; 4,3%, 18,9% e 1,8% nos controles (TABELA 3).

Considerando cada sexo separadamente, pode ser observado que as frequências dos genótipos heterozigotos e homozigoto polimórfico para *CYP2D6* apresentaram uma prevalência maior entre meninos e meninas portadores de LLA em comparação com os respectivos controles masculino e feminino (TABELA 3).

Comparando o sexo masculino com o feminino, verificou-se que as frequências dos genótipos heterozigotos e homozigoto polimórfico para *CYP2D6* foram maiores no sexo masculino tanto entre as crianças portadoras de LLA como entre os controles. Entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p = 0,60$, $p = 0,68$ e $p = 0,65$, respectivamente para LLA; $p = 0,44$, $p = 0,56$ e $p = 1,00$, respectivamente para os controles) (TABELA 3).

Quando o polimorfismo *T5* foi estudado nos grupos de crianças com LLA e controle, subdivididos em masculino e feminino, verificou-se pela análise do genótipo *2R/2R* que as crianças portadoras de LLA (27,2%) e controles (22,8%), ambos do sexo masculino, apresentaram uma frequência maior deste genótipo do que os mesmos grupos femininos (23,9%, LLA e 13,4%, controles). O inverso ocorreu para o genótipo *2R/3R*, nesse caso, as crianças com LLA (54,4%) e controles (64,6%), ambos do sexo feminino, apresentaram uma frequência mais elevada deste genótipo do que os mesmos grupos masculinos (49,4%, LLA e 46,3%, controles). Entretanto, somente para os controles a diferença na frequência do genótipo heterozigoto para o gene *T5* entre os sexos masculino e feminino foi estatisticamente significativa,

demonstrando que a chance de apresentar o genótipo heterozigoto $2R/3R$ é 2,4 vezes maior no sexo feminino do que no masculino (OR = 2,4; 95% IC = 1,3-4,4; $p = 0,01$; TABELA 3) Este resultado sugere uma associação significativa do genótipo $TS2R/3R$ com risco reduzido de leucemia no grupo feminino.

Quanto ao polimorfismo $EPHX1$, comparando o sexo masculino com o feminino, verificou-se que a frequência do genótipo heterozigoto ($*1/*2$) foi maior no sexo feminino entre as crianças portadoras de LLA, enquanto que nos controles a frequência do mesmo, foi maior no sexo masculino. Entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p = 0,26$ e $p = 0,54$, respectivamente) (TABELA 3). Ainda pela análise da TABELA 4, verificou-se que não houve diferença significativa nas frequências do genótipo $*2/*2$ entre os sexos masculino e feminino nos dois grupos de estudo.

Assim, em alguns casos as frequências de determinados alelos foram superiores nos sexos masculino ou feminino, porém não foram significativas, ocorrendo o mesmo para as frequências dos diferentes genótipos para o gene $EPHX1$ entre as amostras estudadas com relação ao parâmetro sexo (TABELA 4).

Entretanto, para o polimorfismo MPO , observou-se, em relação ao genótipo heterozigoto ($*1/*2$), que as crianças com LLA (44,4%) e controles (44,8%), todas do sexo masculino, apresentaram uma frequência maior deste genótipo em comparação com os mesmos do sexo feminino (23,3%, LLA; 38,8%, controles), com diferença estatisticamente significativa entre os sexos nas crianças portadoras de leucemia ($p = 0,02$), verificando-se uma prevalência 2,8 vezes maior do genótipo $*1/*2$ no sexo masculino (OR = 0,36; 95% IC = 0,15-0,8). Este resultado sugere uma

associação significativa do genótipo *MPO**1/*2 com risco aumentado de leucemia no grupo masculino.

Comparando as crianças portadoras de LLA do sexo masculino e feminino com os seus respectivos controles (TABELA 3), observamos uma prevalência significativamente maior do genótipo heterozigoto *1/*3 para os genes *CYP2D6* e *EPHX1* somente entre as crianças portadoras de LLA do grupo masculino quando comparadas aos respectivos controles masculinos ($p = 0,039$ e $0,04$, OR = 0,39 e 0,5, respectivamente, conferindo um risco 2 vezes maior de leucemia entre os meninos. A associação do genótipo *EPHX1**1/*3 com risco aumentado de LLA infantil não foi verificada quando considerada a amostra total de pacientes e controles. Por outro lado, encontramos freqüências significativamente maiores do genótipo *EPHX1**1/*2 entre os controles de ambos os sexos quando comparados aos respectivos grupos de crianças com LLA, masculino e feminino ($p < 0,0001$ e $p = 0,01$).

Quanto às etnias, os grupos foram divididos em brancos, pardos e negros, tanto para as crianças portadoras de leucemia quanto para os controles. Considerando as crianças portadoras de LLA, detectou-se a presença dos genótipos heterozigotos para o gene *CYP2D6* (*1/*3 e *1/*4), respectivamente, em 14,9% e 25,4% das crianças brancas, 0,0% e 33,3% das crianças pardas e 16,7% e 50,0% das crianças negras. Com relação aos controles, as freqüências correspondentes foram 6,2% e 22,5% nos brancos, 3,4% e 16,9% nos pardos e 6,1% e 18,2% nos negros. O genótipo *4/*4 (polimórfico) foi mais prevalente nos brancos tanto em crianças com leucemia como nos controles. Com bases nesses dados, verificou-se que não houve variações significativas na prevalência dos polimorfismos entre as diferentes etnias avaliadas

(TABELAS 4 e 5). O mesmo ocorreu quando comparados controles brancos e não brancos (pardos + negros).

Considerando os genótipos heterozigotos $*1/*3$ e $*1/*4$ para o polimorfismo *CYP2D6* detectaram-se, respectivamente, frequências aumentadas destes genótipos em crianças portadoras de LLA do grupo branco (14,9% e 38,9%) com relação aos respectivos controles (6,2% e 17,2%), conferindo um risco aumentado (OR = 2,66 e 3,0; 95% IC = 1,2-5,9 e 1,05-8,7) para o desenvolvimento de LLA na infância na população caucasiana ($p = 0,02$ e $0,05$). Quando comparados controles brancos e não brancos (pardos + negros) para os diversos genótipos analisados, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa (TABELA 6).

TABELA 3: Distribuição das crianças portadoras de LLA e indivíduos controles, em relação às frequências dos polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *TS*, *EPHX1* e *MPO*, de acordo com o sexo

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	Masculino	Feminino		
<i>CYP2D6</i> $(*3)*1*1$				
LLA	71/84 (84,5)	43/48 (89,6)	1,0 (referência)	
Controles	127/136 (93,4)	157/164 (95,7)	1,0 (referência)	
<i>CYP2D6</i> $*1*3$				
LLA	13/84 (15,5) ^a	5/48 (10,4)	0,6 (0,2-1,9)	0,60
Controles	9/136 (6,6) ^a	7/164 (4,3)	0,63 (0,2-1,7)	0,44
<i>CYP2D6</i> $*3*3$				
LLA	0/84 (0,0)	0/48 (0,0)	—*	—*
Controles	0/136 (0,0)	0/164 (0,0)	—*	—*
<i>CYP2D6</i> $(*4)*1*1$				
LLA	56/84 (66,6)	35/48 (72,9)	1,0 (referência)	
Controles	103/136 (75,7)	130/164 (79,3)	1,0 (referência)	
<i>CYP2D6</i> $*1*4$				
LLA	24/84 (28,6)	12/48 (25,0)	0,8 (0,3-1,8)	0,68
Controles	30/136 (22,1)	31/164 (18,9)	0,8 (0,5-1,4)	0,56

<i>CYP2D6</i> *4/*4				
LLA	4/84 (4,8)	1/48 (2,1)	0,4 (0,04-3,7)	0,65
Controles	3/136 (2,2)	3/164 (1,8)	0,79 (0,16-4,0)	1,00
<i>EPHX1E3</i> *1/*1				
LLA	38/80 (47,5)	16/43 (37,2)	1,0 (referência)	
Controles	21/136 (15,5)	30/164 (18,3)	1,0 (referência)	

continuação

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	Masculino	Feminino		
<i>EPHX1</i> *1/*2				
LLA	41/80 (51,25) ^b	27/43 (62,8) ^b	1,6 (0,7-3,3)	0,26
Controles	114/136 (83,8) ^b	129/164 (78,7) ^b	0,79 (0,4-1,5)	0,54
<i>EPHX1E4</i> *1/*1				
LLA	49/81 (60,5)	29/44 (65,9)	1,0 (referência)	
Controles	98/136 (72,0)	112/164 (68,3)	1,0 (referência)	
<i>EPHX1</i> *1/*3				
LLA	31/81 (38,3) ^c	13/44 (29,55)	0,71 (0,3-1,6)	0,43
Controles	33/136 (24,3) ^c	44/164 (26,8)	1,2 (0,7-2,0)	0,59
<i>EPHX1</i> *3/*3				
LLA	1/81 (1,2)	2/44 (4,55)	3,4 (0,3-38,9)	0,55
Controles	5/136 (3,7)	8/164 (4,9)	1,4 (0,4-4,4)	0,77
<i>MPO</i> *1/*1				
LLA	40/81 (49,4)	31/43 (72,1)	1,0 (referência)	
Controles	54/107 (50,5)	77/139 (55,4)	1,0 (referência)	
<i>MPO</i> *1/*2				
LLA	36/81 (44,4)	10/43 (23,3)	0,36 (0,15-0,8)	0,02
Controles	48/107 (44,8)	54/139 (38,8)	0,79 (0,5-1,3)	0,42
<i>MPO</i> *2/*2				
LLA	5/81 (6,2)	2/43 (4,6)	0,5 (0,09-2,8)	0,69
Controles	5/107 (4,7)	8/139 (5,8)	1,1 (0,35-3,6)	1,00
<i>TS 2R/2R</i>				
LLA	22/81 (27,2)	11/46 (23,9)	1,0 (referência)	
Controles	31/136 (22,8)	22/164 (13,4)	1,0 (referência)	
<i>TS 2R/3R</i>				
LLA	40/81 (49,4)	25/46 (54,4)	1,2 (0,5-3,0)	0,66
Controles	63/136 (46,3)	106/164 (64,6)	2,4 (1,3-4,4)	0,01
<i>TS 3R/3R</i>				

LLA	19/81 (23,4)	10/46 (21,7)	1,0 (0,37-3,0)	1,00
Controles	42/136 (30,9)	36/164 (22,0)	1,2 (0,6-2,4)	0,72

LLA = leucemia linfoblástica aguda; *1/*1, 2R/2R, = homocigotos para o alelo selvagem; *1/*2, *1/*3, 2R/3R = heterocigotos; *2/*2, *3/*3, 3R/3R, = homocigotos para o alelo polimórfico. OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher. ^{a,c} = prevalência do genótipo heterocigoto dos genes *CYP2D6* e *EPHX1* entre pacientes do sexo masculino em relação aos respectivos controles masculinos ($p = 0,039$ e $0,04$; OR = 0,39 e 0,5, respectivamente); ^b = prevalência do genótipo heterocigoto entre os controles masculinos e femininos comparados aos pacientes com LLA ($p < 0,0007$ e $p = 0,01$); Negrito = estatisticamente significativo.

TABELA 4: Distribuição das crianças portadoras de LLA e indivíduos controles, em relação às frequências dos polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *TS*, *EPHX1* e *MPO* de acordo com a etnia

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	Branco	Pardo		
<i>CYP2D6</i> *1/*1				
LLA	97/114 (85,1)	12/12 (100,0)	1,0 (referência)	
Controles	167/178 (93,8)	86/89 (96,6)	1,0 (referência)	
<i>CYP2D6</i> *1/*3				
LLA	17/114 (14,9) ^a	0/12 (0,0)	0,2 (0,01-3,9)	0,37
Controles	11/178 (6,2) ^a	3/89 (3,4)	0,5 (0,14-1,9)	0,40
<i>CYP2D6</i> *3/*3				
LLA	0/114 (0,0)	0/12 (0,0)	—*	—*
Controles	0/178 (0,0)	0/89 (0,0)	—*	—*
<i>CYP2D6</i> *1/*1				
LLA	80/114 (70,2)	8/12 (66,7)	1,0 (referência)	
Controles	133/178 (74,7)	73/89 (82,0)	1,0 (referência)	
<i>CYP2D6</i> *1/*4				
LLA	29/114 (25,4) ^b	4/12 (33,3)	1,4 (0,39-4,9)	0,73
Controles	40/178 (22,5) ^b	15/89 (16,9)	0,68 (0,35-1,32)	0,33
<i>CYP2D6</i> *4/*4				
LLA	5/114 (4,4)	0/12 (0,0)	0,86 (0,04-17,0)	1,00
Controles	5/178 (2,8)	1/89 (1,1)	0,36 (0,04-3,18)	0,67
<i>TS</i> 2R/2R				
LLA	29/110 (26,4)	3/11 (27,3)	1,0 (referência)	
Controles	29/178 (16,3)	18/89 (20,2)	1,0 (referência)	
<i>TS</i> 2R/3R				
LLA	55/110 (50,0)	5/11 (45,4)	0,88 (0,19-3,94)	1,00
Controles	98/178 (55,1)	47/89 (52,8)	0,77 (0,39-1,53)	0,48
<i>TS</i> 3R/3R				
LLA	26/110 (23,6)	3/11 (27,3)	1,1 (0,2-6,0)	1,00

Controles	51/178 (28,6)	24/89 (27,0)	0,76 (0,35-1,62)	0,56
<i>EPHX1E3 *1/*1</i>				
LLA	48/107 (44,9)	5/11 (45,5)	1,0 (referência)	
Controles	26/178 (14,6)	19/89 (21,4)	1,0 (referência)	
<i>EPHX1E3 *1/*2</i>				
LLA	58/107 (54,2)	6/11 (54,5)	0,99 (0,28-3,46)	1,00
Controles	147/178 (82,6)	69/89 (77,5)	0,64 (0,33-1,24)	0,22

continuação

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	Branco	Pardo		
<i>EPHX1E4 *1/*1</i>				
LLA	64/107 (59,8)	10/12 (83,3)	1,0 (referência)	
Controles	122/178 (68,54)	66/89 (74,1)	1,0 (referência)	
<i>EPHX1E4 *1/*3</i>				
LLA	40/107 (37,4)	2/12 (16,7)	0,32 (0,07-1,54)	0,20
Controles	49/178 (27,53)	20/89 (22,5)	0,75 (0,4-1,4)	0,37
<i>EPHX1E4 *3/*3</i>				
LLA	3/107 (2,8)	0/12 (0,0)	0,88 (0,04-18,2)	1,00
Controles	7/178 (3,93)	3/89 (3,4)	0,79 (0,2-3,2)	1,00
<i>MPO *1/*1</i>				
LLA	61/107 (57,0)	7/11 (63,6)	1,0 (referência)	
Controles	77/149 (51,7)	37/70 (52,8)	1,0 (referência)	
<i>MPO *1/*2</i>				
LLA	39/107 (36,5)	4/11 (36,4)	0,89 (0,24-3,3)	1,00
Controles	62/149 (41,6)	31/70 (44,3)	1,0 (0,6-1,86)	1,00
<i>MPO *2/*2</i>				
LLA	7/107 (6,5)	0/11 (0,0)	0,55 (0,03-10,6)	1,00
Controles	10/149 (6,7)	2/70 (2,9)	0,4 (0,09-2,0)	0,34

LLA = leucemia linfoblástica aguda; *1/*1, 2R/2R, = homocigotos para o alelo selvagem; *1/*2, *1/*3, 2R/3R = heterocigotos; *2/*2, *3/*3, 3R/3R, = homocigotos para o alelo polimórfico. OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste do χ^2 . ^{a,b} = frequências aumentadas do genótipo heterocigoto *1/*3 e *1/*4 para o gene *CYP2D6* em pacientes com LLA em relação aos controles ($p = 0,02$ e $0,05$, respectivamente). *OR não calculada devido a número insuficiente.

TABELA 5: Distribuição das crianças portadoras de LLA e indivíduos controles, em relação às freqüências dos polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *TS*, *EPHX1* e *MPO* de acordo com a etnia

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	Branços	Negros		
<i>CYP2D6</i> *1/*1				
LLA	97/114 (85,1)	5/6 (83,3)	1,0 (referência)	
Controles	167/178 (93,8)	31/33 (93,9)	1,0 (referência)	
<i>CYP2D6</i> *1/*3				
LLA	17/114 (14,9)	1/6 (16,7)	1,1 (0,12-10,39)	1,00
Controles	11/178 (6,2)	2/33 (6,1)	0,98 (0,2-4,6)	1,00
<i>CYP2D6</i> *3/*3				
LLA	0/114 (0,0)	0/6 (0,0)	—*	—*
Controles	0/178 (0,0)	0/33 (0,0)	—*	—*
<i>CYP2D6</i> *1/*1				
LLA	80/114 (70,2)	3/6 (50,0)	1,0 (referência)	
Controles	133/178 (74,7)	27/33 (81,8)	1,0 (referência)	
<i>CYP2D6</i> *1/*4				
LLA	29/114 (25,4)	3/6 (50,0)	2,8 (0,5-14,4)	0,35
Controles	40/178 (22,5)	6/33 (18,2)	0,74 (0,28-1,92)	0,65
<i>CYP2D6</i> *4/*4				
LLA	5/114 (4,4)	0/6 (0,0)	2,1 (0,09-45,8)	1,00
Controles	5/178 (2,8)	0/33 (0,0)	0,44 (0,02-8,2)	0,59
<i>TS</i> 2R/2R				
LLA	29/110 (26,4)	1/6 (16,7)	1,0 (referência)	
Controles	29/178 (16,3)	6/33 (18,2)	1,0 (referência)	
<i>TS</i> 2R/3R				
LLA	55/110 (50,0)	5/6 (83,3)	2,6 (0,29-23,6)	0,66
Controles	98/178 (55,1)	24/33 (72,7)	1,2 (0,4-3,2)	0,81
<i>TS</i> 3R/3R				

LLA	26/110 (23,6)	0/6 (0,0)	0,37 (0,01-9,5)	1,00
Controles	51/178 (28,6)	3/33 (9,1)	0,28 (0,07-1,2)	0,15
<i>EPHX1E3 *1/*1</i>				
LLA	48/107 (44,9)	1/5 (20,0)	1,0 (referência)	
Controles	26/178 (14,6)	6/33 (18,2)	1,0 (referência)	
<i>EPHX1E3 *1/*2</i>				
LLA	58/107 (54,2)	4/5 (80,0)	3,3 (0,36-30,6)	0,38
Controles	147/178 (82,6)	27/33 (81,8)	0,8 (0,3-2,1)	0,61

continuação

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	Branços	Negros		
<i>EPHX1E4 *1/*1</i>				
LLA	64/107 (59,8)	4/6 (66,7)	1,0 (referência)	
Controles	122/178 (68,54)	22/33 (66,7)	1,0 (referência)	
<i>EPHX1E4 *1/*3</i>				
LLA	40/107 (37,4)	2/6 (33,3)	0,8 (0,14-4,6)	1,00
Controles	49/178 (27,53)	8/33 (24,2)	0,9 (0,4-2,2)	1,00
<i>EPHX1E4 *3/*3</i>				
LLA	3/107 (2,8)	0/6 (0,0)	2,0 (0,09-46,1)	1,00
Controles	7/178 (3,93)	3/33 (9,1)	2,4 (0,6-9,9)	0,21
<i>MPO *1/*1</i>				
LLA	61/107 (57,0)	3/6 (50,0)	1,0 (referência)	
Controles	77/149 (51,7)	17/27 (63,0)	1,0 (referência)	
<i>MPO *1/*2</i>				
LLA	39/107 (36,5)	3/6 (50,0)	1,6 (0,3-8,1)	0,68
Controles	62/149 (41,6)	9/27 (33,3)	0,66 (0,3-1,6)	0,39
<i>MPO *2/*2</i>				
LLA	7/107 (6,5)	0/6 (0,0)	1,2 (0,05-25,0)	1,00
Controles	10/149 (6,7)	1/27 (3,7)	0,45 (0,05-3,8)	0,68

LLA = leucemia linfoblástica aguda; *1/*1, 2R/2R, = homocigotos para o alelo selvagem; *1/*2, *1/*3, 2R/3R = heterocigotos; *2/*2, *3/*3, 3R/3R, = homocigotos para o alelo polimórfico. OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste do χ^2 . *OR não calculada devido a número insuficiente.

TABELA 6: Distribuição das crianças portadoras de LLA e indivíduos controles, em relação às freqüências dos polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *TS*, *EPHX1* e *MPO* de acordo com a etnia

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	Branços	Não Brancos		
<i>CYP2D6</i> *1/*1				
LLA	97/114 (85,1)	17/18 (94,4)	1,0 (referência)	
Controles	167/178 (93,8)	117/122 (95,9)	1,0 (referência)	
<i>CYP2D6</i> *1/*3				
LLA	17/114 (14,9)	1/18 (5,6)	0,3 (0,04-2,7)	0,46
Controles	11/178 (6,2)	5/122 (4,1)	0,6 (0,2-1,9)	0,60
<i>CYP2D6</i> *3/*3				
LLA	0/114 (0,0)	0/18 (0,0)	—*	—*
Controles	0/178 (0,0)	0/122 (0,0)	—*	—*
<i>CYP2D6</i> *1/*1				
LLA	80/114 (70,2)	11/18 (61,1)	1,0 (referência)	
Controles	133/178 (74,7)	100/122 (82,0)	1,0 (referência)	
<i>CYP2D6</i> *1/*4				
LLA	29/114 (25,4)	7/18 (38,9)	1,7 (0,6-5,0)	0,40
Controles	40/178 (22,5)	21/122 (17,2)	0,7 (0,4-1,3)	0,25
<i>CYP2D6</i> *4/*4				
LLA	5/114 (4,4)	0/18 (0,0)	0,6 (0,03-12,3)	1,00
Controles	5/178 (2,8)	1/122 (0,8)	0,3 (0,03-2,3)	0,40
<i>TS</i> 2R/2R				
LLA	29/110 (26,4)	4/17 (23,53)	1,0 (referência)	
Controles	29/178 (16,3)	24/122 (19,7)	1,0 (referência)	
<i>TS</i> 2R/3R				
LLA	55/110 (50,0)	10/17 (58,82)	1,3 (0,4-4,6)	0,77
Controles	98/178 (55,1)	71/122 (58,2)	0,87 (0,5-1,6)	0,75

<i>TS 3R/3R</i>				
LLA	26/110 (23,6)	3/17 (17,65)	0,8 (0,2-4,1)	1,00
Controles	51/178 (28,6)	27/122 (22,1)	0,6 (0,3-1,3)	0,27

continuação

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	Branco	Não Branco		
<i>EPHX1 *1/*1</i>				
LLA	64/107 (59,8)	14/18 (77,8)	1,0 (referência)	
Controles	122/178 (68,54)	88/122 (72,1)	1,0 (referência)	
<i>EPHX1 *1/*3</i>				
LLA	40/107 (37,4)	4/18 (22,2)	0,46 (0,1-1,5)	0,29
Controles	49/178 (27,53)	28/122 (23,0)	0,8 (0,5-1,4)	0,42
<i>EPHX1 *3/*3</i>				
LLA	3/107 (2,8)	0/18 (0,0)	0,6 (0,03-13,0)	1,00
Controles	7/178 (3,93)	6/122 (4,9)	1,2 (0,4-3,7)	0,80
<i>MPO *1/*1</i>				
LLA	61/107 (57,0)	10/17 (58,8)	1,0 (referência)	
Controles	77/149 (51,7)	54/97 (55,7)	1,0 (referência)	
<i>MPO *1/*2</i>				
LLA	39/107 (36,5)	7/17 (41,2)	1,1 (0,4-3,1)	1,00
Controles	62/149 (41,6)	40/97 (41,2)	0,9 (0,5-1,6)	0,79
<i>MPO *2/*2</i>				
LLA	7/107 (6,5)	0/17 (0,0)	0,4 (0,02-7,4)	0,59
Controles	10/149 (6,7)	3/97 (3,1)	0,4 (0,1-1,6)	0,25

LLA = leucemia linfoblástica aguda; *1/*1, 2R/2R, = homocigotos para o alelo selvagem; *1/*2, *1/*3, 2R/3R = heterocigotos; *2/*2, *3/*3, 3R/3R = homocigotos para o alelo polimórfico. OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste do χ^2 . *OR não calculada devido a número insuficiente.

4.4. DISTRIBUIÇÕES DOS GENÓTIPOS *CYP2D6*, *TS*, *EPHX1* e *MPODE* ACORDO COM O GRUPO DE RISCO E SOBREVIDA LIVRE DE EVENTO

As enzimas do biometabolismo estão envolvidas na ativação e detoxificação de agentes quimioterápicos e a presença de polimorfismos nesses genes pode interferir na resposta às drogas (resistência ou toxicidade). Dessa forma decidiu-se dividir as crianças de acordo com o risco de recidiva da doença (alto risco e baixo risco de recidiva) e com a remissão clínica completa e recidiva da doença ou óbitos.

Os diferentes polimorfismos foram estudados no grupo de crianças com LLA, subdividido em alto risco de recidiva e baixo risco de recidiva da doença. Verificou-se pela análise do genótipo *CYP2D6**4/*4 que as crianças do grupo de baixo risco de recidiva (5,4%) apresentaram uma frequência maior deste genótipo homocigoto polimórfico do que o grupo de alto risco de recidiva (2,6%), entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,65$). Os genótipos heterocigotos para ambas as variantes e os genótipos homocigotos selvagens apresentaram frequências similares (TABELA 7).

Na análise do polimorfismo *EPHX1**2 foram observadas frequências similares entre os grupos estudados com relação aos genótipos *1/*1, *1/*2 e *2/*2. A análise referente ao genótipo *EPHX1**1/*1 mostrou que o grupo de LLA com alto risco de recidiva (65,7%) apresentou uma frequência maior deste genótipo em comparação com o grupo de baixo risco (57,7%). Por outro lado, obtiveram-se frequências mais elevadas dos genótipos *1/*3 e *3/*3 no grupo de baixo risco (38,5% e 3,8%, respectivamente) quando comparado com o grupo de alto risco (32,9% e 1,4%) (TABELA 7); no entanto, também não houve significância estatística ($p = 0,56$). Quanto aos polimorfismos *MPO* e *TS* não foram encontradas diferenças significativas nas frequências dos diferentes genótipos quanto ao risco de recidiva da doença.

Na TABELA 8 estão apresentadas as frequências dos genótipos *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO* e *TS* nos grupos de crianças, subdivididos em remissão clínica completa e recidiva da doença + óbitos. Pela análise do genótipo *CYP2D6**1/*1, observaram-se frequências maiores deste genótipo no grupo de recidiva da doença + óbitos, enquanto o genótipo *4/*4 foi encontrado apenas no grupo de remissão clínica completa com uma frequência de 4,6%. Ainda, a somatória das frequências dos genótipos *1/*4 + *4/*4 também foi maior no grupo de remissão clínica completa (32,4%) quando comparado com o grupo de recidiva + óbitos (25,0%). Da mesma forma, o genótipo *EPHX1**3/*3 foi encontrado apenas no grupo de remissão clínica completa com a frequência de 3,0%. No entanto, a obtenção de resultados significativos tornou-se difícil, pois as frequências dos genes *CYP2D6* e *EPHX1* mutados na população são baixas e o tamanho da amostra para recidiva da doença + óbitos é pequeno.

Foi encontrada uma prevalência maior do genótipo *MPO*1/*2* no grupo de recidiva da doença + óbitos em crianças com LLA (50,0%) quando comparado com o grupo de remissão clínica completa (35,0%), entretanto esta diferença não foi significativa ($p = 0,30$), provavelmente devido ao pequeno número de pacientes. Apesar de não terem sido significativas estatisticamente, vale ressaltar a ocorrência de uma possível associação entre estes genótipos polimórficos e uma melhor resposta ao tratamento quimioterápico e a maior sobrevida livre de eventos, uma vez que foram encontradas maiores frequências desses genótipos em crianças do grupo de baixo risco de recidiva e do grupo de remissão clínica completa. Entretanto, um número maior de pacientes deve ser analisado, principalmente do grupo de recidiva da doença + óbitos.

TABELA 7: Distribuição das crianças portadoras de LLA em relação às frequências dos polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *TS*, *EPHX1* e *MPO* de acordo com o grupo de risco de recidiva

LOCUS	GENÓTIPO	NÚMERO (%)		OR (95% IC)	P
		Alto Risco de Recidiva	Baixo Risco de Recidiva		
<i>CYP2D6</i> (delA) <i>MspI</i>	*1/*1	66/76 (86,8)	48/56 (85,7)	1,0 (referência)	
	*1/*3	10/76 (13,2)	8/56 (14,3)	1,1 (0,40-2,99)	1,00
	*3/*3	0/76 (0,0)	0/56 (0,0)	—*	—*
<i>CYP2D6</i> (G1934A) <i>BstM</i>	*1/*1	52/76 (68,4)	39/56 (69,6)	1,0 (referência)	
	*1/*4	22/76 (29,0)	14/56 (25,0)	0,85 (0,39-1,87)	0,84
	*4/*4	2/76 (2,6)	3/56 (5,4)	2,0 (0,32-12,56)	0,65
<i>TS</i> repetição tripla	2R/2R	19/74 (25,7)	14/53 (26,4)	1,0 (referência)	
	2R/3R	39/74 (52,7)	26/53 (49,1)	0,90 (0,39-2,12)	0,83
	3R/3R	16/74 (21,6)	13/53 (24,5)	1,10 (0,40-3,02)	1,00
<i>EPHX1</i> (E3) <i>EcoRV</i>	*1/*1	30/73 (41,1)	24/50 (48,0)	1,0 (referência)	
	*1/*2	43/73 (58,9)	25/50 (50,0)	0,73 (0,35-1,51)	0,46
	*2/*2	0/73 (0,0)	1/50 (2,0)	3,73 (0,14-95,87)	0,45
<i>EPHX1</i> (E4) <i>RsaI</i>	*1/*1	48/73 (65,7)	30/52 (57,7)	1,0 (referência)	
	*1/*3	24/73 (32,9)	20/52 (38,5)	1,33 (0,63-2,82)	0,56
	*3/*3	1/73 (1,4)	2/52 (3,8)	3,2 (0,28-36,86)	0,56

<i>MPO</i> (G-463A)	<i>*1/*1</i>	41/73 (56,2)	30/51 (58,8)	1,0 (referência)	
<i>AcI</i>	<i>*1/*2</i>	28/73 (38,4)	18/51 (35,3)	0,88 (0,41-1,87)	0,85
	<i>*2/*2</i>	4/73 (5,5)	3/51 (5,9)	1,02 (0,21-4,92)	1,00

LLA = leucemia linfoblástica aguda; EM = metabolizador rápido; HEM = heterozigoto; PM = metabolizador pobre; wt = alelo selvagem; m = alelo polimórfico; 2R/2R, *1/*1, = homozigotos para o alelo selvagem; 2R/3R, *1/*2, *1/*3, = heterozigotos; 3R/3R, *2/*2, *3/*3, = homozigotos para o alelo polimórfico. OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P= os valores foram calculados pelo teste do x². * OR não calculada devido a número insuficiente.

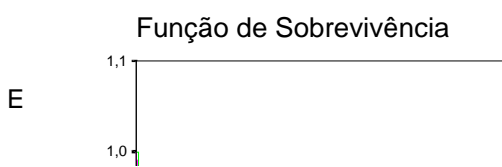
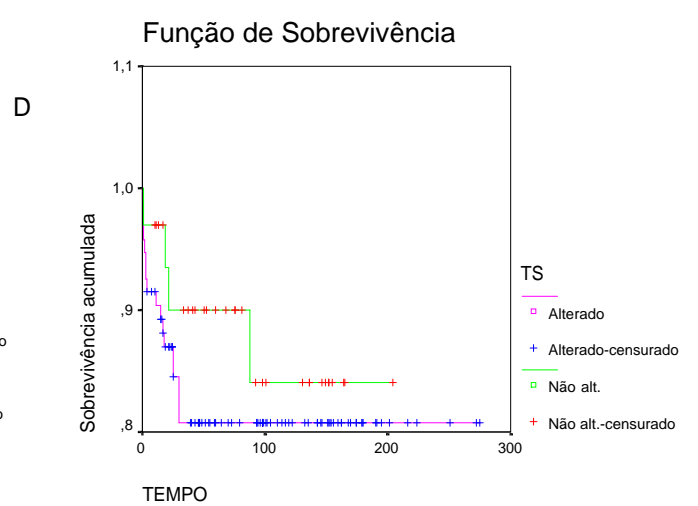
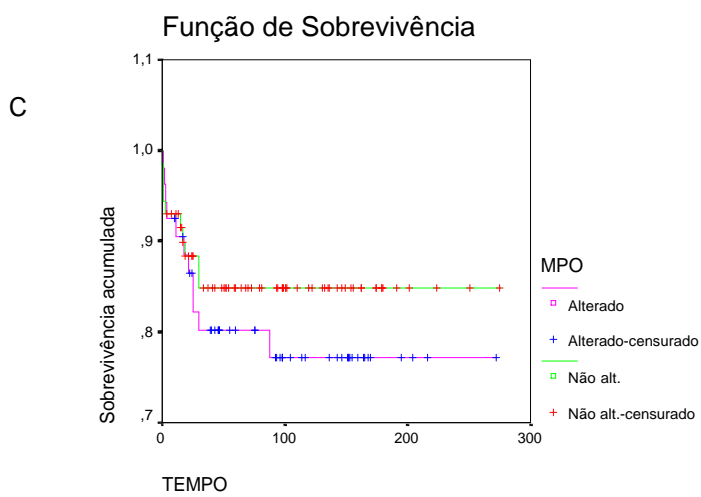
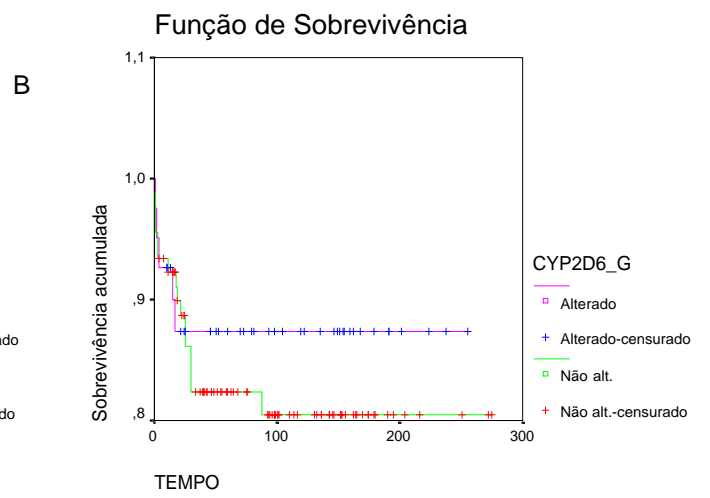
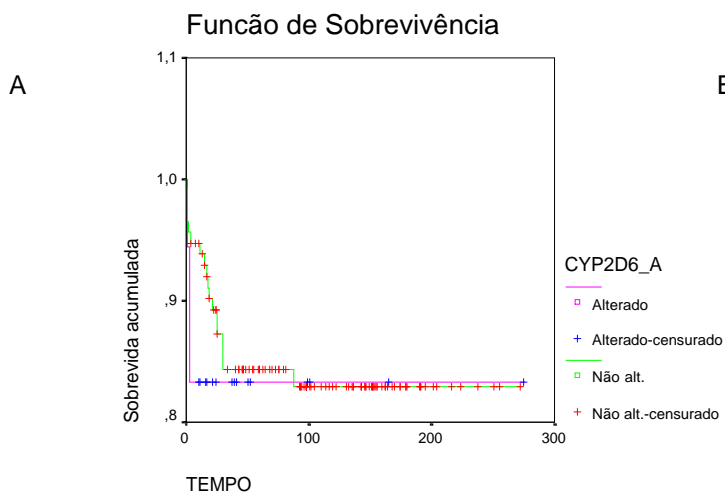
TABELA 8: Distribuição das crianças portadoras de LLA em relação às frequências dos polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *TS*, *EPHX1* e *MPO* de acordo com a remissão clínica completa ou recidiva da doença + óbitos

LOCUS	GENÓTIPO	NÚMERO (%)		OR (95% IC)	P
		Remissão Clínica Completa	Recidiva + Óbitos		
<i>CYP2D6</i> (delA)	<i>*1/*1</i>	94/108 (87,0)	18/20 (90,0)	1,0 (referência)	
<i>MspI</i>	<i>*1/*3</i>	14/108 (13,0)	2/20 (10,0)	0,75 (0,16-3,57)	1,00
	<i>*3/*3</i>	0/108 (0,0)	0/20 (0,0)	—*	—*
<i>CYP2D6</i> (G1934A)	<i>*1/*1</i>	73/108 (67,6)	15/20 (75,0)	1,0 (referência)	
	<i>*1/*4</i>	30/108 (27,8)	5/20 (25,0)	0,81 (0,27-2,43)	0,79
<i>BstM</i>	<i>*4/*4</i>	5/108 (4,6)	0/20 (0,0)	0,43 (0,02-8,21)	0,59
<i>TS</i> 3R	<i>2R/2R</i>	29/103 (28,2)	4/20 (20,0)	1,0 (referência)	
	<i>2R/3R</i>	51/103 (49,5)	10/20 (50,0)	1,42 (0,41-4,94)	0,76
	<i>3R/3R</i>	23/103 (22,3)	6/20 (30,0)	1,89 (0,48-7,51)	0,49
<i>EPHX1</i> (E3)	<i>*1/*1</i>	46/101 (45,5)	8/19 (42,1)	1,0 (referência)	
<i>EcoRV</i>	<i>*1/*2</i>	54/101 (53,5)	11/19 (57,9)	1,17 (0,43-3,16)	0,81
	<i>*2/*2</i>	1/101 (1,0)	0/19 (0,0)	1,82 (0,07-48,65)	1,00
<i>EPHX1</i> (E4)	<i>*1/*1</i>	62/101 (61,4)	13/20 (65,0)	1,0 (referência)	
<i>RsaI</i>	<i>*1/*3</i>	36/101 (35,6)	7/20 (35,0)	0,93 (0,34-2,54)	1,00
	<i>*3/*3</i>	3/101 (3,0)	0/20 (0,0)	0,66 (0,03-13,58)	1,00

<i>MPO</i> (G-463A)	<i>*1/*1</i>	59/100 (59,0)	9/20 (45,0)	1,0 (referência)	
<i>Ac1</i>	<i>*1/*2</i>	35/100 (35,0)	10/20 (50,0)	1,87 (0,69-5,06)	0,30
	<i>*2/*2</i>	6/100 (6,0)	1/20 (5,0)	1,09 (0,12-10,17)	1,00

LLA = leucemia linfoblástica aguda; EM = metabolizador rápido; HEM = heterozigoto; PM = metabolizador pobre; wt = alelo selvagem; m = alelo polimórfico; 2R/2R, *1/*1, = homozigotos para o alelo selvagem; 2R/3R, *1/*2, *1/*3, = heterozigotos; 3R/3R, *2/*2, *3/*3, = homozigotos para o alelo polimórfico. OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P= os valores foram calculados pelo teste do Qui-Quadrado. * OR não calculada devido a número insuficiente.

Assim como em outros estudos também foi utilizada a avaliação das curvas de sobrevida através da presença de um evento, que é caracterizado pela recidiva do paciente durante o tratamento ou então pela ocorrência de óbito. Na FIGURA 9 estão demonstradas as curvas de sobrevida livre de evento (EFS), entretanto não foram observadas associações significativas entre os polimorfismos descritos e a sobrevida do paciente.



4.5. DISTRIBUIÇÕES DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMBINADOS

A fim de elucidar os fatores genéticos associados com suscetibilidade ao desenvolvimento de leucemias agudas em crianças, foi investigado o papel dos polimorfismos genéticos combinados para os genes *CYP2D6*, *TS*, *EPHX1* e *MPO*.

Desse modo, também foi realizada a análise dos genótipos combinados, considerando a ausência de genótipos de risco, ou a presença de um, dois, três ou quatro genótipos de risco. Os genótipos considerados de risco foram: genes *CYP2D6* **1/*3* e **3/*3*, *TS* *2R/3R* e *3R/3R*; *EPHX1* **1/*2*, **1/*3*, **2/*2* e **3/*3* e *MPO* **1/*2* e **2/*2*.

O grupo de referência (OR = 1,0) foi definido como pacientes e controles portadores dos seguintes genótipos: presença dos genes *CYP2D6* **1/*1*, *TS* *2R/2R*; *EPHX1* **1/*1* e *MPO* **1/*1*. Estas diferentes combinações foram comparadas

entre: crianças portadoras de LLA e controles (TABELAS 9 e 10), alto risco de recidiva da doença e baixo risco de recidiva (TABELA 11) e remissão clínica completa e recidiva + óbitos (TABELA 12).

Na TABELA 9 (combinação de cinco polimorfismos) observa-se que a presença de somente um genótipo de risco, ao contrário, diminuiu significativamente o risco de desenvolver LLA na infância ($p = 0,0004$). Quando presentes dois genótipos de risco, em particular, o alelo *2 dos genes *EPHX1* e *MPO* (TABELA 9), observou-se uma redução de 4,0 vezes no risco de LLA ($p = 0,007$).

Por outro lado, o risco de LLA aumentou próximo do nível de significância ($p = 0,053$, TABELA 9) quando presente dois genótipos de risco, em particular, o alelo *4 do gene *CYP2D6* e o alelo *3 do gene *EPHX1*.

Outra observação importante foi o fato de que o alelo *3 do gene *EPHX1* sozinho não teve influência sobre o risco de LLA na infância (TABELA 1), entretanto, quando em associação com o alelo *2 do mesmo gene, tendo como referência os respectivos genótipos selvagens, conferiu uma redução no risco de desenvolvimento de LLA de 2,7 vezes (95% IC = 1,4-5,2; $p = 0,003$) (TABELA 10).

Não encontramos associações significativas entre os demais genótipos combinados avaliados e os outros parâmetros analisados (grupo de risco de recidiva da doença e remissão clínica completa ou recidiva + óbitos), pelo teste do χ^2 .

TABELA 9: Associação entre os genótipos *CYP2D6**3, *CYP2D6**4, *EPHX1**2, *EPHX1**3 e *MPO* combinados e o risco de LLA em crianças.

	GENÓTIPO					LLA	Controles	OR (95%IC)	P
	<i>CYP2D6</i> *3	<i>CYP2D6</i> *4	<i>EPHX1</i> *2	<i>EPHX1</i> *3	<i>MPO</i>	n=123	n=300		
Nenhum genótipo De risco	1/* 1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	12(9,8)	14 (4,7)	1,0 (referência)	
Um genótipo de risco	*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0 (0,0)	1 (0,3)	2,6 (0,1-69,4)	1,00
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*1	5 (4,0)	5 (1,7)	0,86 (0,2-3,7)	1,00
	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*1	9 (7,3)	68 (22,7)	6,5 (2,2-18,3)	0,0004 ^a
	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*1	3 (2,4)	5 (1,7)	1,4 (0,3-7,3)	1,00
	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	8 (6,5)	11 (3,7)	1,2 (0,4-3,9)	1,00
Dois genótipos de risco	*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0 (0,0)	0	—*	—*
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*1	4 (3,2)	1 (0,3)	0,2 (0,02-2,2)	0,33
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*1	1 (0,8)	1 (0,3)	0,9 (0,05-15,2)	1,00
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	0 (0,0)	1 (0,3)	2,6 (0,1-69,4)	1,00
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*1	5 (4,0)	18 (6,0)	3,1 (0,9-10,8)	0,13
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*1	7 (5,7)	1 (0,3)	0,1 (0,01-1,1)	0,053
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	6 (4,9)	7 (2,3)	1,0 (0,3-3,8)	1,00
	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	9 (7,3)	17 (5,7)	1,6 (0,5-4,9)	0,57
	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	10(8,1)	49 (16,3)	4,2 (1,5-11,7)	0,007 ^a
	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	5 (4,0)	6 (2,0)	1,0 (0,25-4,2)	1,00
Três genótipos de risco	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*1	1 (0,8)	1 (0,3)	0,9 (0,05-15,2)	1,00
	*1/*1;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*1	1 (0,8)	0 (0,0)	0,3 (0,01-7,7)	0,48
	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	0 (0,0)	0 (0,0)	—*	—*
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	2 (1,6)	0 (0,0)	0,2 (0,01-3,9)	0,48
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	4 (3,2)	4 (1,3)	0,86 (0,2-4,2)	1,00
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	0 (0,0)	0 (0,0)	—*	—*
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	4 (3,2)	7 (2,3)	1,5 (0,35-6,4)	0,72
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	1 (0,8)	3 (1,0)	2,6 (0,2-28,1)	0,61
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	2 (1,6)	4 (1,3)	1,7 (0,3-11,1)	0,67
	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	8 (6,5)	16 (5,3)	1,7 (0,5-5,4)	0,40

Quatro genótipos de risco	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	1 (0,8)	1 (0,3)	0,9 (0,05-15,2)	1,00
	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	1 (0,8)	0 (0,0)	0,3 (0,01-7,7)	0,48
	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	0 (0,0)	0 (0,0)	— ^a	— ^a
	*1/*3;*3/*3 *1/*1	*1/*1 *1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2 *1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3 *1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2 *1/*2;*2/*2	1 (0,8) 0 (0,0)	0 (0,0) 12 (4,0)	0,3 (0,01-7,7) 21,5 (1,1-402,4)	0,48 0,006 ^a
Cinco genótipos de risco	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	0 (0,0)	1 (0,3)	2,6 (0,1-69,4)	1,00

LLA = leucemia linfoblástica aguda; *1/*1 = homocigotos para o alelo selvagem; *1/*2; *1/*3, *1/*4 = heterocigotos; *2/*2, *3/*3, *4/*4 = homocigotos para o alelo polimórfico. OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; *OR não calculada devido a número insuficiente.

^a = estatisticamente significativo.

TABELA 10: Associação entre os genótipos *EPHX1 E3* e *EPHX1 E4* combinados e o risco de LLA em crianças

GENÓTIPO		LLA	Controles	OR (95%IC)	P
<i>EPHX1*2</i>	<i>EPHX1*3</i>	N = 120	n = 300		
*1/*1	*1/*1	34 (28,3)	34 (11,3)	1,0 (referência)	
*1/*2; *2/*2	*1/*3; *3/*3	27 (22,5)	73 (24,3)	2,7 (1,4-5,2)	0,003

*1/*1 = homocigotos para o alelo selvagem; *1/*2 e *1/*3 = heterocigotos; *2/*2 e *3/*3 = homocigotos para o alelo mutante; P = os valores foram calculados pelo teste do χ^2 ; OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança. Negrito = estatisticamente significativo.

TABELA 11: Associação entre os genótipos *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4*, *EPHX1*2*, *EPHX1*3* e *MPO* combinados e os grupos de risco de recidiva em crianças portadoras de LLA

	GENÓTIPO					AR	RB	OR (95%IC)	P
	<i>CYP2D6*3</i>	<i>CYP2D6*4</i>	<i>EPHX1*2</i>	<i>EPHX1*3</i>	<i>MPO</i>	n = 70	n = 50		
Nenhum genótipo de risco	¹ / ₁	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	7	5	1,0 (referência)	

Um genótipo de risco	*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0	0	—*	
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*1	2	4	2,8(0,36-21,7)	0,61
	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*1	8	3	0,52(0,09-3,03)	0,66
	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*1	0	3	9,54(0,40-225)	0,20
Dois genótipos de risco	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	7	3	0,60(0,10-3,5)	0,67
	*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0	0	—*	
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*1	4	1	0,35(0,02-4,1)	0,60
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*1	1	1	1,4(0,06-28,1)	1,0
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	0	0	—*	-
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*1	4	1	0,35(0,02-4,1)	0,60
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*1	4	3	1,05(0,15-6,9)	1,0
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	3	3	1,4(0,19-10,0)	1,0
	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	5	4	1,12(0,19-6,4)	1,0
*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	5	5	1,4(0,25-7,5)	1,0	
*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	4	1	0,35(0,02-4,1)	0,60	
Três genótipos de risco	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*1	1	0	0,45(0,01-13,4)	1,0
	*1/*1;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*1	0	1	4,09(0,13-120)	0,46
	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	0	0	—*	-
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	1	1	1,4(0,06-28,1)	1,0
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	3	1	0,46(0,03-5,9)	1,0
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	0	0	—*	-
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	3	1	0,46(0,03-5,9)	1,0
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	1	1	1,4(0,06-28,1)	1,0
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	2	0	0,27(0,01-6,3)	0,50
*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	4	5	1,75(0,30-10,0)	0,66	

continuação

TABELA 11: Associação entre os genótipos *CYP2D6**3, *CYP2D6**4, *EPHX1**3, *EPHX1**4 e *MPO* combinados e os grupos de risco de recidiva em crianças portadoras de LLA

	GENÓTIPO					AR	RB	OR (95%IC)	P
	<i>CYP2D6</i> *3	<i>CYP2D6</i> *4	<i>EPHX1</i> *2	<i>EPHX1</i> *3	<i>MPO</i>	n =70	n =50		
Quatro genótipos de risco	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	0	1	4,09(0,13-120)	0,46
	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	0	1	4,09(0,13-120)	0,46
	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	0	0	—*	-
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	0	1	4,09(0,13-120)	0,46
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	1	0	0,45(0,01-13,4)	1,0
Cinco genótipos de risco	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	0	0	—*	

LLA = leucemia linfoblástica aguda; *1/*1 = homocigotos para o alelo selvagem; *1/*2; *1/*3; *1/*4 = heterocigotos; *2/*2; *3/*3; *4/*4 = homocigotos para o alelo polimórfico. OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P = os valores foram calculados pelo teste do χ^2 ; *OR não calculada devido a número insuficiente.

^a = estatisticamente significativo.

TABELA 12: Associação entre os genótipos *CYP2D6**3, *CYP2D6**4, *EPHX1**3, *EPHX1**4 e *MPO* combinados e a remissão clínica completa ou recidiva + óbitos em crianças com LLA

	GENÓTIPO					RCC	Recidiva	OR (95%IC)	P
	<i>CYP2D6*3</i>	<i>CYP2D6*4</i>	<i>EPHX1*2</i>	<i>EPHX1*3</i>	<i>MPO</i>	n = 102	+óbitos n = 21		
Nenhum genótipo de risco	1/* 1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	10	2	1,0 (referência)	
Um genótipo de risco	*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0	0	—*	
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*1	5	1	1,0(0,07-13,8)	1,0
	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*	*1/*1	*1/*1	10	1	0,5(0,03-6,4)	1,0
	*1/*1	*1/*1	2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	3	0	0,6(0,02-15,7)	1,0
	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	7	3	2,1(0,28-16,3)	0,62
Dois genótipos de risco	*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*1	0	0	—*	
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*2;*2/*	*1/*1	*1/*1	4	1	0,35(0,02-4,1)	0,60
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	2	0	0,27(0,01-6,3)	1,0
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	0	0	—*	-
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*1	4	1	0,35(0,02-4,1)	0,60
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*	*1/*3;*3/*3	*1/*1	7	0	0,28(0,01-6,7)	0,50
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	6	3	2,5(0,31-19,53)	0,61
	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*1	6	2	1,67(0,18-15,1)	1,0
	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	8	2	1,25(0,14-10,9)	1,0
	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	4	1	0,35(0,02-4,1)	0,60
		2							
		*1/*2;*2/*							
		2							
		*1/*1							

continuação

TABELA 12: Associação entre os genótipos *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4*, *EPHX1*3*, *EPHX1*4*e *MPO* combinados e a remissão clínica completa ou recidiva + óbitos em crianças com LLA

	GENÓTIPO					RCC	Recidiva	OR (95%IC)	P
	<i>CYP2D6*3</i>	<i>CYP2D6*4</i>	<i>EPHX1*2</i>	<i>EPHX1*3</i>	<i>MPO</i>	n = 102	+óbitos n = 21		
Três genótipos de risco	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*1	1	0	0,45(0,01-13,4)	1,0
	*1/*1;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*1	1	1	1,4(0,06-28,1)	1,0
	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	0	1	4,09(0,13-120)	0,46
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	1	1	1,4(0,06-28,1)	1,0
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	3	1	0,46(0,03-5,9)	1,0
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	0	0	—*	-
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	3	1	0,46(0,03-5,9)	1,0
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	1	1	1,4(0,06-28,1)	1,0
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	1	1	1,4(0,06-28,1)	1,0
	*1/*1	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	8	1	0,62(0,04-8,2)	1,0
Quatro genótipos de risco	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*1	1	0	0,45(0,01-13,4)	1,0
	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*1	*1/*2;*2/*2	1	0	0,45(0,01-13,4)	1,0
	*1/*3;*3/*3	*1/*4;*4/*4	*1/*1	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	0	0	—*	
	*1/*3;*3/*3	*1/*1	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	1	0	0,45(0,01-13,4)	1,0
	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	1	0	0,45(0,01-13,4)	1,0
Cinco genótipos de risco	*1/*1	*1/*4;*4/*4	*1/*2;*2/*2	*1/*3;*3/*3	*1/*2;*2/*2	0	0	—*	

LLA = leucemia linfoblástica aguda; *1/*1 = homocigotos para o alelo selvagem; *1/*2; *1/*3; *1/*4 = heterocigotos; *2/*2; *3/*3; *4/*4 = homocigotos para o alelo polimórfico. OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança; P= os valores foram calculados pelo teste do χ^2 ; *OR não calculada devido a número insuficiente.

^a = estatisticamente significativo.

5. DISCUSSÃO

5.1 POLIMORFISMOS DE ENZIMAS METABOLIZADORAS DE XENOBIÓTICOS E A SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA

A exposição dos indivíduos a uma variedade de compostos do meio ambiente pode resultar em sérias conseqüências toxicológicas. Numerosos compostos químicos não produzem seus efeitos biológicos por si só, mas requerem ativação metabólica antes de interagirem com macromoléculas celulares (Gonzalez;

Gelboin, 1993). Vários carcinógenos químicos conhecidos, tais como os presentes na alimentação, nas bebidas alcoólicas, na fumaça do cigarro e nos poluentes ambientais, são biotransformados no organismo a compostos que são mais tóxicos que o composto original ou são convertidos em metabólitos não tóxicos, que podem ser excretados (Brockmoller *et al.*, 2000). Essa conversão a metabólitos eletrofílicos não tóxicos é realizada por enzimas oxidativas (fase I), que são principalmente as enzimas do citocromo P450 (CYP), além das enzimas Epóxido Hidrolase (EPHX1) e Mieloperoxidase (MPO).

As enzimas da fase II, denominadas enzimas de conjugação, tais como as glutathione S-transferases (GST) e N-acetiltransferases (NAT), freqüentemente atuam como enzimas de detoxificação. Estes caminhos metabólicos podem ser um importante fator determinante para iniciar os danos ao DNA induzidos por carcinógenos como, por exemplo, a ligação de carcinógenos ao DNA (formação de adutos), aberrações cromossômicas e, conseqüentemente, aumentar o risco de desenvolvimento do câncer. Os níveis de aductos do DNA formados em diferentes espécies, tecidos e indivíduos, freqüentemente dependem da eficiência das enzimas que metabolizam agentes carcinógenos para suas formas ativas. Presume-se, que para doses iguais de carcinógenos, uma pessoa com capacidade diminuída para detoxificação, pode ter um risco maior de desenvolvimento de câncer do que uma pessoa que detoxifica eficientemente o carcinógeno. Sugere-se que a base bioquímica para essa variação dependa do polimorfismo das enzimas envolvidas nos processos de bioativação e detoxificação (Autrup, 2000).

De acordo com os relatos da literatura, muitos desses polimorfismos estão envolvidos com a suscetibilidade diferencial ao risco de câncer evidenciando a importância de estudos envolvendo tais genes no prognóstico e prevenção desta doença.

O câncer é a segunda causa de morte no sudeste do Brasil (Duncan *et al.*, 1992). Doenças relacionadas com o meio ambiente resultantes da exposição a solventes e agentes químicos, tais como hexaclorobenzeno, percloroetileno e benzopireno, têm sido descritas e constituem um sério problema de saúde no estado de São Paulo (Lorand *et al.*, 1984; Shields, 1993; Ruiz *et al.*, 1994; Queiroz *et al.*, 1997).

Estudos epidemiológicos têm mostrado um risco elevado do desenvolvimento de leucemias em crianças, associado com a exposição ambiental a pesticidas (Daniels *et al.*, 1997; Zahm; Ward, 1998), com o uso materno de drogas, tais como o cigarro e bebidas alcoólicas, e com exposição parental a pesticidas (Severson *et al.*, 1993; Buckley *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1994; Shu *et al.*, 1996; Infante-Rivard *et al.*, 1999). Estes dados suportam uma possível influência genética e ambiental sobre o risco de LLA em crianças. Recentemente, foi demonstrado que certas variantes dos genes de metabolismo de carcinógenos foram associadas significativamente com risco aumentado de LLA em crianças (Canalle *et al.*, 2004). Esses resultados também sugerem que fatores genéticos, especialmente no contexto de exposição ambiental, podem desempenhar papel importante na leucemogênese.

Com base nestes dados, decidiu-se verificar se os genes *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO* (associados ao metabolismo) e *TS* (associado à proliferação celular) desempenham papel similar na leucemogênese em crianças. Para isso, foi

determinada a frequência do polimorfismo destes genes em uma amostra de 132 crianças portadoras de LLA e em 300 pacientes controles, portadores de doenças não-hematológicas, não-oncológicas e não-hereditárias da região nordeste do estado de São Paulo.

Inicialmente, é importante ressaltar que nos controles, as frequências dos polimorfismos testados, estiveram de acordo com aquelas obtidas com o estudo de outras populações euro - descendentes e afro - descendentes (Krajinovic *et al.*, 1999; Lemos *et al.*, 1999; Garte *et al.*, 2001; Krajinovic *et al.*, 2002b; Rossit *et al.*, 2002; Sirma *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2005; Joseph *et al.*, 2005). No presente estudo, a análise multivariada considerando etnia e sexo como co-variáveis, não modificou as conclusões para todas as variantes testadas.

A enzima CYP2D6 já foi muito bem descrita como uma enzima polimórfica e que desempenha um papel fundamental no metabolismo de pelo menos cinquenta drogas, dentre elas compostos pró- mutagênicos, pró- carcinógenos e também diversos fármacos. Apresenta elevados níveis de expressão no fígado, mas também é expressa em células sanguíneas, onde está envolvida diretamente na ativação de pro - carcinógenos e na detoxificação de compostos carcinogênicos. O gene *CYP2D6* é caracterizado por apresentar diversas variantes, sendo assim a enzima é expressa em níveis diferentes, o que torna sua ação altamente variável (Nagai *et al.*, 2002).

No presente trabalho foram analisadas duas variantes do gene *CYP2D6* variante *3, caracterizada pela deleção de uma base no éxon 5 e a variante *4, que apresenta uma transição G>A na junção intron 3/éxon 4. Os principais fenótipos

relacionados à ação da enzima estão divididos em dois grupos largamente encontrados na população: os metabolizadores extensivos (EM) e os metabolizadores pobres (PM), que podem estar associados tanto à variante *3 como a variante *4.

O genótipo mutante que caracteriza os metabolizadores pobres foi observado em cerca de 3% da população brasileira estudada, percentual inferior ao descritos para as populações de caucasianos europeus e norte americanos, que pode variar de 5 a 10%. Em relação à população de afro-americanos, o genótipo PM foi descrito com frequência de 0 a 2% (Gaedigk *et al.*, 2002). Essa diferença em relação às demais populações pode ser explicada pelo fato de que essas populações são altamente homogêneas, enquanto que a população brasileira apresenta uma enorme heterogeneidade, causada especialmente pelo alto nível de miscigenação étnica (Endrizzi *et al.*, 2002; Okay *et al.*, 2005).

Dados interessantes foram apresentados por Lemos *et al.* (1999), que destacaram uma elevada frequência de EM no grupo de leucemia em relação ao grupo controle, indicando que o aumento da atividade enzimática estaria associado ao aumento do risco de desenvolvimento da doença. Esse processo foi explicado embasado no fato de que o metabolismo na fase I pode formar alguns compostos intermediários mais tóxicos do que o substrato original, fazendo com que o aumento na ativação de pró-carcinógenos por metabolizadores extensivos potencialize o processo de carcinogênese.

Não foram encontrados homozigotos para a variante *CYP2D6**3, o que ressalta achados anteriores que demonstram a baixa frequência desse polimorfismo (< 5%) (Gough *et al.*, 1990). Entretanto, a frequência do genótipo heterozigoto foi

significativamente maior nos pacientes portadores de LLA (13,6%) em relação aos controles (5,3%), destacando a prevalência do alelo polimórfico no grupo de leucemia. Resultados similares também foram encontrados para a variante *CYP2D6*4*, onde a frequência dos homozigotos polimórficos (metabolizadores pobres) foi maior no grupo de pacientes (3,8%) quando comparada aos controles (2,0%) e, embora os resultados não tenham atingido significância estatística, podem sugerir a associação do metabolizador pobre (PM) com o risco de LLA. Ao agrupar os genótipos variantes PM e heterozigotos (HEM), no intuito de verificar a frequência do alelo alterado, foi observada uma frequência significativamente maior dos genótipos alterados no grupo de pacientes ($p= 0,05$), reforçando a hipótese de associação do alelo *CYP2D6*4* com o risco aumentado de leucemia. A possibilidade dessa associação pode ser explicada pela atividade de detoxificação que também é desempenhada pela enzima CYP2D6. Como a enzima em estudo também é responsável por catalisar a detoxificação de agentes carcinogênicos, uma vez alterada, resultará em um déficit da atividade enzimática nesses indivíduos, que tornar-se-ão mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença (Roddam *et al.*, 2003; Gajecka *et al.*, 2005).

A discrepância entre os resultados descritos na literatura pode ser explicada pela alta taxa de variabilidade étnica entre os indivíduos analisados, bem como pelas diferenças geográficas relacionadas à exposição ambiental de cada população (Lemos, *et al.*, 1999). Outro fator relevante é a grande diversidade de drogas que atuam como substrato da enzima CYP2D6, podendo alterar a função

enzimática por ela exercida (ativação de pró-carcinógenos ou detoxificação) de acordo com o substrato a ser metabolizado (Ingelman-Sundberg, 2005).

Outro gene associado ao processo de metabolismo que foi analisado nesse estudo foi o gene *EPHX1*, que codifica a enzima microsomal epóxido hidrolase. Essa é uma importante enzima de biotransformação de fase I que está expressa em diversos tecidos, onde catalisa a hidrólise de vários epóxidos e intermediários epóxidos reativos em dihidrodiois, que são compostos mais solúveis na água e menos reativos, sendo posteriormente excretados do organismo. Dessa forma, fica caracterizada a função de detoxificação da epóxido hidrolase, conferindo assim um efeito protetor contra compostos químicos e poluentes ambientais (Vodicka *et al.*, 2001).

Trabalhos anteriores já descreveram a relação de intermediários epóxido reativos no processo de iniciação e progressão de anormalidades teciduais no desenvolvimento de enfisema, onde indivíduos com atividade enzimática muito baixa são mais propensos a desenvolver a doença (Smith e Harrison, 1997). A deficiência enzimática também foi associada a outros tipos de cânceres como carcinoma hepatocelular (Mac Glynn *et al.*, 1995) e câncer ovariano (Lancaster, 1996).

Nesse trabalho, a análise do gene *EPHX1* foi realizada para o polimorfismo no éxon 3 (Tyr113His), que confere atividade lenta, e para o éxon 4 (His139Arg), que confere atividade rápida. Na análise do alelo rápido (*mEH*H139R), a frequência do genótipo homocigoto polimórfico encontrado no grupo controle (2%) está em concordância com a frequência encontrada em outras populações (Smith, Harrison, 1997; Huang *et al.*, 2005). Na análise comparativa entre o grupo controle e

o grupo de pacientes, não foi verificada nenhuma diferença significativa, o que indica que não há associação entre o polimorfismo do alelo rápido (que confere alta atividade enzimática) e o risco de desenvolvimento de LLA ($p= 0,13$), concordando com os resultados apresentados por Tranah *et al.* (2004).

Por outro lado, a análise do polimorfismo para o E3 (*mEHY113H*), que caracteriza redução da atividade enzimática, demonstrou um aumento significativo do alelo alterado nos controles quando comparado aos pacientes, sugerindo que a atividade enzimática reduzida da epóxido hidrolase pode atuar como fator de proteção no processo de desenvolvimento da leucemia. Para determinar o fenótipo de cada indivíduo analisado, foram feitas combinações entre os genótipos relacionados a cada um dos polimorfismos. A associação entre as variantes (lenta e rápida), resultou em quatro fenótipos que caracterizam a atividade enzimática da epóxido hidrolase em rápida, normal, lenta e muito lenta (Smith; Harrison, 1997). A presença do fenótipo lento foi novamente mais expressiva nos indivíduos controles ($p= 0,001$) quando comparados aos pacientes portadores de LLA, dados que reafirmam a hipótese de que a alta atividade enzimática da epóxido hidrolase pode estar associada com o risco de desenvolvimento da leucemia linfóide aguda.

Embora esses resultados estejam em discrepância com os demais trabalhos citados anteriormente, estudos realizados em outros tipos de tumores, como adenocarcinoma de esôfago (Casson *et al.*, 2003), câncer pulmonar (Gsur *et al.*, 2003), carcinoma de laringe (To-Figueiras *et al.*, 2002) e orofaringe (Amador *et al.*, 2002), e leucemia mieloide em adultos (Lebailly, *et al.*, 2002), também destacaram a

associação da alta atividade enzimática com o risco aumentado de desenvolvimento do câncer.

Essa hipótese pode ser explicada pelo fato de que, embora a enzima epóxido hidrolase possa exercer função de detoxificação, ela também desempenha atividade de ativação de compostos carcinogênicos, a qual pode ser potencializada pela presença de polimorfismos (que tornam sua atividade elevada) e aumentar consideravelmente o risco de desenvolvimento de cânceres (Zhou *et al.*, 2001).

Em relação ao parâmetro sexo, tanto para crianças portadoras de leucemia como para os controles, já era esperado não encontrar diferenças entre os polimorfismos do gene *EPHX1* estudados, visto que os demais estudos descritos na literatura também não encontraram tais diferenças (Zhou *et al.*, 2001; Tranah *et al.*, 2004; Vodcka *et al.*, 2004; van der logt *et al.*, 2005).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima expressa em células mielóides imaturas e que apresenta a regulação da expressão gênica durante a maturação granulocítica. Um dos primeiros estudos a descrever a substituição de uma base G para A foi realizado em leucemia mielóide aguda que, embora apresentasse uma maior expressão da enzima MPO nos pacientes leucêmicos, não representou diferenças significativas. Um dado interessante desse trabalho é o fato de que algumas amostras de sangue de pacientes em remissão foram analisadas e não mais apresentavam a substituição, fato que levantou a hipótese dessa alteração ser uma mutação e não um polimorfismo (Austin *et al.*, 1993).

No entanto, trabalhos subseqüentes elucidaram a ação da mieloperoxidase e também a caracterização do polimorfismo. A MPO é uma enzima

metabólica de fase I encontrada em monócitos, macrófagos e grânulos primários de neutrófilos e está relacionada com reações de conversão de pró - carcinógenos a metabólitos reativos. A exposição a poluentes ambientais, ocupacionais e principalmente ao tabaco, podem levar ao recrutamento da MPO. Sua ativação gera a biotransformação de metabólitos carcinogênicos específicos, como aminas aromáticas, e catalisa a formação endógena de radicais livres carcinogênicos (London *et al.*, 1997).

O polimorfismo do gene *MPO*, caracterizado pela presença de uma substituição G>A na região *upstream* do gene, aparentemente destrói o sítio de ligação para o fator de transcrição SP1. Dessa forma, indivíduos que possuem no seu genótipo pelo menos uma cópia do alelo variante, apresentam um baixo nível de expressão de mieloperoxidase, o que acarreta um decréscimo no processo de conversão de metabólitos carcinogênicos, conseqüentemente, conferindo um efeito protetor (Schabath *et al.*, 2000; Cascorbi *et al.*, 2000).

O aumento do risco de doenças relacionadas ao genótipo homocigoto selvagem (G/G) já foi descrito em diversas doenças como, por exemplo, leucemias (leucemia mielóide aguda), câncer de pulmão (Lê Marchand *et al.*, 2000; Schabath *et al.*, 2000; Kantarci *et al.*, 2002 e Lu W *et al.*, 2002), câncer esofágico (Matsuo *et al.*, 2001) e ainda hepatoblastoma (Pakakasama *et al.*, 2003). Na análise do gene *MPO* (amostra representada por 124 pacientes e 300 indivíduos controles), foi encontrada uma freqüência do alelo G de 72,0% na população controle, resultado similar ao encontrados em populações caucasianas americanas (76,6%) e afro-americanas (70,1%) (Cascorbi, *et al.*, 2000). Neste trabalho, não foi verificado nenhuma diferença

significativa entre o grupo de pacientes com LLA e o grupo de controles quanto à presença do polimorfismo do gene *MPO*. Outros estudos também apresentaram resultados concordantes com os nossos achados. Matsuo *et al.*, (2001) avaliou a relação do polimorfismo da mieloperoxidase em amostras de linfoma sem, no entanto, encontrar associação com o risco de desenvolvimento da doença. Krajinovic *et al.*, (2002a) analisando 174 pacientes de LLA e 337 controles, não observou diferenças significativas entre os grupos que associassem o risco de leucemia com o polimorfismo da mieloperoxidase.

Em análise multivariada para sexo e etnia, não foi encontrada nenhuma diferença significativa em relação à etnia e o polimorfismo do gene *MPO*. Para a análise em relação ao sexo, foi encontrado um aumento significativo na frequência do genótipo homocigoto selvagem (G/G) entre o sexo feminino quando comparado ao sexo masculino, no grupo de pacientes com LLA ($p=0,02$). Na análise do genótipo G/G em relação aos genótipos variantes G/A e A/A agrupados, entre pacientes e controles do sexo feminino, foi verificado uma frequência superior de homocigotos mutantes (17%) no grupo de pacientes com LLA com relação aos controles (7%). Embora esse resultado não tenha atingido o limite de significância estabelecido ($p=0,05$), o resultado ficou muito próximo ($p=0,07$), o que pode sugerir uma tendência do risco de leucemia estar associado ao genótipo homocigoto selvagem no sexo feminino. No entanto, dados da literatura ainda são inconsistentes, e apresentam grandes variações relacionadas ao polimorfismo da mieloperoxidase, sexo e o risco de desenvolvimento de doenças (Olson *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004).

A diferença encontrada entre os dados desse trabalho e os descritos pela literatura, podem ser explicados pelo número amostral reduzido, o que sugere que a realização de estudos subseqüentes, com um número de casos e controles ainda maior, é de fundamental importância para a elucidação da associação desse polimorfismo com o risco do desenvolvimento da leucemia linfóide aguda.

O gene da timidilato sintase (*TS*), localizado no cromossomo 18, desempenha um papel fundamental na manutenção do balanço de suprimentos de deoxinucleotídeos requeridos para a síntese de DNA. A região promotora do gene *TS* possui uma seqüência regulatória repetida em tandem (TR-28 pb) que é polimórfica em humanos, podendo aparecer como dupla repetição (2R) ou como tripla repetição (3R) (Villa Franca *et al.*, 2001; Graziano *et al.*, 2004). No presente trabalho, foi observada uma freqüência do genótipo 2R2R de 26,4% e de 23,6% para o genótipo 3R3R, dados que são similares aos encontrados por Graziano *et al.*, (2004) em populações caucasianas.

A prevalência do polimorfismo *TS* varia nas diversas populações mundiais. A freqüência do alelo 3R pode variar de 49,0% em kenianos, 55,0% em caucasianos americanos e atingir até 82,0% em populações chinesas (Marsh *et al.*, 1999). A distribuição dos genótipos 2R3R e 3R3R comparados ao genótipo 2R2R, mostrou-se significativamente superior no grupo controle (82,3%) em relação aos pacientes (74,8%).

Existem dados que reportam a falta de associação do polimorfismo da timidilato sintase com o risco de câncer, em estudos realizados com câncer de mama (Grieu *et al.*, 2004) e adenomas colo-rectais (Chen *et al.*, 2004). Em contraste, um estudo

realizado com câncer colo-retal em 510 pacientes e 604 indivíduos controles sugere que a presença do genótipo 3R3R esteja associada com o aumento do risco de desenvolvimento da doença. Essa hipótese é sustentada pelo fato de que o gene *TS* é auto regulado no nível da tradução, onde a proteína se liga ao seu RNAm e inibe a tradução. A inibição de TS resulta em depleção do *pool* de dTTP intracelular e elevação de dUMP, conseqüentemente, resultando em danos no DNA. Alternativamente, a alta atividade da enzima timidilato sintase pode levar a um aumento da concentração de dTTP e pode causar, por um mecanismo complexo de *feedback*, a restauração do pool de dNTP e, conseqüentemente, o aumento dos erros de replicação do DNA, podendo elevar o risco de desenvolvimento de câncer (Chen *et al.*, 2003).

Entretanto, o aumento da freqüência do alelo 3R na população controle sugere que a presença de pelo menos uma cópia do alelo 3R pode conferir uma função protetora e, conseqüentemente, diminuir o risco de desenvolvimento de LLA. Essa hipótese pode ser explicada pelo fato de que a expressão gênica da timidilato sintase está diretamente associada ao número de repetições (TR) e, sendo assim, a tripla repetição (3R) pode conferir um aumento na expressão. Esse aumento da expressão pode aumentar a conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP), reduzindo o nível de uridina que seria incorporado ao DNA. Teoricamente, isso diminuiria o dano causado ao DNA em tecidos de proliferação rápida, como aqueles envolvidos na hematopoiese, proporcionando um efeito de proteção no risco de leucemia (Skibola *et al.*, 2002).

A associação da repetição tripla com a susceptibilidade diminuída de desenvolvimento de cânceres também foi descrita para adenomas colorretais (Ulrich *et al.*, 2002) e linfomas malignos. Um estudo com 108 pacientes com linfoma e 494 indivíduos controles mostrou que a presença da repetição dupla (2R) aumentou o risco de desenvolvimento da doença em 1,6 vezes (Hishida *et al.*, 2003). Chen *et al.* (2004) explica a divergência dos resultados através da possível diferença no desequilíbrio de ligação entre as populações e descreve ainda que apesar de conferir um risco elevado de câncer colo-retal, o alelo 3R pode estar associado ao efeito protetor em outros tipos de cânceres. Por outro lado, Cui *et al.* (2005) descreveu a associação do genótipo 2R3R ao risco de carcinoma de esôfago.

No presente estudo, através da análise variada para sexo e etnia no grupo controle, foi observada uma diferença significativa nas frequências dos genótipos 2R2R/2R3R entre os indivíduos do sexo feminino, quando comparados com os do sexo masculino. Entretanto não existem dados consistentes na literatura que descrevem essa associação. Analisando o polimorfismo nos três grupos étnicos (brancos, pardos e negros), foram observadas frequências similares para todos os genótipos, com exceção do grupo de indivíduos negros que demonstrou a ausência do genótipo 3R/3R. Entre os grupos brancos e pardos, não foram observadas diferenças nas frequências alélicas. Relatos da literatura não descrevem com clareza a associação do polimorfismo com grupos étnicos distintos (Shi, 2005).

Finalmente, pela análise do impacto dos genótipos combinados sobre o risco de LLA, observou-se que o risco relativo de LLA diminuiu com o número de genótipos polimórficos que foram considerados. Algumas variantes, quando

analisadas individualmente, não influenciaram significativamente o risco para esta doença. Entretanto, quando presentes 2 genótipos polimórficos, *1/*2; *2/*2 para *EPHX1* e *MPO*, foi observada uma diminuição significativa do risco de desenvolvimento de LLA na infância ($p = 0,007$), indicando que o alelo mutante *2 pode conferir menor susceptibilidade ao desenvolvimento da doença. Esses dados divergem dos encontrados por Krajinovic *et al.*, (2002), que sugerem um efeito combinado entre os genes *MPO* e *NQO1* conferindo um risco aumentado de desenvolvimento de LLA. Esse conflito entre os dados da literatura e os descritos nesse trabalho sugerem a realização de estudos posteriores para a elucidação da participação do gene *MPO* na susceptibilidade de desenvolvimento da LLA.

É importante ressaltar, que o polimorfismo do gene *MPO* quando analisado separadamente não demonstrou nenhuma associação com a susceptibilidade de desenvolvimento da doença, indicando apenas uma tendência e sugerindo, dessa forma um possível efeito combinado entre os genótipos. Isto demonstra que, alterações nos genes que codificam enzimas responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos podem diminuir a eficiência do processo de ativação de pró-carcinógenos, com conseqüente redução do acúmulo de metabólitos tóxicos, ou conversão de compostos químicos em carcinógenos ou agentes causadores de diversos tipos de doenças. Esta observação reafirma o conceito de que a etiologia da LLA em crianças está relacionada com a variabilidade genética em mais de um locus, a qual é consistente com a complexidade do metabolismo de xenobióticos, bem como com a complexidade dos sistemas de reparo, e com a ampla diversidade de compostos químicos contribuindo para a exposição ambiental.

Estes resultados, por sua vez, são suportados pelo recente relato indicando que a sensibilidade mutagênica em linfócitos de certos indivíduos pode ser associada com variantes em genes envolvidos no reparo de DNA e no metabolismo de xenobióticos (Tuimala *et al.*, 2002). Conseqüentemente, um risco individual intrínscico de desenvolvimento de LLA na infância, ou para proteção contra LLA, pode depender do equilíbrio entre a eficiência em metabolizar carcinógenos genotóxicos e a capacidade para reparar os danos no DNA.

5.2. POLIMORFISMOS DE ENZIMAS METABOLIZADORAS DE XENOBIÓTICOS E DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E A RESPOSTA AO TRATAMENTO

A leucemia linfoblástica aguda é a doença maligna que mais acomete crianças. O sucesso na resposta ao tratamento de crianças portadoras de leucemia linfoblástica aguda aumentou de maneira expressiva nas últimas décadas. Os

protocolos de terapias atuais demonstram uma sobrevida livre de evento superior a 80% , índice que há quatro décadas atrás, não passava dos 10%. Um fato interessante no progresso do tratamento da LLA foi a otimização do uso das drogas já existentes ao invés de alterar os protocolos por novas drogas (Innocenti, Ratain, 2002).

A causa primária do insucesso do tratamento é a aquisição de novas mutações somáticas que tornam as células leucêmicas resistentes à quimioterapia. Entretanto, terapias otimizadas podem desempenhar um papel fundamental na resposta ao tratamento. A presença de polimorfismos em genes que codificam enzimas responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos, enzimas de transporte, síntese de DNA entre outras, pode influenciar profundamente a eficácia e a toxicidade da droga, sendo atualmente o principal alvo da farmacogenômica (Pui *et al.*, 2003).

Essencialmente, todos os genes que codificam enzimas que metabolizam drogas, seja elas de fase I ou fase II, apresentam polimorfismos. Todos os polimorfismos farmacogenéticos estudados até o momento diferem em frequência dentre os grupos étnicos, entretanto, o estudo individual desses polimorfismos em contraste com os estudos populacionais se mostra mais eficaz para a farmacogenômica.

No presente estudo foram analisados os genes *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO* e *TSE* e apesar da maioria deles não estarem diretamente associados ao metabolismo de drogas utilizadas no protocolo de tratamento administrado aos pacientes desse trabalho, três deles estão envolvidos no metabolismo de drogas antitumorais e já foram descritas na associação da resposta ao tratamento.

As enzimas do citocromo p450 que são responsáveis pelo metabolismo de uma grande variedade de esteróides endógenos, hormônios e drogas, fazem parte da principal família de enzimas responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos. Estas enzimas estão envolvidas na ativação e inativação de drogas, inclusive as drogas antitumorais (vincristina, por exemplo). Nesse trabalho não foi encontrada nenhuma associação entre as variantes do gene *CYP2D6* e a resposta alterada ao tratamento, entretanto o número de pacientes analisados foi reduzido e uma vez que esse polimorfismo é relativamente raro na população, seria necessária a análise de um número ainda maior de pacientes (Nagasubramanian, *et al.*, 2003).

Outra enzima diretamente associada ao tratamento quimioterápico e um dos principais alvos da farmacogenômica é a timidilato sintase. A droga chave no tratamento da leucemia é o metotrexato, que pela síntese de glutamatos metotrexato, atua como inibidor da timidilato sintase. A TS tem sido apontada como enzima chave no metabolismo de drogas antitumorais como o metotrexato e o 5-fluoracil (5-FU). A TS é uma enzima essencial para a proliferação celular, como já foi descrito anteriormente. Num estudo em uma população de crianças canadenses, pacientes homocigotos para a variante 3R, apresentaram um risco 4,6 vezes maior de ocorrência de evento do que aqueles que apresentavam pelo menos um alelo 2R (2R2R ou 2R3R) (Krajinovic, *et al.*, 2002a; Uchida, *et al.* 2004).

Estudos realizados com pacientes com câncer colo-retal também apontaram que a presença de um ou dois alelos da repetição dupla (2R) no genótipo, beneficia o tratamento a base de 5- fluoracil e conferem resultados melhores do que

os observados em pacientes homocigotos para a repetição tripla (3R3R) (Villafranca *et al.*, 2001).

Os polimorfismos dos genes *EPHX1* e *MPO* não demonstraram nenhuma associação com a remissão clínica ou recidiva da doença. Foi realizada ainda, a análise da sobrevida livre de eventos, no entanto, essa também não demonstrou relação com os polimorfismos estudados, atentando para a necessidade de estudos com um maior número de casos.

A possibilidade de estratificação genotípica de pacientes pode identificar subgrupos com um melhor perfil diagnóstico. A presença de alelos associados à resposta reduzida a determinadas drogas pode direcionar a seleção de terapias alternativas. A disponibilidade de técnicas genéticas e confiáveis e de grande potencial pode mudar o modo como os pacientes receberão o tratamento quimioterápico num futuro muito próximo (Ross *et al.*, 2004).

Embora nossos resultados não tenham apresentado diferença estatisticamente significativa na associação das alterações estudadas e o possível efeito dessas na resposta ao tratamento, acreditamos que estudos com um número maior de casos seria fundamental na elucidação da atuação desses polimorfismos na metabolização de drogas quimioterapêuticas e conseqüentemente na otimização dos protocolos quimioterápicos atualmente administrados.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizada a investigação de polimorfismos em genes associados ao metabolismo e sua relação com a susceptibilidade ao desenvolvimento de LLA na infância. Também foi avaliado o envolvimento desses polimorfismos na resposta ao tratamento quimioterápico. Diante dos objetivos propostos e os resultados obtidos foram inferidas as seguintes conclusões:

1. O alelo polimórfico *CYP2D6*3* foi prevalente no grupo dos pacientes de leucemia destacando a possível relação desses polimorfismos com o risco de desenvolvimento de LLA na infância.
2. O polimorfismo do gene *EPHX1E4*, responsável pelo alelo rápido não apresentou relação com a susceptibilidade aumentada para a LLA.
3. A frequência do alelo polimórfico do gene *EPHX1* (E3), foi maior no grupo de indivíduos controles, sugerindo a atuação desse polimorfismo como fator protetor contra o desenvolvimento da doença.
4. Não foi verificada nenhuma associação entre o polimorfismo do gene *MPO* (G/A) e o risco aumentado de LLA.
5. A frequência do genótipo homocigoto selvagem (G/G) do gene *MPO* foi maior no grupo de pacientes femininos, sugerindo a associação desse genótipo com o sexo.
6. A frequência aumentada da repetição tripla (3R) do gene *TS* no grupo de controles sugere que esse polimorfismo esteja associado com a proteção em relação ao risco de desenvolver LLA.
7. O genótipo 2R/3R foi prevalente em indivíduos do sexo feminino, sugerindo uma associação desse genótipo com o sexo.
8. Não foi observada nenhuma associação entre os genótipos *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO* e *TS* combinados e o risco aumentado de desenvolvimento da LLA.
9. A presença de polimorfismos equivalentes aos genes estudados, não demonstrou relação com a sobrevivência dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ALVÁN G, GRIND M, GRAFFNER C, GUNDERT-REMY U Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 39: 533-537, 1990.

AMADOR AG, RIGHI PD, RADPOUR S, EVERETT ET, WEISBERGER E, LANGER M, ECKERT GJ, CHRISTEN AG, CAMPBELL S JR, SUMMERLIN DJ, REYNOLDS N, HARTSFIELD JK JR Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 93: 440-445, 2002.

- ARNOULD JP, VERHOEST P, BACH V, LIBERT JP AND BELEGAUD J Detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in human placenta and umbilical cord blood. *Hum. Exp. Toxicol.* 16: 716-721, 1997.
- AUSTIN GE, LAM L, ZAKI SR, CHAN WC, HODGE T, HOU J, SWAN D, ZHANG W, RACINE M, WHITSETT C, ET AL. Sequence comparison of putative regulatory DNA of the 5' flanking region of the myeloperoxidase gene in normal and leukemic bone marrow cells. *Leukemia*. 7(9):1445-50. Sep, 1993.
- AUTRUP H Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat. Res.* 464: 65-76, 2000.
- BARNEA ER Modulatory effect of maternal serum on xenobiotic metabolizing activity of placental explants: modification by cigarette smoking. *Hum. Reprod.* 9: 1017-1021, 1994.
- BEETHAM, J.K., GRANT, D., ARAND, M., GARBARINO, J., KIYOSUE, T., PINOT, F., OESCH, F., BELKNAP, W.R., SHINOZAKI, K., HAMMOCK, B.D. Gene evolution of epoxide hydrolase and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 14, 61-71, 1995.
- BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DAG, GRALNICK HR, SULTAN C Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 33: 451-458, 1976.
- BHATIA S, ROSS JA, GREAVES MF, ROBISON LL. EPIDEMIOLOGY AND ETIOLOGY. IN: PUI CH (ed). Childhood leukemias. 1 ed. Cambridge University Press, 1999. Chapter 3, p. 38-49.¹
- BIONDI A, CIMINO G, PIETERS R, PUI CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood*. 1;96(1):24-33. Jul. 2000.
- BONASSI S AND AU WW Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat. Res.* 511: 73-86, 2002.
- BROCKMOLLER J, CASCORBI I, HENNING S, MEISEL C, ROOTS I Molecular genetics of cancer susceptibility. *Pharmacology* 61: 212-227, 2000.

¹ Referências descritas segundo Diretrizes para apresentação de dissertações de teses da USP. Normalização de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023

- BUCKLEY JD, BUCKLEY CM, RUCCIONE K, SATHER HN, WASKERWITZ MJ, WOODS WG, ROBISON LL Epidemiological characteristics of childhood acute lymphocytic leukemia. Analysis by immunophenotype. The Childrens Cancer Group. *Leukemia*8: 856-864, 1994.
- CANALLE R, BURIM RV, TONE LG, TAKAHASHI CS Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environ Mol Mutagen*. 43: 100-109, 2004.
- CARROLL WL, BHOJWANID, MIN DJ, RAETZ E, RELLING M, DAVIES S, DOWNING JR, WILLMAN CL, REED JC. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 102-31, 2003.
- CASCORBI I, HENNING S, BROCKMOLLER J, GEPHART J, MEISEL C, MULLER JM, LODDENKEMPER R, ROOTS I.) Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant--463A of the myeloperoxidase gene. *Cancer Res*. Feb 1;60(3):644-9, 2000.
- CASSON AG, ZHENG Z, CHIASSEON D, MACDONALD K, RIDDELL DC, GUERNSEY JR, GUERNSEY DL, MCLAUGHLIN J. Associations between genetic polymorphisms of Phase I and II metabolizing enzymes, p53 and susceptibility to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Detect Prev*; 27(2):139-46, 2003.
- CHEN J, HUNTER DJ, STAMPFER MJ, KYTE C, CHAN W, WETMUR JG, MOSIG R, SELHUB J, MA J. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region modifies the risk and survival of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;12(10):958-62. Oct, 2003.
- CHEN J, KYTE C, CHAN W, WETMUR JG, FUCHS CS, GIOVANNUCCI E. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region and risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13(12):2247-50. Dec, 2004.
- CORTESSIS V, SIEGMUND K, CHEN Q, ZHOU N, DIEP A, FRANKL H, LEE E, ZHU Q.S, HAILE R, LEVY D. A case-control study of microsomal epoxide hydrolase, smoking, meat consumption, glutathione S-transferase M3, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res*. Mar 15;61(6):2381-5, 2001.
- CRESPI CL, PENMAN BW, GELBOIN HV, GONZALEZ FJ A tobacco smoke-derived nitrosamine,4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, is activated by

multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis* 12: 1197-1201, 1991.

CUI Y.J., LI Y., WANG R., GUO W., WANG N., WEN D.G., WEI L.Z., ZHANG J.H. Association of thymidylate synthase polymorphism with esophageal squamous-cell carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 27(8):475-7. Aug, 2005.

CUPP MJ & TRACY TS Cytochrome P450: new nomenclature and clinical implications. *Am. Fam. Physician*. 57: 107-116, 1998.

DALY AK, CHOLESTON S, WENDY G, IDLE JR. Metabolic polymorphism. *Pharmacol. Ther.* 57: 129-160, 1993.

DANIELS JL, OLSHAN AF, SAVITZ DA Pesticides and childhood cancers. *Environ. Health Perspect.* 105: 1068-1077, 1997.

DUARTE, MÁRCIA CRISTINA, COLOMBO, JUCIMARA, ROSSIT, ANDRÉA REGINA BAPTISTA, SILVA, ANA ELIZABETE Polymorphisms of the DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3* in a Brazilian population. *Genet. Mol. Biol.* 28: 397-401, 2005.

DUNCAN BB, SCHMIDT MI, POLANCZYK CA, MENGUE SS High mortality rates among Brazilian adult populations an international comparison. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 38: 138-144, 1992.

ENDRIZZI K, FISCHER J, KLEIN K, SCHWAB M, NUSSLER A, NEUHAUS P, EICHELBAUM M, ZANGER UM. Discriminative quantification of cytochrome P4502D6 and 2D7/8 pseudogene expression by TaqMan real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* Jan 15;300(2):121-31, 2002.

EVANS WE, RELING MV Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 429: 464-468, 2004.

EVANS WE, RELING MV, RAHMAN A, MCLEOD HL, SCOTT EP, LIN J-S Genetic basis for a lower prevalence of deficient *CYP2D6* oxidative drug metabolism phenotypes in Black Americans. *J. Clin. Invest.* 91: 2150-2154, 1993.

GAEDIGK A, BLUM M, GAEDIGK R, EICHELBAUM M, MEYER UA Deletion of the entire cytochrome P450 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor

metabolisers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 943-950, 1991.

GAEDIGK A, BRADFORD LD, MARCUCCI KA, LEEDER JS. Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. *Clin Pharmacol Ther.* Jul;72(1):76-89, 2002.

GAJECKA M, RYDZANICZ M, JASKULA-SZTUL R, KUJAWSKI M, SZYFTER W, SZYFTER K. CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma. *Mutat Res.* Jul 1;574(1-2):112-23. Epub 2005 Apr 15, 2005.

GARTE S, GASPARI L, ALEXANDRIE AK, AMBROSONE C, AUTRUP H, AUTRUP JL, BARANOVA H, BATHUM L, BENHAMOU S, BOFFETTA P, BOUCHARDY C, BRESKVAR K, BROCKMOLLER J, CASCORBI I, CLAPPER ML, COUTELLE C, DALY A, DELL'OMO M, DOLZAN V, DRESLER CM, FRYER A, HAUGEN A, HEIN DW, HILDESHEIM A, HIRVONEN A, HSIEH LL, INGELMAN-SUNDBERG M, KALINA I, KANG D, KIHARA M, KIYOHARA C, KREMERS P, LAZARUS P, LE MARCHAND L, LECHNER MC, VAN LIESHOUT EM, LONDON S, MANNI JJ, MAUGARD CM, MORITA S, NAZAR-STEWART V, NODA K, ODA Y, PARL FF, PASTORELLI R, PERSSON I, PETERS WH, RANNUG A, REBBECK T, RISCH A, ROELANDT L, ROMKES M, RYBERG D, SALAGOVIC J, SCHOKET B, SEIDEGARD J, SHIELDS PG, SIM E, SINNET D, STRANGE RC, STUCKER I, SUGIMURA H, TO-FIGUERAS J, VINEIS P, YU MC, TAIOLI E Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10: 1239-1248, 2001.

GONZALEZ FJ, GELBOIN HV Role of human cytochrome P-450s in risk assessment and susceptibility to environmentally based disease. *J. Toxicol. Environ. Health*40: 289-308, 1993.

GOUGH AC, MILES JS, SPURR NK, MOSS JE, GAEDIGK A, EICHELBAUM M, WOLF CR Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. *Nature*347: 773-776, 1990.

GRAZIANO F, KAWAKAMI K, WATANABE G, RUZZO A, HUMAR B, SANTINI D, CATALANO V, FICARELLI R, MERRIMAN T, PANUNZI S, TESTA E, CASCINU S, BEARZI I, TONINI G, MAGNANI M. Association of thymidylate synthase polymorphisms with gastric cancer susceptibility. *Int J Cancer.* Dec 20;112(6):1010-4, 2004.

GREAVES M A natural history for pediatric acute leukemia. *Blood* 82: 1043-1051, 1993.

GREAVES M. CHILDHOOD LEUKAEMIA. *BMJ* 324:283-7, 2002. REVIEW

GRIEU F, POWELL B, BEILBY J, IACOPETTA B. Methylene tetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase polymorphisms are not associated with breast cancer risk or phenotype. *Anticancer Res.* Sep-Oct;24(5B):3215-9, 2004.

GSUR A, ZIDEK T, SCHNATTINGER K, FEIK E, HAIDINGER G, HOLLAUS P, MOHN-STAUDNER A, ARMBRUSTER C, MADERSBACHER S, SCHATZLG, TRIEB K, VUTUC C, MICKSCHE M. Association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk. *Br J Cancer.* 18;89(4):702-6, Aug 2003.

GUENGERICH FP AND SHIMADA T Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat. Res.* 400: 201-213, 1998.

GUNZ, F.W. Leukemia in the past. In: Henderson, E.S.; Lister, T.A. (eds) *William Dameshek and Frederick Gunz's leukemia*. 5ed. Philadelphia, P.A.: WB Saunders Company, 1990:3-11.

HAKKOLA J, PELKONEN O, PASANEN M, RAUNIO H Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human fetoplacental unit: role in intrauterine toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 28: 35-72, 1998.

HANIOKA N, KIMURA S, MEYER UA, GONZALEZ FJ The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934 to A base change in intron 3 of a mutant *CYP2D6* allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 994-1001, 1990.

HASSETT C, ROBINSON KB, BECK NB, OMIECINSKI CJ The human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1): complete nucleotide sequence and structural characterization. *Genomics* 23: 433-442, 1994.

HAYES JD AND PULFORD DJ The glutathione S-transferase supergene family regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 445-600, 1995.

HISHIDA A, MATSUO K, HAMAJIMA N, ITO H, OGURA M, KAGAMI Y, TAJI H, MORISHIMA Y, EMI N, TAJIMA K. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica.* Feb;88(2):159-66, 2003.

- HORIE N, AIBA H, OGURO K, HOJO H, TAKEISHI K Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct. Funct.* 20: 191-197, 1995.
- HOY A, LEININGER-MULLER B, KUTTER D, SIEST G, VISVIKIS S Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40: 2-8, 2002.
- HUANG W.Y, CHATTERJEE N, CHANOCKS, DEAN M, YEAGER M, SCHOEN R.E, HOUL F, BERNDT S.I, YADAVALLIS, JOHNSON C.C, HAYES, R.B. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and risk for advanced colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Jan;14(1):152-7, 2005.
- IACOPETTA B, GRIEU F, JOSEPH D, ELSALEH H A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Br. J. Cancer* 85: 827-830, 2001.
- INFANTE-RIVARD C, LABUDA D, KRAJINOVIC M, SINNETT D Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. *Epidemiology* 10: 481-487, 1999.
- INGELMAN-SUNDBERG M Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat. Res.* 482: 11-19, 2001.
- INGELMAN-SUNDBERG M Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 193-200, 2004.
- INGELMAN-SUNDBERG M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.*;5(1):6-13. Review. 2005.
- INFANTE-RIVARD C, LABUDA D, KRAJINOVIC M, SINNETT D Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. *Epidemiology* 10: 481-487, 1999.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKI, J.J. PCR applications protocols for functional genomics. Academic Press, San Diego, 1999.

- INNOCENTIF, RATAIN MJ. Update on pharmacogenetics in cancer chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2002 Mar;38(5):639-44.
- JOSEPH T, KUSUMAKUMARY P, CHACKO P, ABRAHAM A, PILLAI MR DNA repair gene XRCC1 polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett*. 217: 17-24, 2005.
- KAGIMOTO M, HEIM M, KAGIMOTO K, ZEUGIN T, MEYER UA Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (*CYP2D6*) in poor metabolisers of debrisoquine. *J. Biol. Chem*. 265: 17209-17214, 1990.
- KALANT H Biotransformação das drogas. In: Princípios de Farmacologia Médica, 30-40, 1991.
- KANTARCI OH, LESNICK TG, YANG P, MEYER RL, HEBRINK DD, MCMURRAY CT, WEINSHENKER BG. Myeloperoxidase -463 (G-->A) polymorphism associated with lower risk of lung cancer. *Mayo Clin Proc*. Jan;77(1):17-22, 2002.
- KEBRIAIEI P, LARSON RA. Progress and challenges in the therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 10(4):284-9. Jul, 2003.
- KLEINBAUM DG, KUPPER LL, MORGENSTERN H Epidemiologic research: Principles and quantitative methods. Belmont, CA: Wadsworth, 1982.
- KOTILO, P. N. Flow citometric analysis in diagnostic hematology. In: RODAK, B. F. *Diagnostic hematology*. Sunders Company, 1995.
- KRAJINOVIC M, COSTEA I, CHIASSON S Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 359: 1033-1034, 2002a.
- KRAJINOVIC M, LABUDA D, MATHONNET G, LABUDA M, MOGHRABI A, CHAMPAGNE J, SINNETT D Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 8: 802-810, 2002b.
- KRAJINOVIC M, LABUDA D, RICHER C, KARIMI S, SINNETT D Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood*93: 1496-1501, 1999.

- LAGUEUX J, PEREG D, AYOTTE P, DEWAILLY E AND POIRIER GG Cytochrome P450 CYP1A1 enzyme activity and DNA adducts in placenta of women environmentally exposed to organochlorines. *Environ. Res.* 80: 369-382, 1999.
- LANCASTER JM, BROWNLEE HA, BELL DA, FUTREAL PA, MARKS JR, BERCHUCK A, WISEMAN RW, TAYLOR JA. Microsomal epoxide hydrolase polymorphism as a risk factor for ovarian cancer. *Mol Carcinog.* Nov;17(3):160-2, 1996.
- LANG M AND PELKONEN O Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. In: Vieneis P, Malats N, Lag M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J, Boffetta P (eds). *Metabolic Polymorphism and Susceptibility to Cancer.* IARC Scientific Publication, v. 148. Lyon, France, 1999. Chapter 3, p. 13-22, 1999.
- LE MARCHAND L, SEIFRIED A, LUM A, WILKENS LR. Association of the myeloperoxidase -463G-->a polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Feb;9(2):181-4, 2000.
- LEBAILLY P, WILLETT EV, MOORMAN AV, ROMAN E, CARTWRIGHT R, MORGAN GJ, WILD CP. Genetic polymorphisms in microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to adult acute myeloid leukaemia with defined cytogenetic abnormalities. *Br J Haematol.* Mar;116(3):587-94, 2002.
- LEMOS MC, CABRITA FJ, SILVA HA, VIVAN M, PLACIDO F, REGATEIRO FJ Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to haematological neoplasias. *Carcinogenesis*20: 1225-1229, 1999.
- LEWIS DFV, WATSON E, LAKE BG EVOLUTION OF THE CYTOCHROME P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutat. Res.* 410: 245-270, 1998.
- LIGHTFOOT T. Aetiology of childhood leukemia. *Bioelectromagnetics*;Suppl 7:S5-S11, 2005.
- LIU G, ZHOU W, WANG LI, PARKS S, MILLER DP, XU LL, WAIN JC, LYNCH TJ, SU L, CHRISTIANI DC. MPO and SOD2 polymorphisms, gender, and the risk of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Lett.* Oct 8;214(1):69-79, 2004.
- LONDON SJ, LEHMAN TA, TAYLOR JA Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Res.* 57: 5001-5003, 1997.

LORAND IC, SOUZA CA, COSTA FF Haematological toxicity associated with agricultural chemicals in Brazil. *Lancet*1(8373): 404, 1984.

LOU YC Differences in drug metabolism polymorphism between Orientals and Caucasians. *Drug. Metab. Rev.* 22: 451-475, 1990.

LU W, QI J, XING D, TAN W, MIAO X, SU W, WU M, LIN D. Lung cancer risk associated with genetic polymorphism in myeloperoxidase (-463 G/A) in a Chinese population *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* May;24(3):250-3. Chinese, 2002.

MARGOLIN JF & POPLACK DG. Acute lymphoblastic leukemia. In: Pizzo PA, Poplack, DG (eds). *Principles and Practices of Pediatric Oncology.* 3. ed. Philadelphia JB Lippincott Company, Chapter 17, p. 409-462, 1997.

MARSH S, COLLIE-DUGUID ES, LI T, LIU X, MCLEOD HL. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics.* 15:58(3):310-2. Jun, 1999.

MATSUO K, HAMAJIMA N, SUZUKI R, NAKAMURA S, SETO M, MORISHIMA Y, TAJIMA K. No substantial difference in genotype frequencies of interleukin and myeloperoxidase polymorphisms between malignant lymphoma patients and non-cancer controls. *Haematologica;*86(6):602-8, Jun, 2001.

MORISSEAU C, HAMMOCK BD. Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. *Annu Rev Pharmacol Toxicol;* 45:311-33, 2005.

NAGAI F, HIYOSHI Y, SUGIMACHI K, TAMURA HO Cytochrome P450 (CYP) expression in human myeloblastic and lymphoid cell lines. *Biol Pharm Bull.* Mar;25(3):383-5, 2002.

NAGASUBRAMANIAN R, INNOCENTI F, RATAIN MJ Pharmacogenetics in cancer treatment. *Annu. Rev. Med.* 54: 437-452, 2003.

NEBERT DW & GONZALEZ FK P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 945-993, 1987.

OESCH F Mammalian epoxide hydrolases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica*3: 305-340, 1973.

- OKAY TS, OLIVEIRA WP, RAIZ-JUNIOR R, RODRIGUES JC, DEL NEGRO GM. Frequency of the deltaF508 mutation in 108 cystic fibrosis patients in Sao Paulo: comparison with reported Brazilian data. *Clinics*. Apr;60(2):131-4, 2005.
- S.H. OLSON, M.D.A. CARLSON, H. OSTRER, S. HARLAP, A. STONE, M. WINTERS, C.B. AMBROSONE. Genetic variants in SOD2, MPO, and NQO1, and risk of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 93 615-620, 2004.
- PAKAKASAMA S, CHEN TT, FRAWLEY W, MULLER C, DOUGLASS EC, TOMLINSON GE. Myeloperoxidase promotor polymorphism and risk of hepatoblastoma. *Int J Cancer*. Aug 20;106(2):205-7, 2003.
- PERERA FP Molecular epidemiology: insight into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 496-509, 1996.
- PERERA FP Environment and cancer: Who are susceptible? *Science* 278: 1068-1073, 1997.
- PERERA FP, JEDRYCHOWSKI W, RAUH V, WHYATT RM Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. *Environ. Health Perspect.* 107: 451-460, 1999.
- PERSOON I, JOHANSSON I, LOU YC, YUE QY, DUAN LS, BERTILSSON L, INGELMAN-SUNDBERG M Genetic polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes among Chinese lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 81: 325-329, 1999.
- PIEDRAFITA FJ, MOLANDER RB, VANSANT G, ORLOVA EA, PFAHL M, REYNOLDS WF An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J. Biol. Chem.* 271: 14412-14420, 1996.
- PILERI S.A., ASCANI S., MILANI, M. Acute leukemia immunophenotyping in bone-marrow routine sections. *British Journal of Hematology.* 105:394-401, 1999.
- PINKEL, D. Fiveyear follow up of "total therapy" of childhood acute lymphocytic leukemia. *JAMA*, v. 216, p. 648-652, 1971.
- PHILLIPS KA, VEENSTRA DL, OREN E, LEE JK, SADEE W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA.* 14;286(18):2270-9, 2001.

PUI, C.H.; BEHM, F.G.; CRIST, W.M. Clinical and biological relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 82, p. 343-362, 1993.

PUI C.H. Childhood leukemias. *New Engl. J. Med.* 332: 1618-1630, 1995.

PUI C.H, RELLING M.V, EVANS W.E. Role of pharmacogenomics and pharmacodynamics in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 15: 741-756, 2003.

PUI CH, SCHRAPPE M, RIBEIRO RC, NIEMEYER CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 118-45, 2004.

QUEIROZ ML, BINCOLETTO C, PERLINGEIRO RC, SOUZA CA, TOLEDO H Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to hexachlorobenzene. *Hum. Exp. Toxicol.* 16: 322-326, 1997.

RAUNIO, H, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, ANTTILA S, HIETANEN E, HIRVONEN A, PELKONEN O Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility-a review. *Gene* 159: 113-121, 1995.

RELLING MV, RUBNITZJE, RIVERA GK, BOYETT JM, HANCOCK ML, FELIX CA, KUN LE, WALTER AW, EVANS WE, PUI CH. High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet.* v. 3;354(9172):34-9, 1999.

REYNOLDS WF, CHANG E, DOUER D, BALL ED, KANDA V An allelic association implicates myeloperoxidase in the etiology of acute promyelocytic leukemia. *Blood*

RODDAM PL, ALLAN JM, ROLLINSON S, SMITH AG, WILLETT EV, SWIRSKY D, ROMAN E, MORGAN GJ. Poor metabolizer status at the cytochrome P450 2C9 and 2D6 loci does not modulate susceptibility to therapy-related acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* Apr;121(1):192-4, 2003.

ROSS JA, DAVIES SM, POTTER JD, ROBISON LL Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants. *Epidemiol. Rev.* 16: 243-272, 1994.

- ROSS JS, SCHENKEIN DP, PIETRUSKO R, ROLFE M, LINETTE GP, STEC J, STAGLIANO NE, GINSBURG GS, SYMMANS WF, PUSZTAI L, HORTOBAGYI GN. Targeted therapies for cancer 2004. *Am J Clin Pathol.* 2004 Oct;122(4):598-609.
- ROSSIT AR, CABRAL IR, HACKEL C, DA SILVA R, FROES ND, ABDEL-RAHMAN SZ Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. *Cancer Lett.* 180: 173-182, 2002.
- ROTS MG, WILLEY JC, JANSEN G, VAN ZANTWIJK CH, NOORDHUIS P, DEMUTH JP, KUIPER E, VEERMAN AJ, PIETERS R, PETERS GJ mRNA expression levels of methotrexate resistance-related proteins in childhood leukemia as determined by a standardized competitive template-based RT-PCR method. *Leukemia*14: 2166-2175, 2000.
- RUIZ MA, AUGUSTO LG, VASSALLO J, VIGORITO AC, LORAND-METZE I, SOUZA CA Bone marrow morphology in patients with neutropenia due to chronic exposure to organic solvents (benzene): early lesions. *Pathol. Res. Pract.* 190: 151-154, 1994.
- SACHSE C, BROCKMOLLER J, BAUER S, ROOTS I Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 284-295, 1997.
- SANDLER DP & ROSS JA Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin. Oncol.* 24: 3-16, 1997.
- SCHABATH MB, SPITZ MR, HONG WK, DELCLOS GL, REYNOLDS WF, GUNN GB, WHITEHEAD LW, WU X A myeloperoxidase polymorphism associated with reduced risk of lung cancer. *Lung Cancer*37: 35-40, 2002.
- SCHABATH MB, SPITZ MR, ZHANG X, DELCLOS GL, WU X. Genetic variants of myeloperoxidase and lung cancer risk. *Carcinogenesis.* Jun;21(6):1163-6, 2000.
- SARAN M, BECK-SPEIRER I, FELLERHOLL B, et al. Phagocytic killing of microorganisms by radical processes: consequences of the reaction of hydroxyl radical with chloride yielding chlorine atoms. *Free Radic Biol Med*26:482-90, 1999.
- SEVERSON RK & ROSS JA The causes of acute leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* 11: 20-24, 1999.

- SEVERSON RK, BUCKLEY JD, WOODS WG, BENJAMIN D, ROBISON LL Cigarette smoking and alcohol consumption by parents of children with acute myeloid leukemia: an analysis within morphological subgroups--a report from the Childrens Cancer Group. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2: 433-439, 1993.
- SHARP L, LITTLE J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* Mar 1;159(5):423-43, 2004.
- SHIELDS, P.G. Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer. *J. Am. Med. Ass.*, v. 266, p. 681-687, 1993.
- SHI Q, ZHANG Z, NEUMANN AS, LI G, SPITZ MR, WEI Q. Case-control analysis of thymidylate synthase polymorphisms and risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 26:649-656, 2005.
- SHU XO Epidemiology of childhood leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* 4: 227-232, 1997.
- SHU XO, ROSS JA, PENDERGRASS TW, REAMAN GH, LAMPKIN B, ROBISON LL Parental alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of infant leukemia: a Childrens Cancer Group study. *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 24-31, 1996.
- SIMS P, GROVER PL, SWAISLAND A, PAL K, HEWER A Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* 252: 326-328, 1974.
- SIRMA S, AGAOGLU L, YILDIZ I, CAYLI D, HORGUSLUOGLU E, ANAK S, YUKSEL L, UNUVAR A, CELKAN T, APAK H, KARAKAS Z, DEVECIOGLU O, OZBEK U NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 null genotype is not associated with pediatric de novo acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 43: 568-570, 2004.
- SKIBOLA CF, SMITH MT, HUBBARD A, SHANE B, ROBERTS AC, LAW GR, ROLLINSON S, ROMAN E, CARTWRIGHT RA, MORGAN GJ. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood.* May 15;99(10):3786-91, 2002.
- SKODA RC, GONZALEZ FJ, DEMIERRE A, MEYER UA. Two mutant alleles of the human cytochrome P-450db1 gene (P450C2D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul;85(14):5240-3, 1988.
- SMITH M, ARTHUR D, CAMITTA B, CARROLL AJ, CRIST W, GAYNON P, GELBERG, HEEREMAN, KORNEL, LINK M, MURPHYS, PUI CH, PULLEN J, REAMON G, SALLAN SE, SATHER H, SHUSTER J, SIMON

- R, TRIGG M, TUBERGEN D, UCKUN F, UNGERLEIDER R. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. V. 14, p.18-24, 1996.
- SMITH CA AND HARRISON DJ Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 350: 630-633, 1997.
- SMITH CA, GOUGH AC, LEIGH PN, SUMMERS BA, HARDING AE, MARAGANORE DM, STURMAN SG, SCHAPIRA AH, WILLIAMS AC Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Lancet* 339: 1375-1377, 1992.
- TO-FIGUERAS J, GENE M, GOMEZ-CATALAN J, PIQUE E, BORREGO N, CABALLERO M, CRUELLAS F, RAYA A, DICENTA M, CORBELLA J Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Lett*. 187: 95-101, 2002.
- TOPINKA J, BINKOVA B, MRACKOVA G, STAVKOVA Z, BENES I, DEJMEK J, LENICEK J AND SRAM RJ DNA adducts in human placenta as related to air pollution and to GSTM1 genotype. *Mutat. Res*. 390: 59-68, 1997.
- TRANAH GJ, GIOVANNUCCI E, MA J, FUCHS C, HANKINSON SE, HUNTER DJ. Epoxide hydrolase polymorphisms, cigarette smoking and risk of colorectal adenoma in the Nurses' Health Study and the Health Professionals Follow-up Study. *Carcinogenesis*. Jul;25(7):1211-8. Epub 2004 Feb 26, 2004.
- TRUEWORTHY R, SHUSTER J, LOOK T, CRIST W, BOROWITZ M, CARROLL A, FRANKEL L, HARRIS M, WAGNER H, HAGGARD M, MOSIJCZUK A, PULLEN J, STEUBER P, LAND V Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J. Clin. Oncol*. 10: 606-613, 1992.
- TUIMALA J, SZEKELY G, GUNDY S, HIRVONEN A, NORPPA H Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. *Carcinogenesis* 23: 1003-1008, 2002.
- UCHIDA K, HAYASHI K, KAWAKAMI K, SCHNEIDER S, YOCHIM JM, KURAMOCHI H, TAKASAKI K, DANENBERG KD, DANENBERG PV. Loss of heterozygosity at the thymidylate synthase (TS) locus on chromosome 18 affects tumor response and survival in individuals heterozygous for a 28-bp polymorphism in the TS gene. *Clin Cancer Res*. Jan 15;10(2):433-9, 2004.

- ULRICH CM, BIGLER J, BOSTICK R, FOSDICK L, POTTER JD. (2002)Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res.* Jun 15;62(12):3361-4.
- VAN DER LOGT EM, BERGEVOET SM, ROELOFS HM, TE MORSCHE RH, DIJK YV, WOBES T, NAGENGAST FM, PETERS WH. Role of epoxide hydrolase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, cytochrome P4502E1 or alcohol dehydrogenase genotypes in susceptibility to colorectal cancer. *Mutat Res.* Jul 20, 2005.
- VAN IERSEL ML, VERHAGEN H, VAN BLADEREN PJ The role of biotransformation in dietary (anti)carcinogenesis. *Mutat. Res.* 443: 259-270, 1999.
- VASSEF M.A., BRYNES R.K, MURATA-COLLINS J.L et al. Surface immunoglobulin light chain-positive acute lymphoblastic leukemia os FAB L1 or L2 type: a report of 6 cases in adults. *American Journal of Clinical Pathology.* 110:143-149, 1998.
- VILLAFRANCA E, OKRUZHNOV Y, DOMINGUEZ M.A, GARCIA-FONCILLAS J, AZINOVIC I, MARTINEZ E, ILLARRAMENDI J.J, ARIAS F, MARTINEZ MONGE R, SALGADO E, ANGELETTI S, BRUGAROLAS A. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol.* 15;19(6):1779-862001 Mar, 2001.
- VODICKA P, SOUCEK P, TATES AD, DUSINSKA M, SARMANOVA J, ZAMECNIKOVA M, VODICKOVA L, KOSKINEN M, DE ZWART FA, NATARAJAN AT, HEMMINKI K. Association between genetic polymorphisms and biomarkers in styrene-exposed workers. *Mutat Res.* Oct 1;482(1-2):89-103, 2001.
- WELSH SJ, TITLEY J, BRUNTON L, VALENTI M, MONAGHAN P, JACKMAN AL, AHERNE GW Comparison of thymidylate synthase (TS) protein up-regulation after exposure to TS inhibitors in normal and tumor cell lines and tissues. *Clin. Cancer Res.* 6: 2538-2546, 2000.
- WHYATT RM AND PERERA FP Application of biologic markers to studies of environmental risks in children and the developing fetus. *Environ. Health Perspect.* 103: 105-110, 1995.
- WHYATT RM, BELL DA, JEDRYCHOWSKI W, SANTELLA RM, GARTE SJ, COSMA G, MANCHESTER DK, YOUNG TL, COOPER TB, OTTMAN R, PERERA FP Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta and modulation by CYP1A1 induction and genotype. *Carcinogenesis*19: 1389-1392, 1998.

WIEMELS JL, PAGNAMENTA A, TAYLOR GM, EDEN OB, ALEXANDER FE, GREAVES MF A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. *Cancer Res.* 59: 4095-4099, 1999.

WITKIN SS, GERBER S, LEDGER WJ Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin. Infect. Dis.* 34: 204-209, 2002.

ZAHM SH & WARD MH Pesticides and childhood cancer. *Environ. Health Perspect.* 106 Suppl 3: 893-908, 1998.

ZHOU W, THURSTON S.W, LIU G, XU L.L, MILLER D.P, WAIN J.C, LYNCH T.J, SU L, CHRISTIANI D.C. The interaction between microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and cumulative cigarette smoking in different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*;10(5):461-6. May, 2001.