

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

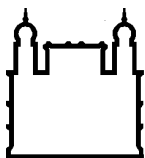
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS A
DETOXIFICAÇÃO DE XENOBIÓTICOS E AO ESTRESSE
OXIDATIVO NA EVOLUÇÃO DE PACIENTES COM LEUCEMIA
LINFÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA NO ESTADO DA BAHIA –
BRASIL**

SILVANA SOUSA DA PAZ

**Salvador-Bahia-Brasil
Março 2012**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MEDICINA
INVESTIGATIVA**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS A
DETOXIFICAÇÃO DE XENOBIÓTICOS E AO ESTRESSE
OXIDATIVO NA EVOLUÇÃO DE PACIENTES COM LEUCEMIA
LINFÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA NO ESTADO DA BAHIA –
BRASIL**

SILVANA SOUSA DA PAZ

ORIENTADORA: PROFª DRª MARILDA DE SOUZA GONÇALVES

CO-ORIENTADORA: PROFª DRª CYNARA GOMES BARBOSA

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para a
obtenção do grau de Mestre.

**Salvador- Bahia- Brasil
Março 2012**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

P348a Paz, Silvana Sousa da
Avaliação de marcadores genéticos associados a detoxificação de xenobióticos e ao estresse oxidativo na evolução de pacientes com leucemia linfóide aguda da infância no estado da Bahia-Brasil. [manuscrito] / Silvana Sousa da Paz. - 2012. 82 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

1.1.1 Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, 2012.

Orientador: Profª Drª Marilda de Souza Gonçalves

Co-orientadora: Profª Drª Cynara Gomes Barbosa

1. Leucemia Linfóide aguda da criança 2. Polimorfismos gênicos 3. Glutathione S- Transferase (GSTT1, GSTM1), NAD(P)H:quinona oxirredutase1(NQO1). 4. Citocromo P450(CYP2E1) 5. Mieloperoxidase(MPO) I.Título.

CDU 616-006.44

FONTES DE FINANCIAMENTO

FAPESB – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia
CNPq- Conselho Nacional de Pesquisa

*“Seja forte, não como o mar
que a tudo destrói e sim como as
rochas, que a tudo resistem.”*

Provérbio Chinês

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, força maior que rege o universo e nos dá o dom da vida, nos alimentando pela fé;

À **Profª Drª Marilda de Souza Gonçalves**, exemplo de força, sucesso e sabedoria, pela confiança depositada em mim ao aceitar me orientar neste trabalho, minha profunda e eterna gratidão;

À **Profª Drª Cynara Gomes Barbosa**, minha co-orientadora e amiga, exemplo de sabedoria e serenidade. Obrigada por ser meu anjo da guarda e por ter iluminado minha trajetória durante a execução deste trabalho;

Ao **Drº Luciano César Santos**, meu parceiro de bancada durante os experimentos iniciais que deram origem a este trabalho;

À toda **“Equipe Hemoglobinopatias”**, que me acolheu com uma generosidade imensurável e que sempre me presentearam com imenso carinho e amizade;

Aos alunos de **iniciação científica**, sem os quais não seria possível a conclusão dos experimentos que deram origem a este trabalho, em especial a **Camylla Vilas-Boas, Rayra Santiago, Felipe Santiago e Rodrigo Mota**;

Às amigas **Cyntia Cajado e Nadja Gonçalves**, pelo apoio mútuo nos momentos mais difíceis;

Aos colegas do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, especialmente à **Andreia Carvalho, Jaqueline Cruz, Alcinéia Damião, Fernanda Beserra e Daniele Takahashi**;

Aos pacientes ou responsáveis pela participação neste estudo;

Aos médicos e toda equipe da Clínica ONCO envolvidos neste estudo;

À minha **família** e em especial a **Marcos**, que caminha ao meu lado desde a graduação, pela tolerância, compreensão e paciência e por ter me dado o presente mais precioso da minha vida, **Sophia**, que chegará dentro de poucas semanas para iluminar nossa trajetória;

À FAPESB e ao CNPQ pelo apoio financeiro;

A todos aqueles, que mesmo não tendo sido citados colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

AVALIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS A DETOXIFICAÇÃO DE XENOBIÓTICOS E AO ESTRESSE OXIDATIVO NA EVOLUÇÃO DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DA INFÂNCIA NO ESTADO DA BAHIA – BRASIL. Silvana Sousa da Paz. As leucemias são malignidades hematopoiéticas, caracterizadas por subgrupos biologicamente distintos, sendo os tipos mais frequentes de cânceres em crianças e adolescentes. Polimorfismos em genes de enzimas que metabolizam xenobióticos podem estar relacionados com a inserções/deleções, polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP's) e variações no número de cópias e têm sido relacionados com a patogênese de algumas neoplasias hematológicas, como a leucemia linfóide aguda (LLA). O objetivo deste estudo foi o de determinar as frequências de polimorfismos em genes associados ao estresse oxidativo e metabolismo de xenobióticos (*GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2E1*, *NQO1* e *MPO*), em pacientes pediátricos com LLA, associando-as a aspectos clínicos e marcadores de evolução da doença. A casuística foi composta por 37 pacientes pediátricos seguidos na clínica ONCO e tratados pelo protocolo GBTLI-LLA 93. O perfil hematológico dos pacientes foi realizado ao diagnóstico e durante o tratamento e os polimorfismos gênicos foram investigados por reação da polimerase em cadeia - polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (PCR-RFLP) e por reação da polimerase em cadeia multiplex (PCR Multiplex). As análises estatísticas apresentaram significância para os valores de leucócitos totais nos D1 e D7 ($p= 0,0016$) e nos D1 e D14 ($p= 0,0059$); linfócitos nos D1 e D7 ($p= 0,0088$) e D1 e D14 ($p= 0,0101$); segmentados neutrófilos nos D1 e D7 ($p= 0,0033$) e D1 e D14 ($p= 0,0252$); blastos periféricos D1 e D7 ($p < 0,0001$) e D1 e D14 ($p < 0,0001$) e; para a contagem de blastos na medula óssea (MO) nos D1 e D15 ($p < 0,0001$), D1 e D28 ($p < 0,0001$) e D15 e D28 ($p= 0,0005$). As frequências alélicas e genotípicas para os genes estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A mutação do gene *MPO* foi associada a infiltração da MO ($p= 0,0473$) e presença de blastos no líquido ($p= 0,0473$). O polimorfismo do gene *GSTT1* foi associado à contagem de leucócitos ($p= 0,014$) e plaquetas ($p= 0,0034$) no D1 e a contagem de leucócitos ($p=0,037$) e segmentados neutrófilos ($p= 0,0008$) no D7. A presença do polimorfismo no gene *NQO1* foi associado à infiltração da MO ($p= 0,0410$) e a presença de blastos no líquido ($p= 0,0410$). Entretanto, o polimorfismo *NQO1* apresentou associação com a presença de palidez ($p=0,0096$). Os dados encontrados corroboram em parte com dados encontrados na literatura, sendo necessária a realização de um estudo com número maior de pacientes para confirmação dos achados relacionados aos genes investigados e a LLA.

Palavras-chave: Leucemia linfóide aguda da criança, polimorfismos gênicos, Glutathione S-Transferase (*GSTT1*, *GSTM1*), NAD(P)H: quinona oxirredutase1 (*NQO1*), Citocromo P450 (*CYP2E1*), e Mieloperoxidase (*MPO*).

ABSTRACT

EVALUATION OF GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH XENOBIOTICS DETOXIFICATION AND OXIDATIVE STRESS IN THE EVOLUTION OF PATIENTS WITH CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN THE STATE OF BAHIA - BRAZIL. Silvana Sousa da Paz. Leukemia is characterized by biologically distinct subgroups and is the most frequent hematological malignancy in childhood. Polymorphisms in genes of enzymes that metabolize xenobiotics may be related to insertions/ deletions, single nucleotide polymorphisms (SNP's) and gene copies variation and have been related to the pathogenesis of some hematologic malignancies, including acute lymphoblastic leukemia (ALL). The aim of this study was to investigate genes polymorphisms associated with the oxidative stress and xenobiotic metabolism (*GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2E1*, *NQO1* and *MPO*) in a group of childhood ALL patients, associating them with clinical evolution and prognostic markers. The casuistic was compound by 37 pediatric patients followed and treated at the clinic ONCO with the protocol GBTLI-LLA 93. The hematological profile of patients was performed at diagnosis and during treatment and gene polymorphisms were investigated by Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) and Polimerase Chain Reaction Multiplex (Multiplex PCR). Statistical analyses were significant for values of total leukocytes in D1 and D7 ($p= 0.0016$) and in D1 e D14 ($p= 0.0059$); lymphocytes in D1 and D7 ($p= 0.0088$), D1 and D14 ($p= 0.0101$); neutrophils in D1 and D7 ($p= 0.0033$), D1 and D14 ($p= 0.0252$). It was also find statistical significance at the number of peripheral blasts in D1 and D7 ($p < 0.0001$), D1 and D14 ($p < 0.0001$); the blast count in bone marrow (BM) in D1 and D15 ($p < 0.0001$), D1 and D28 ($p < 0.0001$) and D15 and D28 ($p= 0.0005$). The allelic and genotypic frequencies of all gene polymorphism investigated were in Hardy-Weinberg equilibrium. The *MPO* gene mutation was associated with infiltration of the BM in D28 ($p= 0.0473$) and the presence of blasts in the CSF ($p= 0.0473$). The *GSTT1* gene polymorphism was associated with leukocyte ($p= 0.014$) and platelet counts ($p= 0.0034$) in D1 and with leukocytes ($p=0,037$) and neutrophils counts ($p= 0.0008$) in D7. The *NQO1* gene polymorphism presence was associated with BM infiltration at D28 ($p= 0.0410$) and the presence of blasts in the CSF ($p= 0.0410$). However, the *NQO1* polymorphism was associated with the presence of pallor ($p=0.0096$). Result described here corroborated in part with previous described data, being necessary to carry out additional study with a larger number of patients to confirm the finding related to genes polymorphism investigated and the clinical evolution of ALL patients.

Keywords: childhood acute lymphoblastic leukemia; gene polymorphisms; Glutathione S-transferase (*GSTT1* and *GSTM1* genes); NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*); Cytochrome P450 (*CYP2E1*), and Myeloperoxidase (*MPO*).

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1. Classificação da OMS para os tumores dos tecidos linfóides e hematopoiéticos	21
Quadro 2. Principais grupos de drogas utilizadas atualmente no tratamento de leucemias	22
Figura 1: Sequência dos efeitos biológicos ocorridos nas reações de biotransformação dos xenobióticos	24
Figura 2: Etapas do estudo	39
Figura 3. Distribuição e análise dos valores dos parâmetros hematológicos nos D1, D7 e D14: A) Contagem de linfócitos; B) Segmentados neutrófilos; C) Leucócitos e D) Blastos periféricos.	44
Figura 4. Distribuição e análise dos valores dos parâmetros hematológicos nos D1, D7 e D14: A) Contagem de hemácias; B) Concentração de hemoglobina; C) Contagem absoluta de monócitos e D) Contagem de plaquetas.....	45
Figura 5. Distribuição e análise das contagens globais de blastos na medula óssea nos D1, D15 e D28	46
Figura 6. Correlação entre palidez e polimorfismo do gene <i>NQQ1</i>	48
Figura 7. Distribuição e análise da presença de blastos no líquido e na medula óssea nos D1, D15 e D28: A) infiltração de blastos na MO e o polimorfismo no gene <i>NQQ1</i> ; B) infiltrado da MO e o polimorfismo no gene <i>MPO</i> ; C) líquido no D1 e polimorfismo no gene <i>NQQ1</i> e; D) líquido no D1 e polimorfismo no gene <i>MPO</i>	49

Figura 8. Distribuição e análise dos valores dos parâmetros hematológicos nos D1 e D7 e polimorfismo do gene *GSTT1*: A) Contagem de leucócitos no D1 e polimorfismo do gene *GSTT1*; B) Contagem de plaquetas D1 e polimorfismo do gene *GSTT1*; C) Contagem de leucócitos no D7 e polimorfismo do gene *GSTT1*; D) Contagem de neutrófilos segmentados no D7 e polimorfismo do gene *GSTT1*..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos polimorfismos gênicos investigados	36
Tabela 2. Primers e condições dos PCR's utilizados para determinar os polimorfismos gênicos.....	37
Tabela 3. Tamanho dos fragmentos gênicos gerados após o corte com enzimas de restrição	37
Tabela 4. Características demográficas e clínicas dos pacientes com LLA.....	42
Tabela 5. Sinais e sintomas dos pacientes com LLA ao diagnóstico	42
Tabela 6. Distribuição dos genótipos <i>CYP 2e1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>NQO1</i> e <i>MPO</i>	47
Tabela 7. Distribuição dos valores médios dos parâmetros hematológicos nos diferentes genótipos para os genes <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> apresentados pelos pacientes com LLA-B	50
Tabela 8. Distribuição dos valores médios dos parâmetros hematológicos nos diferentes genótipos para o gene <i>CYP2E1</i> apresentados pelos pacientes com LLA-B	51
Tabela 9. Distribuição dos valores médios dos parâmetros hematológicos nos diferentes genótipos para o gene <i>NQQ1</i> apresentados pelos pacientes com LLA-B	52
Tabela 10. Distribuição dos valores médios dos parâmetros hematológicos nos diferentes genótipos para o gene <i>MPO</i> apresentados pelos pacientes com LLA-B.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

CPqGM - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

CYP1A1 – Gene Citocromo P450, família 1, membro A1

CYP2 - Gene Citocromo P450, família 2

CYP2e1 - Gene Citocromo P450, família 2, membro e1

CYP450 – Citocromo P450

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

d’NTP - desoxinucleosídeos trifosfato

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético sódico

EUA – Estados Unidos da América

FAB – Franco-Americano-Britânico

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GBTLI-LLA 93 – Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias na Infância –
Leucemia Linfóide Aguda 93

GSTA – Gene da glutatona S-transferase alfa

GSTK - Gene da glutatona S-transferase kappa

GSTM - Gene da glutatona S-transferase mi

GSTO - Gene da glutatona S-transferase ômega

GSTP - Gene da glutatona S-transferase pi

GSTs - Glutatona S-transferases

GSTS - Gene da glutatona S-transferase sigma

GSTT - Gene da glutatona S-transferase theta

GSTZ - Gene da glutatona S-transferase zeta

IC – Intervalo de confiança

INCA- Instituto Nacional do Câncer

IPERBA - Instituto de Perinatologia da Bahia

LA – Leucemia Aguda

LLA – Leucemia Linfocítica Aguda

LLA –B - Leucemia Linfocítica Aguda B

LLA-T - Leucemia Linfocítica Aguda T

LLC – Leucemia Linfocítica Crônica

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

LPBM – Laboratório de Patologia e Biologia Molecular

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

MMP9 - Metaloproteinase da Matriz 9

MO - Medula óssea

MPO- Gene da mieloperoxidase

NQQ1 - Gene NAD(P)H quinona oxidorreductase 1

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONCO - Sociedade de Oncologia da Bahia Ltda.

PCR - Reação da polimerase em cadeia (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

RFLP - Polimorfismos de tamanho de Fragmento de Restrição (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNA - Ácido Ribonucléico

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RP - Razão de Prevalência

SNC - Sistema Nervoso Central

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

α – alfa

μ – mi

π - pi

θ - theta

z – zeta

σ – sigma

w – ômega

k - kappa

SUMÁRIO (ÍNDICE)

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SIMBOLOS

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. LEUCEMIAS: ASPECTOS GERAIS.....	18
1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS.....	19
1.3. EPIDEMIOLOGIA.....	20
1.4. TRATAMENTO DAS LEUCEMIAS.....	22
1.5. METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS E POLIMORFISMOS GÊNICOS.....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. CAUÍSTICA E MÉTODOS	33
4.1 CASUÍSTICA.....	34
4.2 MÉTODOS	35
4.2.1 COLETA DE AMOSTRAS	35
4.2.2 ANÁLISE MOLECULAR	36
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL	39
5. RESULTADOS	40
5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM LLA	41

5.2 DADOS HEMATOLÓGICOS DOS PACIENTES LLA-B	43
5.3 DISTRIBUIÇÕES DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DA <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>CYP2E1</i> , <i>NQO1</i> E <i>MPO</i>	47
5.4 DADOS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS E POLIMORFISMOS NOS GENES DA <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>CYP2E1</i> , <i>NQO1</i> E <i>MPO</i>	48
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÕES.....	68
8. REFERÊNCIAS	70
ANEXOS.....	77
APÊNDICES.....	79

1. Introdução

1.1. LEUCEMIAS: ASPECTOS GERAIS

As leucemias constituem um grupo heterogêneo de malignidades hematopoiéticas, que incluem subgrupos diversos e biologicamente distintos (COLE & RODU, 2001).

As leucemias agudas têm início abrupto e caracterizam-se pela parada de maturação das células precursoras, resultando em acúmulo maciço das células blásticas. Em contraste, as leucemias crônicas têm início insidioso e decorrem da expansão excessiva de determinado tipo de células diferenciadas, muitas vezes em consequência de disfunções no mecanismo apoptótico (ZAGO *et al.*, 2005).

As leucemias linfocíticas agudas são caracterizadas pela proliferação e o acúmulo de linfoblastos na medula óssea com supressão da hematopoese normal, sendo comum o aparecimento de anemia, neutropenia e plaquetopenia. Além disso, a infiltração celular extramedular contribui para a ocorrência de esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, podendo o paciente apresentar também o comprometimento de meninges, gônadas e sistema nervoso central (SNC) (FALCÃO & REGO, 2004). Nas leucemias linfocíticas crônicas, os pacientes podem ser assintomáticos ou apresentar curso clínico indolente podendo ser acompanhados ambulatorialmente (YAMAMOTO & FIGUEIREDO, 2005).

As leucemias mielóides agudas (LMA) são caracterizadas pela presença de um clone neoplásico que suprime a multiplicação e a diferenciação das linhagens celulares normais, levando habitualmente à anemia, neutropenia e plaquetopenia, que podem ser reversíveis (FALCÃO & REGO, 2004).

A origem da leucemia linfocítica aguda (LLA), o câncer mais comum em idade pediátrica, é bastante complexa, podendo ser explicada por uma

combinação de fatores genéticos e exposição ambiental (KRAJINOVIC *et al.*, 2001) a xenobióticos, que são substâncias químicas estranhas ao sistema biológico e incluem os compostos naturais, drogas, agentes ambientais e agentes cancerígenos (TASPINAR *et al.*, 2008).

1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS

De acordo com a classificação atual das leucemias, tanto as leucemias agudas quanto as crônicas são subdivididas em linfóides e mielóides com base na linhagem celular comprometida (ZAGO *et al.*, 2005).

A era moderna para a classificação de leucemias agudas iniciou em 1976, quando surgiram duas propostas. Uma delas foi publicada pelo grupo cooperativo de hematologistas e hematopatologistas da França, Estados Unidos da América (EUA) e Grã-Bretanha e foi designada classificação Franco-Americano-Britânico (FAB). A classificação FAB foi inicialmente baseada nos aspectos morfológicos e citoquímicos e, posteriormente, passou a adotar critérios imunofenotípicos (FARIAS *et al.*, 2007). De acordo com esta classificação, as leucemias agudas estão divididas em Leucemia Mielóide Aguda (LMA M0 à M7) e Leucemia Linfocítica Aguda (LLA- L1, L2 e L3).

O termo leucemias crônicas abrange a Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) e a Leucemia Mielóide Crônica (LMC) (COLE & RODU, 2001), que incluem a LMC clássica, com cromossomo *Philadelphia*⁺, Leucemia Neutrófila Crônica, Leucemia Eosinofílica Crônica, Leucemia Mielomonocítica Juvenil e a Leucemia Mielomonocítica Crônica (FALCÃO & REGO, 2004).

Atualmente a proposta da Organização Mundial de Saúde (OMS), que foi publicada em 2001 e revisada em 2008 (WEINBERG, 2009), classifica os tumores dos tecidos linfóides e hematopoiéticos, tendo como base os dados

citogenéticos e moleculares associando-os aos critérios clínicos, fato que torna as anormalidades cromossômicas pontos importantes na classificação, diagnóstico e tratamento das leucemias agudas (FARIAS *et al.*, 2007) (**Quadro 1**).

1.3. EPIDEMIOLOGIA

As leucemias correspondem ao tipo de câncer mundialmente mais frequente em crianças e adolescentes (PUI *et al.*, 2001) O estudo europeu de STELIAROVA-FOUCHER e cols. (2004) coloca as leucemias como as neoplasias mais frequentes em crianças, sendo seguidas pelos tumores de SNC e linfomas.

Nos EUA, no período de 2001 e 2003, as leucemias corresponderam a 26,3% de todos os tumores infantis, seguidos pelos tumores de SNC (17,6%) e linfomas (14,6%) (LI *et al.*, 2008). Em 2010, estimou-se que 24.690 homens e 18.360 mulheres seriam diagnosticados com leucemia e 21.840 iriam a óbito no mesmo ano (SEER Câncer, 2010).

No Brasil, estima-se para o ano de 2012 o surgimento de 8.510 casos novos de leucemias, ocupando, entre os tipos de neoplasias mais incidentes, a 8ª e 10ª posições em homens e mulheres, respectivamente, na região Nordeste. No estado da Bahia, a estimativa abrange 420 casos novos, sendo 110 na cidade de Salvador, no ano de 2012 (INCA – estimativas, 2012).

Quadro 1. Classificação da OMS para os tumores dos tecidos linfóides e hematopoiéticos

Doenças mieloproliferativas crônicas
leucemia mielóide crônica
leucemia neutrofílica crônica
leucemia eosinofílica crônica (síndrome hipereosinofílica)
Doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas
leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)
leucemia mielóide crônica atípica
leucemia mielomonocítica juvenil
Leucemias mielóides agudas
leucemia mielóide aguda minimamente diferenciada
leucemia mielóide aguda sem maturação
leucemia mielóide aguda com maturação
leucemia mielomonocítica aguda
leucemias monoblástica e monocítica agudas
leucemia eritróide aguda
leucemia megacarioblástica aguda
leucemia basofílica aguda
Leucemias agudas de linhagem ambígua
leucemia mielóide aguda (LMA)
LMA com anomalias citogenéticas recorrentes
LMA com translocação (8;21) (q22; q22), (LMA1/ETO)
LMA com inversão (16) (p13 q22) ou t (16;16) (p13; q22), (CBFb/MYH11)
leucemia promielocítica aguda (LMA com t(15;17) (q22; q12), PML/RAR α)
LMA com anomalias (11q23) (MLL)
LMA com displasia multilinear com e sem síndrome mielodisplásica progressa
Neoplasias de células linfóides B precursoras
leucemia linfoblástica de precursor B
Neoplasias de células linfóides B maduras
leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico
leucemia prolinfocítica B
Neoplasias de células linfóides T e Natural Killer (NK) precursoras
leucemia linfoblástica de precursor T
Neoplasias de células T e NK maduras
leucemia prolinfocítica T
leucemia linfocítica de grandes células T granulares
leucemia agressiva de células NK
leucemia/linfoma de células T do adulto (HTLV1 +)
Mastocitoses
leucemia mastocítica

1.4. TRATAMENTO DAS LEUCEMIAS

As leucemias agudas estão associadas a taxas elevadas de morbimortalidade, com tratamento realizado por protocolos complexos, constituídos de combinações de drogas, transfusões e internações, gerando custos clínicos assistenciais elevados (BOING *et al.*, 2007). A capacidade das células neoplásicas em evitar a apoptose e sua resistência aos agentes antineoplásicos ainda são considerados como as principais causas de fracasso nos tratamentos (KOSCHEK *et al.*, 2007). A maioria das drogas utilizadas atualmente age de forma citotóxica e/ou citostática, com ação na replicação do DNA, transcrição de RNA, síntese e ciclo celular e pertencem às mais variadas classes de quimioterápicos (**Quadro 2**).

Quadro2. Principais grupos de drogas utilizadas atualmente no tratamento de leucemias

DROGA	FUNÇÃO	REFERÊNCIA
Alquilantes	promove a alquilação do DNA no interior do núcleo levando à morte celular	CHU & SARTORELLI, 2005
Antimetabólitos	competem com os metabólitos necessários para as reações bioquímicas, inibindo as funções normais da célula	CHABNER <i>et al.</i> , 2006
Antitubulínicos	inibem a formação dos microtúbulos com manutenção da célula em metáfase e indução da apoptose	CHABNER <i>et al.</i> , 2006
Inibidores da Topoisomerase I e II	lesam o DNA pela inibição da ligação covalente entre as moléculas	CHABNER <i>et al.</i> , 2006
Antibióticos antitumorais	bloqueiam a síntese de DNA e/ou RNA provocando ruptura das fitas; ligam-se as membranas celulares alterando sua fluidez e transporte produzindo radicais livres	CHU & SARTORELLI, 2005 CHABNER <i>et al.</i> , 2006
Estimulantes da diferenciação celular	reduzem a hematopoese policlonal	CHABNER <i>et al.</i> , 2006
Hormônios	atuam no DNA como agonistas ou antagonistas do crescimento celular	CHU & SARTORELLI, 2005
Anticorpos monoclonais	induzem apoptose; citotoxicidade anticorpo-dependente; citotoxicidade complemento-dependente.	CHABNER <i>et al.</i> , 2006
Agentes enzimáticos	agem como inibidores de vias de sinalização em genes específicos; inibem a síntese de proteínas.	CHU & SARTORELLI, 2005

1.5. METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS E POLIMORFISMOS GÊNICOS

Xenobióticos são substâncias químicas que são estranhas ao sistema biológico, incluindo os compostos naturais, drogas, agentes ambientais e agentes cancerígenos. Os efeitos adversos de xenobióticos são exercidos por meio de interações covalentes entre metabólitos intermediários e o material genético ou proteínas (TASPINAR *et al.*, 2008).

Todos os organismos são constantemente expostos a xenobióticos diferentes, tais como produtos químicos industriais, pesticidas e poluentes, produtos de pirólise em alimentos cozidos, alcalóides, metabólitos secundários de plantas, toxinas produzidas por outros organismos e medicamentos diversos (GRA *et al.*, 2010). As crianças podem ser, particularmente, vulneráveis às toxinas ambientais devido ao metabolismo ainda imaturo, taxa maior de divisão celular e crescimento (KRAJINOVIC *et al.*, 2002).

As reações enzimáticas necessárias ao metabolismo dos xenobióticos lipofílicos com a finalidade de evitar o acúmulo destes nas células e tecidos podem ser divididas em duas fases distintas (TASPINAR *et al.*, 2008). Os tóxicos ambientais a que um indivíduo é exposto são biotransformados e eliminados do organismo após a conversão metabólica mediada por enzimas de fase I, que catalisam reações de hidroxilação, redução e oxidação de xenobióticos, com conversão em compostos mais ativos ou tóxicos; e enzimas de fase II, que catalisam reações de conjugação (glucuronidação, acetilação, metilação), com conversão dos metabólitos em produtos não-reativos e solúveis em água, que são eliminados mais facilmente do organismo (KRAJINOVIC *et al.*, 2001).

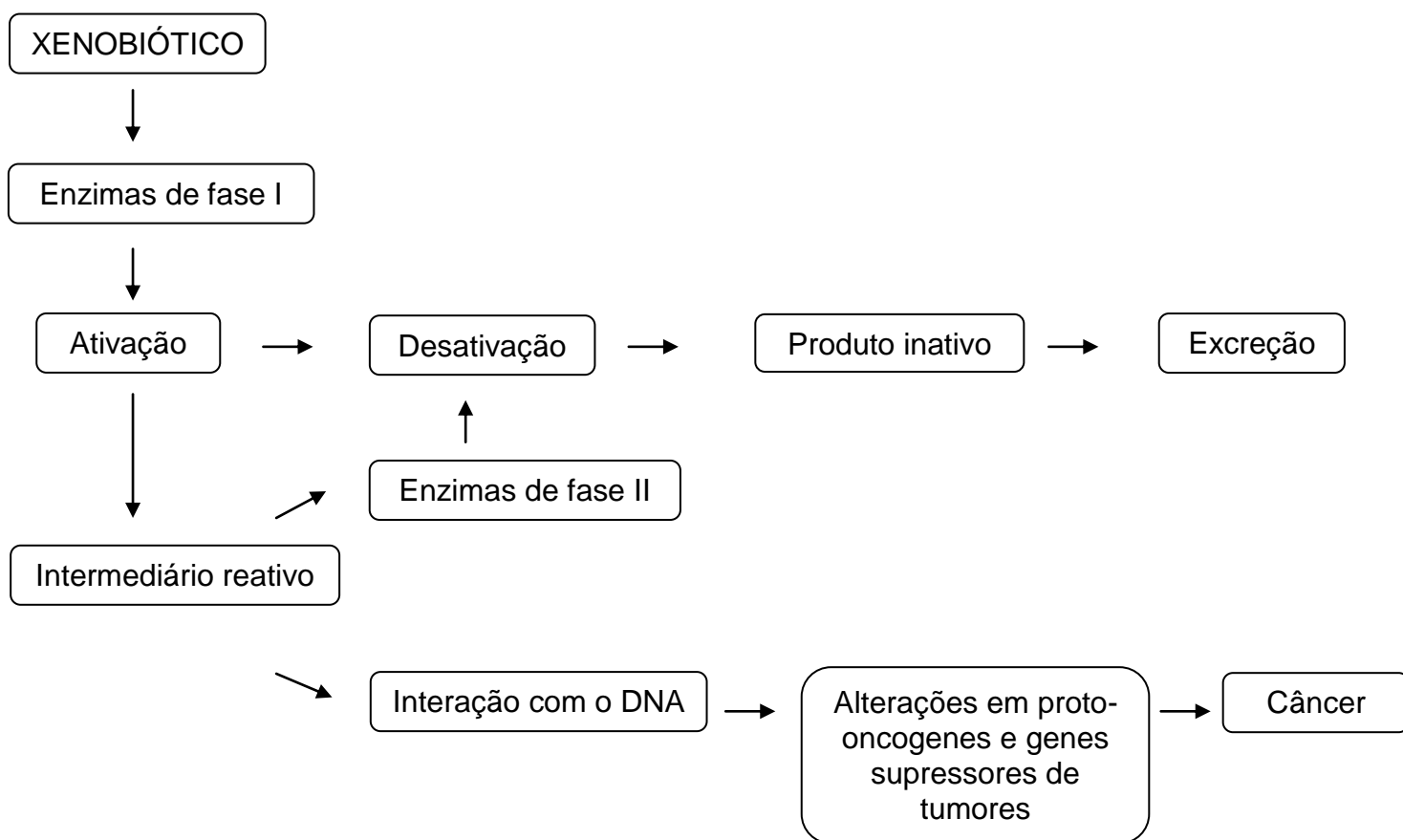


Figura 1: Sequência dos efeitos biológicos ocorridos nas reações de biotransformação dos xenobióticos.

Adaptado de: Losi-Guembarovski & Cólus, 2001

Os polimorfismos gênicos em enzimas que metabolizam xenobióticos têm sido postulados como relevantes na patogênese de algumas neoplasias, como a LLA (VIJAYAKRISHNAN & HOULSTON, 2010). A atividade dessas enzimas pode sofrer alteração em decorrência de inserções/deleções, polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP's) e variações no número de cópias gênicas com risco maior de reações adversas a medicamentos e ocorrência de algumas doenças, incluindo o câncer (GRA *et al.*, 2010).

A família de genes do *citocromo P450* (CYP450) catalisa a fase I do metabolismo e está envolvida na detoxificação de uma variedade ampla de

xenobióticos, como os carcinógenos ambientais, agentes quimioterápicos e de espécies reativas de oxigênio. O gene *CYP1A1* é polimórfico e codifica a enzima CYP1A1 e catalisa a bioativação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (TASPINAR *et al.*, 2008). Os membros da família *CYP2* metabolizam a maioria dos fármacos utilizados na prática clínica e são conhecidos por serem responsáveis por reações adversas a medicamentos (GRA *et al.*, 2010).

As enzimas CYP1 e CYP2 ativam os xenobióticos, transformando-os em metabólitos intermediários altamente ativos. Estes metabólitos genotóxicos gerados são substratos para a biotransformação subsequente mediada por enzimas de fase II, como a NAD(P)H: quinona oxidorreductase 1 (NQO1) e glutathione S-transferases (GSTs) (GRA *et al.*, 2010), responsáveis pela conjugação de glutathione ou glicuronídeo com eletrófilos reativos (TASPINAR *et al.*, 2008). Além disso, a enzima CYP2e1 reduz efetivamente a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) contribuindo, assim, para a peroxidação lipídica e estresse oxidativo (KRAJINOVIC *et al.*, 2002).

As Glutathione S-transferases (GSTs) são enzimas expressas em tecidos de mamíferos e têm ampla especificidade de substrato. São divididas em oito classes gênicas que codificam enzimas citosólicas e genes microsossomais: alfa (α) (*GSTA*), mi (μ) (*GSTM*), pi (π) (*GSTP*), theta (θ) (*GSTT*), zeta (ζ) (*GSTZ*), sigma (σ) (*GSTS*), ômega (ω) (*GSTO*) e kappa (κ) (*GSTK*) (PALODETTO *et al.*, 2010). Os genes que codificam as GSTs são altamente polimórficos e estão envolvidos no metabolismo de inúmeros xenobióticos, como os carcinógenos ambientais, agentes quimioterápicos e ROS. Em humanos, duas dessas subclasses, a *GSTM1* e a *GSTT1*, apresentam variabilidade genética bastante

discutida na literatura. As frequências dos alelos polimórficos GSTs, em especial o *GSTT1* e o *GSTM1* foram associadas a vários tipos de câncer (TASPINAR *et.al.*, 2008). Os homozigotos para alelos nulos (supressão) de *GSTM1* e *GSTT1* têm ausência de atividade da enzima respectiva e não conjugam metabólitos ou toxinas específicas para essas enzimas. Diversos estudos mostram que a formação de adutos de DNA e as taxas de mutação somática estão aumentadas nesses indivíduos (VIJAYAKRISHNAN & HOULSTON, 2010). Dessa forma, os polimorfismos em genes GSTs poderiam constituir fatores que afetam a toxicidade induzida por drogas (IMANISHI *et al.*, 2007).

A enzima de detoxificação quinona oxido-redutase (NQO1) é amplamente expressa na fase II e está envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo e irradiação, com a função de proteger as células contra a mutagenicidade de radicais livres de oxigênio e metabólitos tóxicos (GRA *et al.*, 2010). Dado o papel de NQO1, os indivíduos que possuem diminuição ou nenhuma atividade da enzima seriam mais suscetíveis aos efeitos tóxicos e carcinogênicos de quinonas e compostos nitroaromáticos (KRAJINOVIC *et al.*, 2002). Mutações no gene *NQO1* que codifica a quinona oxido-redutase têm sido descritas, sendo que o polimorfismo NQO1*2 C609T, leva à substituição do aminoácido P187S, o que causa uma perda completa da atividade enzimática (BARRAGAN *et al.*, 2006).

Outra enzima envolvida no controle do estresse oxidativo é a mieloperoxidase (MPO). A MPO é uma enzima lisossomal altamente expressa em células da medula óssea. Ela ativa substâncias cancerígenas do fumo do tabaco, como o benzopireno e aminas aromáticas, para intermediários

altamente reativos e contribui para o estresse oxidativo, catalisando a formação de radicais livres. A mutação de -463 G > A presente na região promotora pode alterar a expressão do gene da *MPO*, anulando o sítio de ligação do fator de transcrição SP1. Recentemente, foi relatado que a transcrição maior do alelo comum do gene *MPO* estava associada ao risco de leucemia em adultos com o câncer de pulmão e alguns distúrbios neurológicos (KRAJINOVIC *et al*, 2002).

2. Justificativa

Há evidências crescentes de que a predisposição para leucemia aguda está associada à exposição a produtos químicos, como benzeno e agentes quimioterápicos. As enzimas envolvidas no metabolismo dessas substâncias cancerígenas têm sido estudadas como fatores de risco potenciais para o desenvolvimento da doença (YE *et al.*, 2005). Os genes que codificam enzimas do metabolismo de carcinógenos, enzimas do metabolismo do ácido fólico e proteínas de reparo do DNA, entre outros, têm sido avaliados como genes de susceptibilidade para a LLA na infância (VIJAYAKRISHNAN & HOULSTON, 2010).

As enzimas metabolizadoras de xenobióticos são responsáveis pelo metabolismo de drogas, incluindo quimioterápicos, como agentes alquilantes, agentes intercalantes e antraciclinas (BARRAGAN *et al.*, 2006); portanto, essas enzimas podem desempenhar papel importante na determinação da suscetibilidade aos efeitos tóxicos dos produtos químicos, e também podem influenciar a resposta do tumor às drogas anticâncer (HAN *et al.*, 2010). Muitas dessas enzimas são geneticamente polimórficas e esses polimorfismos podem determinar variações nas respectivas atividades enzimáticas, com modificação da resposta ao tratamento, resistência ou toxicidade relacionada a droga (BARRAGAN *et al.*, 2006).

Inúmeros polimorfismos nos genes *CYP* e *GST* têm sido associados com a ausência ou diminuição da atividade enzimática. Alguns estudos tem associado a presença destes polimorfismos gênicos e alteração na capacidade das respectivas enzimas em metabolizar produtos químicos cancerígenos e mutagênicos, fato que pode influenciar na susceptibilidade dos indivíduos ao câncer (TASPINAR *et al.*, 2008).

Polimorfismos no gene *CYP1A1* têm sido extensivamente estudados, especialmente em relação à suscetibilidade ao câncer. O aumento da atividade enzimática está associada ao nível maior de formação de DNA-aduto e aumento dos riscos para determinados tipos de cânceres, incluindo as leucemias (TASPINAR *et al.*, 2008). Outras variantes genéticas metabólicas que têm sido investigadas como fatores de risco para LLA incluem polimorfismos nos genes *NQO1*, NAD(P)H: quinona oxidoreductase, uma enzima citosólica que catalisa a redução de quinonas e previne a sua participação no ciclo redox e, portanto, no estresse oxidativo. (VIJAYAKRISHNAN & HOULSTON, 2010). Outro gene envolvido no estresse oxidativo e que já foi associado ao risco aumentado de leucemia em adultos é o da *MPO* (KRAJINOVIC *et al.*, 2002).

Os polimorfismos nos genes das *GSTs* (*GSTM1*, *GSTP1* e *GSTT1*) foram descritos como fatores de risco para a leucemia aguda por BASU e cols. (1997) e por CHEN e cols. (1997). Desde então, vários estudos têm confirmado ou refutado associação entre os polimorfismos no gene *GST* e o risco de leucemia aguda (YE *et al.*, 2005).

Desta forma, será importante a investigação das frequências em genes associados ao metabolismo de xenobióticos e ao estresse oxidativo, uma vez que as frequências alélicas e gênicas variam nas diferentes populações. Além disso, a investigação desses marcadores em um grupo de crianças com LLA infantil de Salvador – BA poderá trazer conhecimentos relativos a associação desses polimorfismos gênicos com a evolução clínica desses indivíduos e com a resposta terapêutica.

3. Objetivos

3.1. OBJETIVO GERAL

- Determinar as frequências dos polimorfismos em genes *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2E1*, *NQO1* e *MPO*, comumente relacionados ao estresse oxidativo e metabolismo de xenobióticos, em pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda, associando-as aos aspectos clínicos e com marcadores de prognóstico da evolução da doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar a frequência dos polimorfismos gênicos nos pacientes com LLA;

3.2.2 Identificar associações entre os polimorfismos e marcadores de evolução da LLA.

4. Casuística e Métodos

4.1. CASUÍSTICA

Foi realizado um estudo de Coorte Prospectiva envolvendo 37 pacientes pediátricos com LLA da infância, originários de diversas cidades do interior do Estado da Bahia além da capital, Salvador, entre os anos de 2006 e 2010. A amostra do estudo foi constituída por 37 pacientes com o diagnóstico de LLA (33 com LLA-B e quatro com LLA-T), sendo 15 (40,5%) do sexo feminino e 22 (59,5%) do masculino. Todos os pacientes foram atendidos na clínica ONCO – Sociedade de Oncologia da Bahia Ltda., localizada em Salvador, e tratados de acordo o protocolo terapêutico GBTLI-LLA. Desta forma, trabalhou-se com uma amostra de conveniência, razão pela qual não foi realizado o cálculo amostral.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM – FIOCRUZ), protocolo nº 58. Os responsáveis legais pelos pacientes incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1), após a explicação dos objetivos da pesquisa.

Os pacientes incluídos no estudo foram menores de 19 anos e tiveram o diagnóstico confirmado de LLA. Os pacientes eram provenientes de diversas cidades do estado da Bahia.

Os pacientes que não tiveram o TCLE assinado pelos seus responsáveis foram excluídos do estudo, bem como os indivíduos maiores de 19 anos, ou que possuíam outro tipo de neoplasia hematológica.

Os experimentos realizados seguiram as normas de Biossegurança de acordo com a Lei no. 11.105 de 24 de março de 2005, regulamentada pelo decreto nº 5.591 de 22 de novembro de 2005, seguindo as normas técnicas do

manual de procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na Fiocruz (CTBio- FIOCRUZ, 2005).

As amostras coletadas foram encaminhadas aos Laboratórios de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFBA e de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do CPqGM-FIOCRUZ para realização da Reação da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) e do Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP), respectivamente. As determinações do perfil hematológico e imunofenotípico foram realizadas em instituições conveniadas pela clínica ONCO, uma vez que a realização destes procedimentos faz parte do protocolo de diagnóstico e acompanhamento dos pacientes.

A investigação dos polimorfismos gênicos também foi desenvolvida em um grupo de 81 indivíduos saudáveis e provenientes do Instituto de Perinatologia da Bahia (IPERBA).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletados 5mL de sangue periférico em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético sódico), na concentração de 1,5 mg/mL (DACIE & LEWIS, 1984), em material estéril e descartável. As amostras de sangue e/ou medula óssea (MO) foram utilizadas para a extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico.

4.2.2. ANÁLISE MOLECULAR

Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído de leucócitos e das células da MO a partir de 200µL de sangue total ou de MO, respectivamente, utilizando-se o *Kit FlexiGene DNA Kit 250*[®] (Qiagen,USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a quantificação, as amostras foram armazenadas à -20°C até o momento das análises.

Determinação dos polimorfismos:

As análises dos polimorfismos genético *CYP2e1*, *NQO1* e *MPO* foram determinadas pela reação da polimerase em cadeia e do polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (PCR/RFLP). A análise do polimorfismo genético *GSTT1/GSTM1* foi determinada através da reação da polimerase em cadeia multiplex (PCR Multiplex). Os polimorfismos gênicos investigados, as condições das reações de PCR e o tamanho dos fragmentos após a digestão com as enzimas de restrição estão nas **tabelas 1, 2 e 3**, respectivamente.

Tabela 1: Descrição dos polimorfismos gênicos investigados.

Gene	Polimorfismo	Troca	Efeito	Método de detecção
<i>CYP2E1</i>	G-1293C/C-1053T	Nenhuma	Alteração da expressão	<i>RsaI</i> RFLP
<i>NQO1</i>	609C>T	P187S	Supressão da atividade	<i>HinfI</i> RFLP
<i>MPO</i>	-463G>A	Nenhuma	Alteração da expressão	<i>AccI</i> RFLP
<i>GSTT1</i>	Deleção	Nenhuma	Ausência de atividade	PCR alelo específico
<i>GSTM1</i>	Deleção	Nenhuma	Ausência de atividade	PCR alelo específico

Tabela 2: Primers e condições dos PCR's utilizados para determinar os polimorfismos gênicos.

Gene	Primers	Condições dos PCR's
<i>CYP2E1</i>	F-5' CCA-GTC-GAG-TCT-ACA-TTG-TCA 3' R-5' TTC-ATT-CTG-TCT-TCT-AAC-TGG 3'	100-200ng do DNA molde; tampão da Taq-1X; 100mM de MgCl ₂ ; 10 mM de d'NTPS; 12,5pMol de cada primer; 0,3U da enzima Taq polimerase 94°C por 10 minutos; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 56°C, 1 minuto a 72°C; e 10 minutos a 72°C
<i>NQO1</i>	F-5' TCC-TCA-GAG-TGG-CAT-TCT-GC 3' R-5' TCT-CCT-CAT-CCT-GTA-CCT-CT 3'	100-200ng do DNA molde; tampão da Taq-1X; 125mM de MgCl ₂ ; 10 mM de d'NTPS; 12,5pMol de cada primer; 0,3U da enzima Taq polimerase 94°C por 10 minutos; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 59°C, 1 minuto a 72°C; e 10 minutos a 72°C
<i>MPO</i>	F-5' CGG-TAT-AGG-CAC-ACA-ATG-GTG-AG 3' R-5' GCA-ATG-GTT-CAA-GCG-ATT-CTT-C 3'	100-200ng do DNA molde; tampão da Taq-1X; 100mM de MgCl ₂ ; 10 mM de d'NTPS; 6,25pMol de cada primer; 0,3U da enzima Taq polimerase 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 63°C, 1 minuto a 72°C; e 7 minutos a 72°C
<i>GSTT1</i> <i>GSTM1</i> <i>beta</i>	F-5' TTC-CTT-ACT-GGT-CCT-CAC-ATC-TC 3' R-5' TCA-CCG-GAT-CAT-GGC-CAG-CA 3' F-5' GAA-CTC-CCT-GAA-AAG-CTA-AAG-C 3' R-5' GTT-GGG-CTC-AAA-TAT-ACG-GTG-G 3' F-5' GCC-AAG-GAC-AGG-TAC-GGC-TGT-CAT-C 3' R-5' CCC-TTC-CTA-TGA-CAT-GAA-CTT-AAC-CAT 3'	100-200ng do DNA molde; tampão da Taq-1X; 125mM de MgCl ₂ ; 10 mM de d'NTPS; 12,5pMol de cada primer; 0,3U da enzima Taq polimerase 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C, 1 minuto a 72°C; e 10 minutos a 72°C

Tabela 3: Tamanho dos fragmentos gênicos gerados após o corte com enzimas de restrição.

Gene	Selvagem	Homozigoto mutante	Heterozigoto
<i>CYP2E1</i>	360 pb	410pb	410pb + 360pb
<i>NQO1</i>	195pb + 35pb	151pb + 44pb + 35pb	195pb + 151pb + 44pb + 35pb
<i>MPO</i>	169pb + 120pb + 61pb	289pb + 61pb	289pb + 169pb + 120pb + 61pb

Análise estatística: Os dados foram analisados pelos programas *Epi Info Windows*, versão 3.5.1 (CDC, USA), *STATA* versão 10 (USA) e *Graph Pad Prism* versão 5.0. As variáveis categóricas do presente estudo foram analisadas pelos testes qui-quadrado (χ^2) com significância (p) corrigida pelo *Yates*. O teste de *Fisher* foi realizado para valores menores que 4 em tabelas 2x2, quando foi calculado o razão de prevalência com intervalo de confiança de 95%. As variáveis numéricas foram associadas com as variáveis categóricas pelo teste paramétrico *ANOVA* (para aqueles com distribuição normal) e não paramétrico *Kruskal-Wallis* (sem distribuição normal). As análises das variáveis numéricas com distribuição normal foram realizadas pelo teste T independente e aquelas com distribuição não normal pelo teste de Mann-Whitney. As análises das variáveis numéricas obtidas em diferentes momentos e com distribuição normal foram analisadas pelo teste T-pareado. As correlações entre variáveis numéricas foram realizadas pelos testes de correlação de *Pearson* (distribuição normal) ou *Spearman* (sem distribuição normal). A distribuição de normalidade foi analisada pelo teste de *Kolmogorov-Sminov*. A significância estatística foi considerada para análises com $p < 0,05$.

4.3. DESENHO EXPERIMENTAL

A figura abaixo mostra de forma resumida as etapas do estudo.

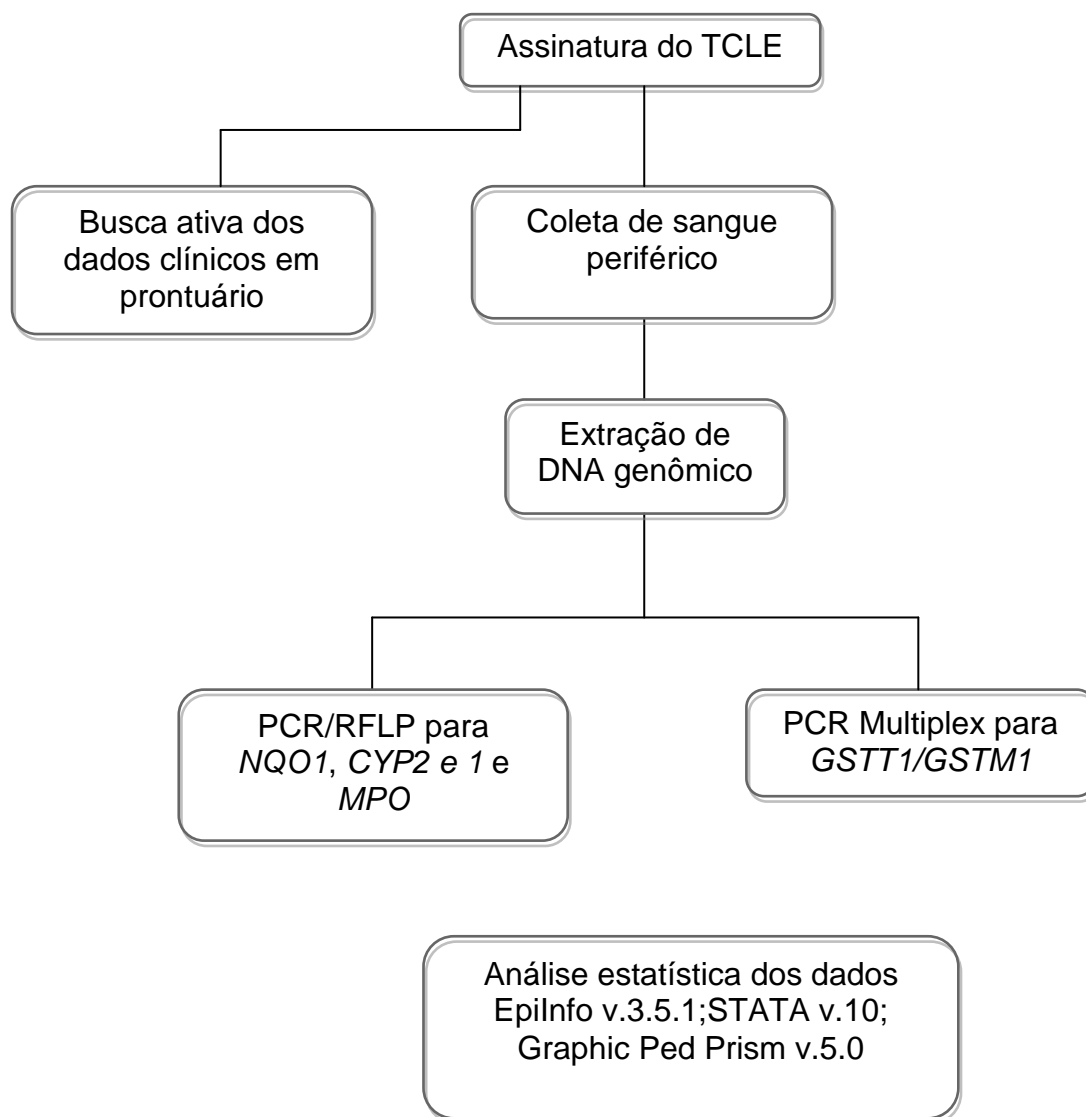


Figura 2: Etapas do estudo

5. Resultados

5.1. DADOS DEMOGRÁFICOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM LLA

Dos 37 pacientes com o diagnóstico de LLA, 15 (40,5%) foram do sexo feminino e 22 (59,5%) do masculino, com relação aproximada feminino:masculino de 1:1,47. A média de idade foi de $4,4 \pm 2,98$ anos (9 meses a 14 anos) para o grupo LLA-B e $6,0 \pm 2,30$ anos (4 a 8 anos) para o grupo LLA-T (**Tabela 4**).

De acordo a classificação imunológica, 33 (89,2%) pacientes foram classificados como LLA-B, quatro (10,8%) como LLA-T. Sete pacientes (18,9%) apresentaram aberrações fenotípicas caracterizadas pela expressão de marcadores mielóides (CD13 e CD33 positivos), sendo que quatro (10,8%) (três LLA-B e um LLA-T) apresentaram co-expressão dos dois marcadores (**Tabela 4**). Entre os pacientes com aberrações fenotípicas, seis eram do grupo LLA-B e 1 do LLA-T. Dois (5,4%) pacientes foram estadiados como Risco Básico Verdadeiro; 14 (37,8%) como Risco Básico e 21 (56,8%) como Alto Risco (**Tabela 4**). O tempo entre o surgimento dos sintomas até a ida ao serviço médico especializado foi de sete a 180 dias (**Tabela 4**).

Os sinais e sintomas mais frequentes ao diagnóstico foram hepatomegalia, esplenomegalia e linfonomegalia; seguidos por febre e palidez, dores articulares, petequias e equimoses, litíase renal e biliar (**Tabela 5**).

Tabela 4. Características demográficas e clínicas dos pacientes com LLA

CARACTERÍSTICAS	VALORES
Sexo, masculino / feminino (%)	22 (59,5) / 15 (40,5)
Relação masculino: feminino	1,47: 1
Idade, média / (limites)(+/-DP)	4,6 (9m – 14a)* (2,93)
Classificação da LLA – n (%)	
LLA B	33 (89,2)
LLA T	4 (10,8)
*LLA com aberração fenotípica	7 (18,9)
Tempo de sintomas (média dias) / limites	(38) / 7 – 180
Estadiamento – n (%)	
Alto Risco	21 (56,8)
Risco Básico	14 (37,8)
Risco Básico Verdadeiro	2 (5,4)

* m=meses; a=anos.

Tabela 5. Sinais e sintomas dos pacientes com LLA ao diagnóstico

SINAIS E SINTOMAS	PACIENTES	
	n	%
Hepatomegalia	23	62,2
Esplenomegalia	21	57,8
Linfonomegalia	21	57,8
Febre	11	29,7
Palidez	6	16,2
Dor em articulações	3	8,1
Petequias e equimoses	2	5,4
Litíase Renal	2	5,4
Litíase Biliar	1	2,7

Seis pacientes (cinco LLA-B e um LLA-T) apresentaram infiltração do SNC ao diagnóstico e todos foram classificados como de Alto Risco. Seis pacientes foram a óbito (cinco LLA-B e um LLA-T), sendo que cinco foram classificados como de Alto Risco e um de Risco Básico; nenhum destes pacientes apresentou infiltração do SNC.

Uma vez que a casuística deste estudo foi composta por indivíduos LLA-B, as análises subsequentes foram realizadas neste grupo de pacientes. Desta forma, as principais características exibidas pelos pacientes estão descritas nos apêndices 2 e 3 .

5.2. DADOS HEMATOLÓGICOS DOS PACIENTES LLA-B

O perfil hematológico dos pacientes foi investigado nos dias 1, 7 e 14 (D1, D7 e D14), sendo que o D1 registrou os valores ao diagnóstico e os D7 e D14 os valores referentes à evolução clínica e resposta ao tratamento.

A análise da contagem global de leucócitos demonstrou significância estatística quando comparados os valores obtidos nos D1 e D7 ($p= 0,0016$) e entre os D1 e D14 ($p= 0,0059$). Também foram encontradas diferenças estatísticas para a contagem de blastos periféricos nos D1 e D7 ($p< 0,0001$) e D1 e D14 ($p< 0,0001$); para as contagens absolutas de linfócitos nos D1 e D7 ($p= 0,0088$) e nos D1 e D14 ($p= 0,0101$) e para as contagens de segmentados neutrófilos nos D1 e D7 ($p= 0,0033$) e D1 e D14 ($p= 0,0252$) (**Figura 3**). Cumpre ressaltar que em todas as análises realizadas, os valores maiores foram sempre encontrados no D1. O mesmo não foi observado quando se realizou análises para outros parâmetros hematológicos, como contagem de

hemácias, monócitos e plaquetas e concentração de hemoglobina, nos mesmos dias (**Figura 4**).

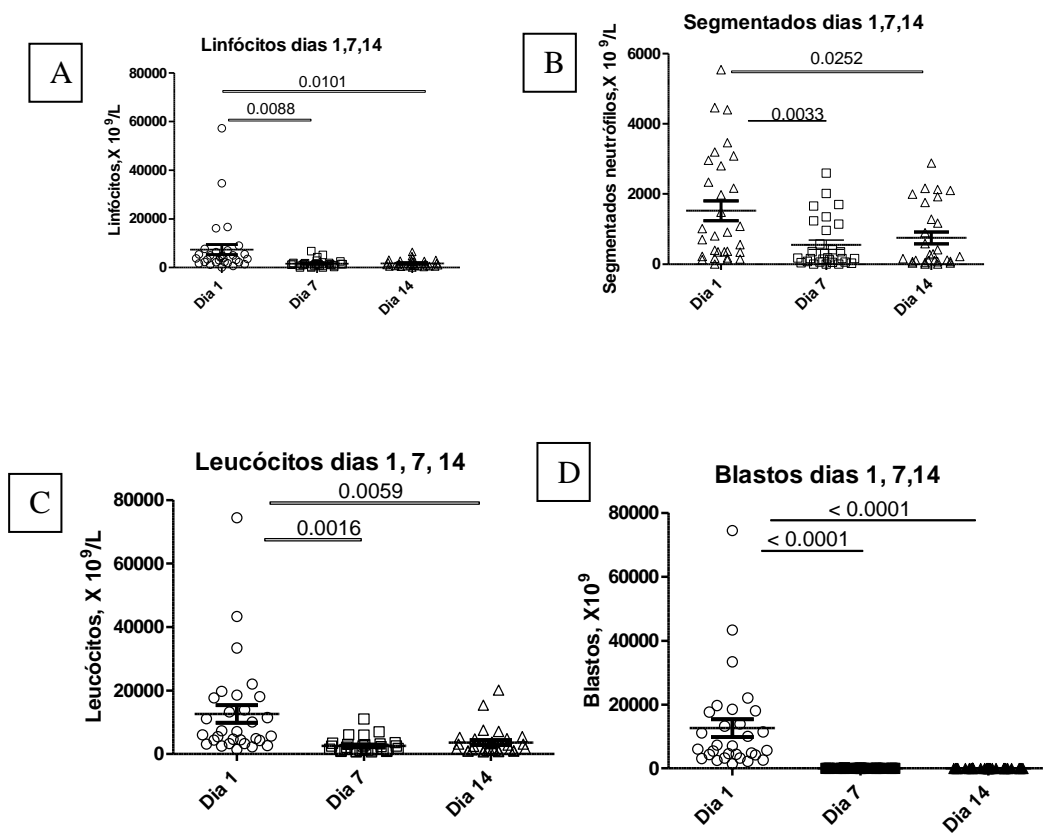


Figura 3. Distribuição e análise dos valores dos parâmetros hematológicos nos D1, D7 e D14:

A) Contagem de linfócitos; B) Segmentados neutrófilos; C) Leucócitos e D) Blastos periféricos.

Teste T pareado.

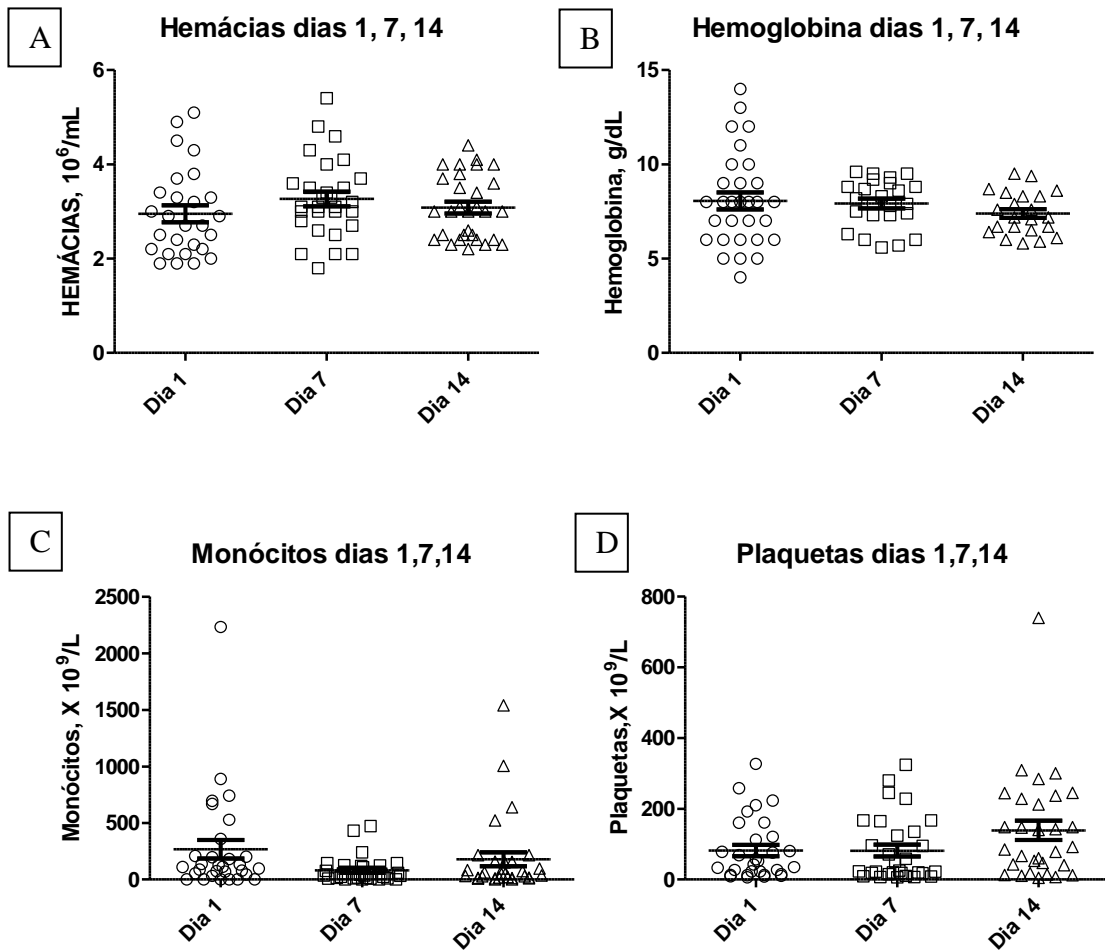


Figura 4. Distribuição e análise dos valores dos parâmetros hematológicos nos D1, D7 e D14: A) Contagem de hemácias; B) Concentração de hemoglobina; C) Contagem absoluta de monócitos e D) Contagem de plaquetas. Teste T pareado.

A análise dos blastos na MO mostrou diferença significativa entre as distribuições nos D1, D15 e D28, com valores maiores no D1 (**Figura 5**).

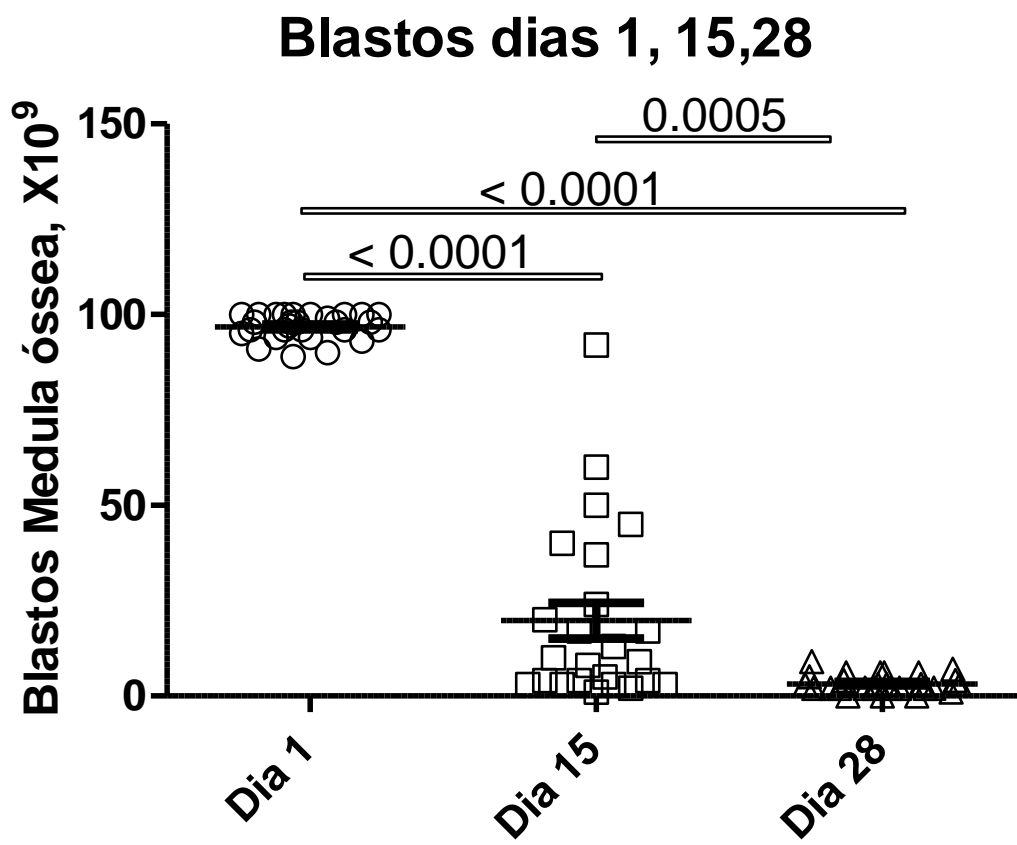


Figura 5. Distribuição e análise das contagens globais de blastos na medula óssea nos D1, D15 e D28. Teste T pareado.

5.3. DISTRIBUIÇÕES DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DA *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2E1*, *NQO1* E *MPO*.

Os dados de distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados estão na **Tabela 6**. Os pacientes e controles apresentaram frequências genóticas e alélicas semelhantes para os genes investigados e estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 6. Distribuição dos genótipos *CYP 2e1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *NQO1* e *MPO*.

<i>Loci</i>	Genótipos	N (%)	
		Pacientes	Controles
<i>CYP 2 e 1</i>	c1/c1	34 (89,5)	72 (88,9)
	c2/c1	4 (10,5)	9 (11,1)
	c2/c2	0	0
<i>GSTT1</i>	selvagem	29 (78,4)	62 (79,5)
	nulo	8 (21,6)	16 (20,5)
<i>GSTM1</i>	selvagem	24 (64,9)	53 (67,9)
	nulo	13 (35,1)	25 (32,1)
<i>NQO1</i>	CC	23 (60,5)	47 (58)
	CT	12 (31,6)	30 (37)
	TT	3 (7,9)	4 (4,9)
<i>MPO</i>	GG	24 (64,9)	40 (49,4)
	GA	11 (29,7)	31 (38,3)
	AA	2 (5,4)	10 (12,3)

5.4. DADOS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS E POLIMORFISMOS NOS GENES DA *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2E1*, *NQQ1* E *MPO*.

Os dados clínicos de febre, palidez, anemia, petéquias, equimose, hepatoesplenomegalia, inapetência, perda de peso, dor muscular, dor articular e fraqueza foram associados aos polimorfismos gênicos investigados, com descrição de significância estatística na análise entre o polimorfismo no gene *NQQ1* e a ocorrência de palidez ($p=0,0096$) (**Figura 6**)

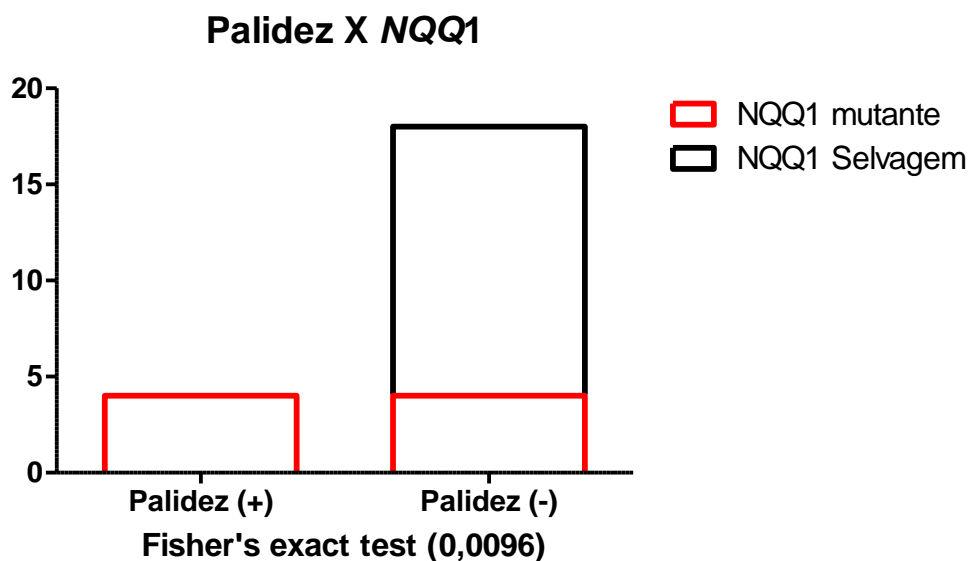


Figura 6. Relação entre palidez e polimorfismo do gene *NQQ1*

A medula óssea e o líquido dos pacientes foram examinados nos D1, D15 e D28 com o objetivo de determinar a presença ou ausência de blastos. Estes dados foram associados aos polimorfismos gênicos e foram descritas significâncias estatísticas para a infiltração de blastos na MO e o polimorfismo no gene *NQQ1* ($p= 0,0410$), infiltrado da MO e o polimorfismo no gene *MPO* ($p= 0,0473$), líquido no D1 e polimorfismo no gene *NQQ1* ($p= 0,0410$) e líquido no D1 e polimorfismo no gene *MPO* ($p= 0,0473$) (**Figura 7**).

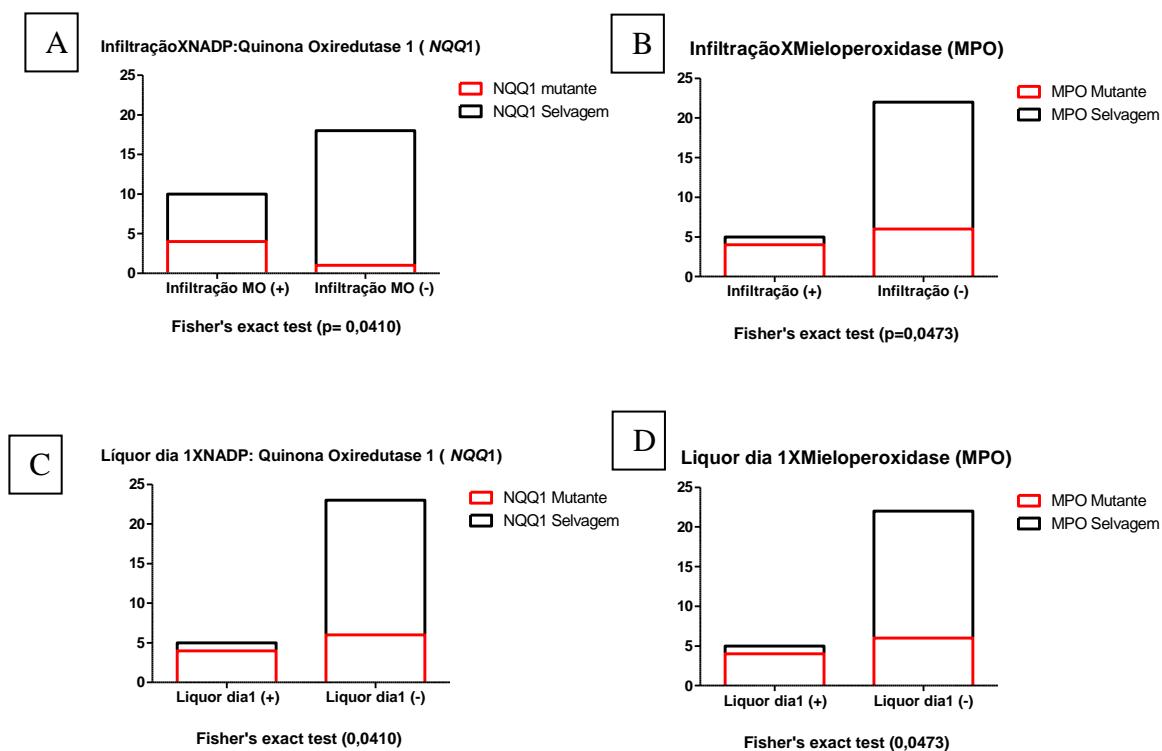


Figura 7. Distribuição e análise da presença de blastos no líquido e na medula óssea nos D1, D15 e D28: A) infiltração de blastos na MO e o polimorfismo no gene *NQQ1*; B) infiltrado da MO e o polimorfismo no gene *MPO*; C) líquido no D1 e polimorfismo no gene *NQQ1* e; D) líquido no D1 e polimorfismo no gene *MPO*

As **tabelas 7, 8, 9 e 10** mostram as médias, o erro padrão e valores de p para cada parâmetro hematológico e polimorfismo estudados.

Tabela 7. Distribuição dos valores médios dos parâmetros hematológicos nos diferentes genótipos para os genes *GSTT1* e *GSTM1* apresentados pelos pacientes com LLA-B.

		<i>GSTT1</i>			<i>GSTM1</i>		
		Selvagem	Nulo	<i>p</i> =	Selvagem	Nulo	<i>p</i> =
		Média ± EP	Média ± EP		Média ± EP	Média ± EP	
D1	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	2,88 ± 0,18	3,01 ± 0,70	0,880	2,83 ± 0,23	3,11 ± 0,27	0,512
	Hb (g/dl)	7,97 ± 0,44	7,21 ± 1,8	0,551	7,59 ± 0,54	8,56 ± 0,80	0,347
	Ht (%)	24,23 ± 1,35	20,97 ± 5,2	0,402	22,93 ± 1,69	25,9 ± 2,17	0,347
	Leuco (x10 ⁹ /L)	15210 ± 3621	5400 ± 598	0,267	16234 ± 4097	6827 ± 2149	0,189
	Seg (x10 ⁹ /L)	1546 ± 347	1295 ± 654	0,778	1691 ± 393	988 ± 347	0,326
	Linf (x10 ⁹ /L)	8773 ± 2691	3601 ± 658	0,438	9458 ± 3068	3862 ± 717	0,298
	Linf At (x10 ⁹ /L)	880 ± 1640	0 ± 0	0,301	912 ± 1763	285 ± 336	0,365
	Mono (x10 ⁹ /L)	315 ± 104	126 ± 34	0,465	325 ± 116	178 ± 96	0,482
	Blastos (x10 ⁹ /L)	2995 ± 1284	0 ± 0	0,348	2965 ± 1462	1367 ± 956	0,539
	Plaq (x10 ⁹ /L)	49 ± 62	204 ± 89	0,000	77 ± 23	62 ± 14	0,714
D7	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	3,16 ± 0,15	3,66 ± 0,77	0,293	3,4 ± 0,18	2,82 ± 0,31	0,137
	Hb (g/dl)	8,3 ± 0,35	9,62 ± 1,48	0,209	8,92 ± 0,42	7,37 ± 0,62	0,064
	Ht (%)	25,53 ± 1,17	28,48 ± 5,53	0,410	27,27 ± 1,46	22,49 ± 2,10	0,093
	Leuco (x10 ⁹ /L)	2048 ± 351	4642 ± 2171	0,039	2524 ± 587	2300 ± 649	0,833
	Seg (x10 ⁹ /L)	344 ± 95	2202 ± 1137	0,001	678 ± 283	451 ± 160	0,650
	Linf (x10 ⁹ /L)	1423 ± 311	2273 ± 992	0,325	1516 ± 379	1641 ± 453	0,860
	Linf At (x10 ⁹ /L)	41 ± 15	0 ± 0	0,350	30 ± 17	53 ± 25	0,491
	Mono (x10 ⁹ /L)	63 ± 20	111 ± 46	0,361	67 ± 23	78 ± 19	0,803
	Blastos (x10 ⁹ /L)	7 ± 6	0 ± 0	0,669	7 ± 7	1 ± 1	0,625
	Plaq (x10 ⁹ /L)	59 ± 16	115 ± 75	0,258	76 ± 23	43 ± 14	0,409
D14	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	3,03 ± 0,13	3,31 ± 0,51	0,473	3,04 ± 0,17	3,17 ± 0,23	0,695
	Hb (g/dl)	8,05 ± 0,35	8,75 ± 1,13	0,470	8,06 ± 0,41	8,41 ± 0,59	0,660
	Ht (%)	25,2 ± 1,28	25,53 ± 3,34	0,913	24,89 ± 1,37	26,09 ± 2,38	0,662
	Leuco (x10 ⁹ /L)	3835 ± 1058	2675 ± 841	0,653	3714 ± 1187	3500 ± 1072	0,919
	Seg (x10 ⁹ /L)	1500 ± 755	1499 ± 580	1,000	1707 ± 865	908 ± 343	0,598
	Linf (x10 ⁹ /L)	1753 ± 333	1073 ± 303	0,416	1449 ± 310	2231 ± 679	0,245
	Linf At (x10 ⁹ /L)	82 ± 228	0 ± 0	0,416	62 ± 230	93 ± 159	0,749
	Mono (x10 ⁹ /L)	211 ± 79	69 ± 17	0,470	197 ± 88	168 ± 83	0,853
	Blastos (x10 ⁹ /L)	11 ± 11	0 ± 0	0,685	12 ± 12	0 ± 0	0,564
	Plaq (x10 ⁹ /L)	133 ± 35	144 ± 57	0,901	133 ± 40	141 ± 45	0,914

EP=Erro padrão

Tabela 8. Distribuição dos valores médios dos parâmetros hematológicos nos diferentes genótipos para o gene *CYP 2E1* apresentados pelos pacientes com LLA-B.

		<i>CYP2E1</i>		
		Selvagem Média ± EP	Mutante Média ± EP	<i>p</i> =
D1	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	2,97 ± 0,20	3,18 ± 1,07	0,777
	Hb (g/dl)	7,98 ± 0,48	8,76 ± 2,37	0,617
	Ht (%)	24,09 ± 1,50	26,56 ± 6,41	0,606
	Leuco (x10 ⁹ /L)	13727 ± 3379	10733 ± 4593	0,763
	Seg (x10 ⁹ /L)	1572 ± 330	1509 ± 737	0,950
	Linf (x10 ⁹ /L)	8094 ± 2500	5373 ± 1979	0,715
	Linf At (x10 ⁹ /L)	697 ± 1586	937 ± 943	0,802
	Mono (x10 ⁹ /L)	244 ± 91	568 ± 249	0,256
	Blastos (x10 ⁹ /L)	2496 ± 1185	2158 ± 2158	0,925
	Plaq (x10 ⁹ /L)	81 ± 18	33 ± 18	0,375
D7	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	3,3 ± 0,19	3,13 ± 0,31	0,760
	Hb (g/dl)	8,79 ± 0,41	7,36 ± 0,80	0,248
	Ht (%)	26,63 ± 1,38	24,2 ± 2,99	0,558
	Leuco (x10 ⁹ /L)	2600 ± 489	1600 ± 529	0,486
	Seg (x10 ⁹ /L)	692 ± 231	374 ± 296	0,646
	Linf (x10 ⁹ /L)	1618 ± 318	926 ± 479	0,470
	Linf At (x10 ⁹ /L)	34 ± 14	40 ± 40	0,909
	Mono (x10 ⁹ /L)	70 ± 19	60 ± 43	0,862
	Blastos (x10 ⁹ /L)	6 ± 6	0 ± 0	0,722
	Plaq (x10 ⁹ /L)	73 ± 19	48 ± 24	0,655
D14	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	3,05 ± 0,14	3,48 ± 0,27	0,327
	Hb (g/dl)	8,2 ± 0,36	8,53 ± 1,03	0,761
	Ht (%)	25,05 ± 1,20	28,37 ± 4,02	0,373
	Leuco (x10 ⁹ /L)	3884 ± 973	2200 ± 450	0,553
	Seg (x10 ⁹ /L)	1629 ± 694	586 ± 337	0,614
	Linf (x10 ⁹ /L)	1757 ± 306	1129 ± 676	0,501
	Linf At (x10 ⁹ /L)	34 ± 90	345 ± 598	0,012
	Mono (x10 ⁹ /L)	194 ± 73	110 ± 55	0,703
	Blastos (x10 ⁹ /L)	10 ± 10	0 ± 0	0,736
	Plaq (x10 ⁹ /L)	136 ± 33	156 ± 47	0,833

EP=Erro padrão

Tabela 9. Distribuição dos valores médios dos parâmetros hematológicos nos diferentes genótipos para o gene *NQQ1* apresentados pelos pacientes com LLA-B.

		<i>NQQ1</i>		
		Selvagem	Mutante	<i>p</i> =
		Média ± EP	Média ± EP	
D1	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	2,82 ± 0,23	3,33 ± 0,34	0,444
	Hb (g/dl)	7,62 ± 0,58	8,97 ± 0,81	0,344
	Ht (%)	22,92 ± 1,85	27,25 ± 2,19	0,372
	Leuco (x10 ⁹ /L)	13392 ± 4286	13400 ± 3399	0,999
	Seg (x10 ⁹ /L)	1517 ± 429	1654 ± 373	0,599
	Linf (x10 ⁹ /L)	9461 ± 3367	4819 ± 1439	0,622
	Linf At (x10 ⁹ /L)	799 ± 1724	249 ± 415	0,100
	Mono (x10 ⁹ /L)	268 ± 127	299 ± 94	0,670
	Blastos (x10 ⁹ /L)	1286 ± 675	4574 ± 2712	0,245
	Plaq (x10 ⁹ /L)	66 ± 18	96 ± 35	0,367
D7	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	3,29 ± 0,20	3,25 ± 0,31	0,910
	Hb (g/dl)	8,82 ± 0,45	8,28 ± 0,71	0,707
	Ht (%)	26,6 ± 1,58	25,89 ± 2,26	0,869
	Leuco (x10 ⁹ /L)	2546 ± 618	2378 ± 519	0,984
	Seg (x10 ⁹ /L)	728 ± 307	533 ± 208	0,910
	Linf (x10 ⁹ /L)	1623 ± 409	1402 ± 363	0,940
	Linf At (x10 ⁹ /L)	23 ± 10	60 ± 35	0,000
	Mono (x10 ⁹ /L)	59 ± 24	87 ± 23	0,703
	Blastos (x10 ⁹ /L)	0 ± 0	15 ± 15	0,381
	Plaq (x10 ⁹ /L)	63 ± 19	85 ± 35	0,530
D14	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	3,07 ± 0,16	3,16 ± 0,24	0,797
	Hb (g/dl)	8,3 ± 0,40	8,04 ± 0,60	0,671
	Ht (%)	25,53 ± 1,44	25,17 ± 1,96	0,902
	Leuco (x10 ⁹ /L)	4234 ± 1254	2623 ± 696	0,694
	Seg (x10 ⁹ /L)	1980 ± 951	686 ± 243	0,625
	Linf (x10 ⁹ /L)	1820 ± 359	1457 ± 470	0,750
	Linf At (x10 ⁹ /L)	103 ± 255	6 ± 18	0,515
	Mono (x10 ⁹ /L)	219 ± 99	125 ± 50	0,801
	Blastos (x10 ⁹ /L)	0 ± 0	25 ± 25	0,361
	Plaq (x10 ⁹ /L)	140 ± 42	134 ± 37	0,824

EP=Erro padrão

Tabela 10. Distribuição dos valores médios dos parâmetros hematológicos nos diferentes genótipos para o gene *MPO* apresentados pelos pacientes com LLA-B.

		<i>MPO</i>		
		Selvagem Média ± EP	Mutante Média ± EP	<i>p</i> =
D1	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	2,73 ± 0,22	3,24 ± 0,34	0,349
	Hb (g/dl)	7,67 ± 0,51	8,49 ± 0,99	0,533
	Ht (%)	23,06 ± 1,70	25,74 ± 2,81	0,451
	Leuco (x10 ⁹ /L)	15404 ± 4797	10789 ± 2910	0,785
	Seg (x10 ⁹ /L)	1682 ± 444	1489 ± 387	0,939
	Linf (x10 ⁹ /L)	10018 ± 3614	4270 ± 549	0,500
	Linf At (x10 ⁹ /L)	738 ± 1759	375 ± 639	0,518
	Mono (x10 ⁹ /L)	261 ± 133	330 ± 97	0,912
	Blastos (x10 ⁹ /L)	1729 ± 767	3927 ± 2739	0,369
	Plaq (x10 ⁹ /L)	60 ± 17	107 ± 35	0,095
D7	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	3,02 ± 0,20	3,59 ± 0,30	0,191
	Hb (g/dl)	8,1 ± 0,42	9,25 ± 0,71	0,283
	Ht (%)	24,59 ± 1,49	28,41 ± 2,22	0,243
	Leuco (x10 ⁹ /L)	2700 ± 722	2251 ± 313	0,813
	Seg (x10 ⁹ /L)	676 ± 320	686 ± 230	0,932
	Linf (x10 ⁹ /L)	1683 ± 460	1329 ± 236	0,812
	Linf At (x10 ⁹ /L)	12 ± 8	74 ± 34	0,018
	Mono (x10 ⁹ /L)	62 ± 25	85 ± 23	0,837
	Blastos (x10 ⁹ /L)	0,47 ± 0,47	15 ± 15	0,334
	Plaq (x10 ⁹ /L)	63 ± 20	87 ± 32	0,495
D14	Hemácias (x10 ⁶ /mL)	2,98 ± 0,15	3,28 ± 0,26	0,317
	Hb (g/dl)	8,01 ± 0,37	8,58 ± 0,69	0,342
	Ht (%)	24,79 ± 1,47	26,33 ± 2,06	0,645
	Leuco (x10 ⁹ /L)	4251 ± 1422	3071 ± 584	0,827
	Seg (x10 ⁹ /L)	1999 ± 1006	848 ± 277	0,701
	Linf (x10 ⁹ /L)	1644 ± 405	1838 ± 405	0,952
	Linf At (x10 ⁹ /L)	10 ± 23	211 ± 365	0,072
	Mono (x10 ⁹ /L)	203 ± 101	171 ± 70	0,924
	Blastos (x10 ⁹ /L)	0 ± 0	25 ± 25	0,317
	Plaq (x10 ⁹ /L)	136 ± 47	151 ± 33	0,914

EP=Erro padrão

A análise dos parâmetros hematológicos e os genótipos *GSTT1* selvagem e nulo demonstraram associações estatisticamente significativas para a contagem de plaquetas ($p= 0,0034$) e contagem global de leucócitos ($p= 0,014$) no D1 e para a contagem global de leucócitos e segmentados neutrófilos no D7 ($p=0,037$; $p= 0,0008$) (**Figura 8**). Quando se analisou os parâmetros hematológicos e a presença de polimorfismo no gene *GSTM1*, não se encontrou associações significativas (**Tabela 7**).

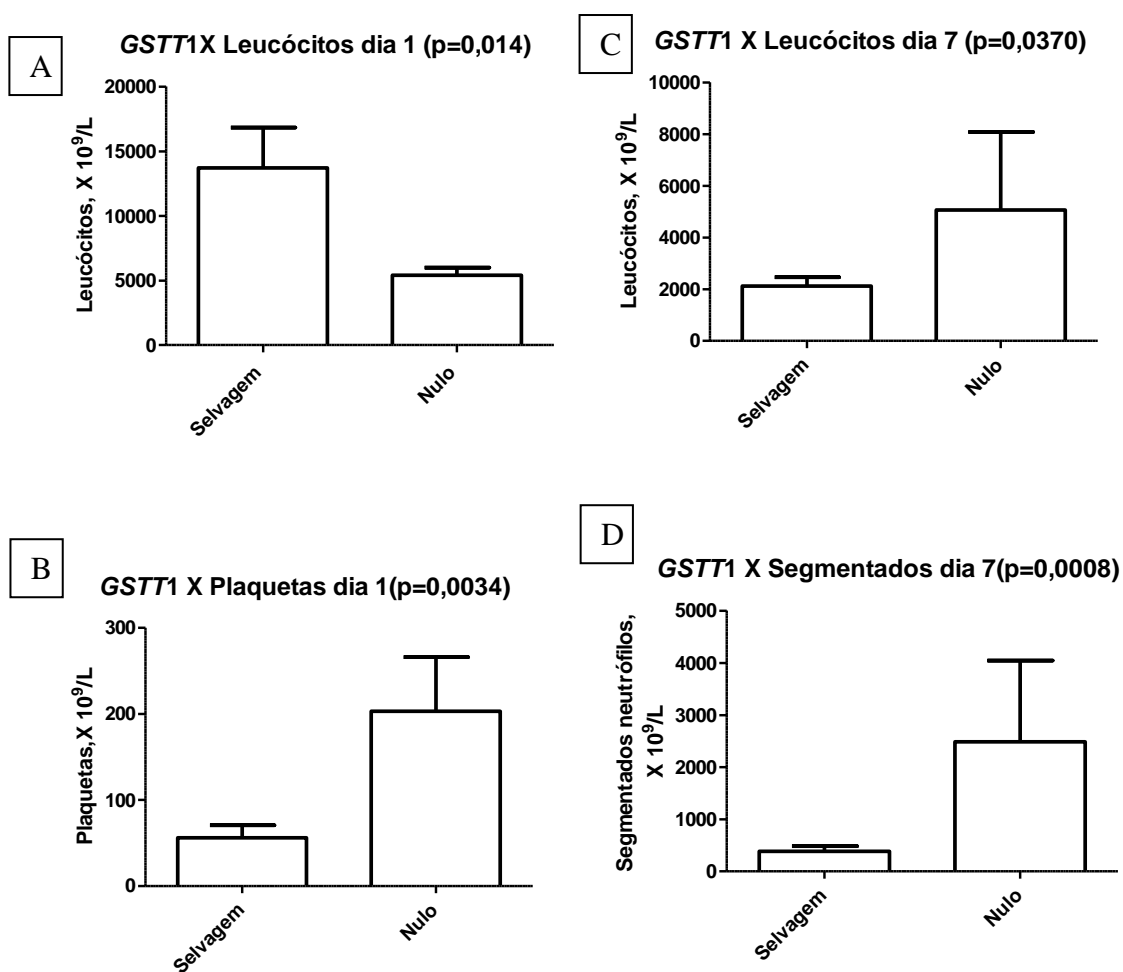


Figura 8. Distribuição e análise dos valores dos parâmetros hematológicos nos D1 e D7 e polimorfismo do gene *GSTT1*: A) Contagem de leucócitos no D1 e polimorfismo do gene *GSTT1*; B) Contagem de plaquetas D1 e polimorfismo do gene *GSTT1*; C) Contagem de leucócitos no D7 e polimorfismo do gene *GSTT1*; D) Contagem de neutrófilos segmentados no D7 e polimorfismo do gene *GSTT1*. Teste T pareado.

Com relação ao polimorfismo no gene *CYP2E1* observou-se que no D14 o número de linfócitos atípicos foi maior nos indivíduos que apresentaram o genótipo mutante quando comparado ao genótipo selvagem ($p= 0,012$) (**Tabela 8**). O número de linfócitos atípicos no D7 também foi associado com o polimorfismo no gene da *NQQ1*, sendo dez vezes maior naqueles com genótipo mutante (TT) ($p= 0,0001$) (**Tabela 9**). O mesmo foi observado com o polimorfismo no gene da *MPO*, onde indivíduos com genótipo mutante (AA) apresentaram número de linfócitos mais elevados que aqueles com genótipo selvagem (GG) ou heterozigoto (GA) ($p= 0,018$) (**Tabela 10**).

6. Discussão

A leucemia linfóide aguda da infância é uma doença comum, que apresenta diferentes etiologias, sendo importante o encontro de fatores de prognóstico que estejam relacionados com a resposta ao tratamento e manutenção da cura. O presente estudo investigou um grupo de pacientes pediátricos com LLA-B, sendo que esta foi predominante no sexo masculino, com idade média de 4,4 anos. Os resultados do presente estudo foram diferentes dos obtidos por Leite e cols. (2007) que encontraram a relação masculino: feminino de 1,7:1 ao realizarem um estudo retrospectivo em 108 pacientes com LLA com idade até 18 anos, que eram atendidos na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco. Entretanto, Pombo-de-Oliveira e cols. (2005) encontraram dados semelhantes ao do presente estudo e descreveram a relação masculino:feminino de 1,1:1 em pacientes com LLA-B ao realizarem um levantamento em 1.459 casos de LLA registrados no INCA entre janeiro/1990 e setembro/2002.

Com relação ao tipo de LLA mais prevalente, os resultados apontaram para a LLA-B. Estes resultados estão de acordo com outros realizados no Brasil e que descreveram prevalência maior da LLA-B (LEITE *et al.*, 2007; NORONHA *et al.*, 2011; POMBO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O tempo médio de procura pelo médico especialista, que variou de 7 a 180 dias pode ser justificado pelo fato dos sintomas iniciais serem comuns aos de outras doenças, pela dificuldade de acesso ao médico na atenção básica, pela dificuldade de acesso aos exames laboratoriais e pelas grandes distâncias, que dificulta o acesso rápido ao especialista em algumas regiões.

Os sinais e sintomas mais frequentes entre os pacientes deste estudo foram hepatomegalia e esplenomegalia seguidos de linfonomegalia seguidos

em menor proporção de dores articulares, petéquias e litíase renal e biliar. Os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes estudados estão de acordo com os comumente descritos para as leucemias agudas e estão relacionados com a dificuldade de maturação e diferenciação celular presentes na doença, fato que dificulta que as células exerçam as funções normais e vitais para a defesa e manutenção do organismo (KAUSHANSKY *et al.*, 2010). Os sinais e sintomas encontrados corroboram com os dados descritos por Leite e cols. (2007) para o grupo de pacientes com LLA estudados, apesar de ter apontado a ocorrência de febre como sintoma mais frequente, semelhante em proporção a hepatoesplenomegalia. Ainda no estudo de Leite e cols. (2007), os pacientes apresentaram taxas elevadas de sangramento, seguidas de queixas músculo-esquelético e em menor proporção o alargamento do mediastino e infiltração do SNC.

Dos 37 pacientes investigados no presente estudo, seis apresentaram infiltração do SNC, correspondendo a 16.2%. Segundo Cortes (2001), o envolvimento do SNC é identificado no momento do diagnóstico em menos de 5% dos pacientes com LLA pediátrica, sendo que a presença de infiltração do SNC antes da instituição da profilaxia adequada constituía-se em obstáculo para a obtenção de cura neste mesmo grupo de pacientes. Atualmente, devido às medidas profiláticas adotadas pelos diferentes esquemas terapêuticos, é possível prevenir e/ou tratar a infiltração do SNC. Segundo o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias na Infância (GBTLI-LLA 93), a infiltração do SNC classifica os pacientes que as apresentam como sendo de Alto Risco. Um fator importante quanto à infiltração do SNC é a resposta ao tratamento. Neste sentido o estudo desenvolvido por Ni e cols. (2011) descreve

a propriedade de drogas aromáticas no restabelecimento da barreira hematoencefálica ao realizarem estudos em modelo animal de isquemia e reperfusão cerebral. Os autores sugerem possíveis mecanismos relacionados com níveis do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e da metaloproteinase da matriz 9 (MMP9), que atuam como fatores de proteção quando apresentam os seus níveis diminuídos. Como essas duas moléculas estão relacionadas ao remodelamento das células endoteliais, células astrogliais e células do nervo, provavelmente podem estar desempenhando um papel importante dos indivíduos com LLA-B e infiltração do SNC e uma provável resposta terapêutica, apesar da ausência de dados relacionados a este mecanismo na literatura.

De acordo com os dados descritos na Figura 3, o presente estudo descreveu a diminuição na contagem de leucócitos, blastos, linfócitos e segmentados neutrófilos e monócitos após o D1, com contagens significativamente reduzidas no D7 e D14. De acordo Thompson e cols. (1995) a apoptose é uma forma ativa de suicídio celular e serve para realizar a eliminação de células indesejadas no organismo sadio, com manutenção da homeostase corpórea normal, sendo que nas transformações malignas o balanço entre a apoptose e a proliferação celular é desregulado, levando ao aumento da proliferação celular com diminuição da morte celular. Embora o papel da apoptose seja bem conhecido nas neoplasias hematológicas, sabe-se também dos efeitos citotóxicos indesejáveis da quimioterapia, que leva a destruição não só das células cancerígenas, mas também de células normais (DEB *et al.*, 2011). Os resultados obtidos no presente estudo não só reforçam os efeitos citotóxicos observados pelo uso de quimioterápicos, mas também

apontam para a manutenção das alterações nas linhagens eritróides e plaquetárias, que não apresentaram redução drástica nas suas contagens como evidenciado na linhagem leucocitária.

Outro ponto importante no entendimento das leucemias é o dos mecanismos envolvidos nas alterações da apoptose. O estudo de alterações em genes associados a apoptose tem sido frequente, visando, principalmente, o encontro de alterações que possam futuramente proporcionar bases para terapêuticas recombinantes ou que possam contribuir para esclarecer os mecanismos e reações envolvidas na gênese das leucemias. Tendo como base esta premissa, o presente estudo investigou alterações em genes associados à detoxificação de xenobióticos ou que relacionados a processos metabólicos importantes para a manutenção do organismo saudável.

Polimorfismo no gene *CYP2E1* e sua associação a clínica e alterações laboratoriais na LLA-B

Os genes do citocromo P450 catalisam a fase I do metabolismo e estão envolvidos na detoxificação de xenobióticos, incluindo carcinógenos ambientais, agentes quimioterápicos e de espécies reativas de oxigênio (TASPINAR *et al.*, 2008)

As frequências genótípicas e alélicas do gene *CYP2E1* se encontraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg e foram similares às descritas para o grupo controle. Essas frequências são semelhantes às do estudo realizado por Krajinovic e cols. (2002) que investigaram esse polimorfismo em pacientes de origem francesa e canadense, residentes na província de Quebec (Canadá), com descrição de frequência alélica para o genótipo selvagem nos pacientes

de 92% e nos controles de 97%. Vale ressaltar que no presente estudo o genótipo heterozigoto mutante para o gene *CYP2E1* teve frequências genotípicas de 10,5% e 11,1% para pacientes e controles, respectivamente, sendo que os dados foram discordantes dos obtidos por Krajinovic e cols. (2002) que encontraram frequências genotípicas para os heterozigotos de 8% e 3% para pacientes e controles, respectivamente. Entretanto, o presente estudo e o de Krajinovic não descreveram o encontro do genótipo homozigoto mutante para o gene *CYP2E1*.

Com relação à associação do polimorfismo no gene *CYP2E1* e sua influência na evolução clínica e laboratorial dos pacientes LLA-B estudados foi descrita a contagem elevada de linfócitos atípicos no D14 nos indivíduos com genótipo heterozigoto para este polimorfismo. Esse encontro leva a dúvidas quanto a natureza das células identificadas e nos faz supor que podem ser células blásticas, fato que pode representar uma resposta lenta ao tratamento pelos indivíduos com a mutação nesse gene, apesar deste estudo não ter evidenciado associações entre a presença do polimorfismo no gene *CYP2E1* e a evolução clínica.

Mathonnet e cols. (2003) ao estudarem alterações no gene do reparo de emparelhamento (*MLH1*) e em genes relacionados a leucemogênese, incluindo o *CYP2E1* e o *GSTM1*, descreveram o aumento da susceptibilidade a ocorrência de LLA nos portadores dos genótipos *GSTM1* nulo e mutante para *CYP2E1* na presença do gene *MLH1*, com razão de prevalência (RP) de 6.0 com $p=0.002$. Entretanto, os autores descreveram $RP=15.8$ com $p=0.001$ quando se analisou a associação de alterações nos genes *MLH1* e *CYP2E1*. Os autores sugerem a interação de genes relacionados ao metabolismo de

xenobióticos e ao reparo de DNA com a ocorrência de leucemogênese em crianças, uma vez que não foram encontradas associações isoladas com o gene *MLH1*.

A presença do polimorfismo *CYP2E1* também foi descrita como relacionada ao risco tanto de LMA quanto de LLA (AYDIN-SAYITOGU *et al.*, 2006). Segundo os autores, a presença do polimorfismo *CYP2E1* teve RP=3.6, com intervalo de confiança (IC) de 1.4-9.4, quando investigaram 287 crianças com LLA da Turquia. Associações entre polimorfismos no gene *CYP* também aparecem como fator de risco para LLA em estudo realizado por Silveira e cols. (2010) em 206 crianças brasileiras. Entretanto, no referido estudo o polimorfismo gênico investigado foi o *CYP2D6*. Um fato digno de nota foi o número relativamente reduzido de pacientes investigados no presente estudo, fato que pode ter contribuído para a ausência de associações significativas com o polimorfismo *CYP2E1*. Além disso, deve-se sempre levar em consideração as distribuições heterogêneas destes polimorfismos gênicos em diferentes populações, fato constantemente associado ao componente étnico dos grupos populacionais estudados.

Polimorfismo no gene *MPO* e sua associação a clínica e alterações laboratoriais na LLA-B

A enzima MPO está envolvida no controle do estresse oxidativo, sendo mais frequentemente descrita a mutação de um único nucleotídeo, onde o G é substituído por A na posição -463 da região promotora do gene *MPO*. Esta alteração tem sido associada a mudanças na expressão da MPO, abolindo o sítio de ligação para o fator de transcrição SP1 (KRAJINOVIC *et al.*, 2002). No presente estudo se investigou a mutação no gene *MPO*, com o encontro de

frequências para o genótipo homozigoto selvagem de 64,9% e 49,4% nos pacientes e controles, respectivamente. Estes dados foram discordantes dos obtidos por Krajnovic e cols. (2002), que encontraram frequências genotípicas de 62,1% e 62,9% para o genótipo homozigoto selvagem em pacientes e controles, respectivamente. No o presente estudo, o genótipo heterozigoto teve frequências de 29,7% e 38,3% e o genótipo homozigoto mutante frequências de 5,4% e 12,3% em pacientes e controles, respectivamente, o que se aproxima do estudo de Krajnovic e cols. (2002) que encontraram frequências de 32,5% e 33,8% para o genótipo heterozigoto e de 5,3% e 3,3% para o genótipo homozigoto mutante em pacientes e controles, respectivamente.

Com relação aos dados laboratoriais e clínicos, apesar de não terem sido descritas associações entre a presença do polimorfismo no gene *MPO* e a evolução clínica dos pacientes com LLA-B, encontrou-se associação entre o genótipo mutante e a ocorrência de infiltração da MO e de positividade no líquido no D1 e o genótipo mutante, sugerindo que este polimorfismo estivesse exercendo susceptibilidade a quadros clínicos mais graves da LLA-B, diferentemente do estudo de Silveira e cols. (2010) que analisou 206 crianças brasileiras com LLA e que concluíram sobre um possível papel protetor contra a leucemogênese do polimorfismo no gene *MPO*. Papel protetor similar foi descrito para o mesmo polimorfismo no gene da *MPO* em estudo desenvolvido por Zhang e cols. (2007) em 135 pacientes chineses adultos com leucemia aguda (LA) da população de Han. Entretanto, resultado contraditório foi obtido por Xi e cols. (2010) ao estudarem o polimorfismo no gene da *MPO* em 100 pacientes com LA da localidade chinesa de Gansu e concluírem que a presença do polimorfismo foi protetora para a LMA, uma vez que foi mais

frequente nos grupo de indivíduos sadios, mas que não demonstrou associação entre os indivíduos com LLA.

Polimorfismo no gene *NQO1* e sua associação a clínica e alterações laboratoriais na LLA-B

A enzima de detoxificação NQO1 é expressa na fase II do metabolismo de xenobióticos e está envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo e irradiação, com função de proteção das células contra os efeitos tóxicos dos radicais livres de oxigênio e de metabólitos (GRA *et al.*, 2010). A NQO é uma flavoproteína que cataliza a redução de dois elétrons, sendo que converte quinonas derivadas do benzeno em hidroquinonas e tem sido associada com a hematotoxicidade do benzeno (Lan *et al.*, 2004) e a resistência a mitomicina C (Pan *et al.*, 1995). O polimorfismo *NQO1* 609C>T foi o investigado no presente estudo e está associado à substituição do aminoácido serina por prolina na posição 187. Esta variante tem sido associada à perda completa da atividade enzimática (KRAJINOVIC, 2005).

O presente estudo descreveu as frequências de 60,5% e 58% para o genótipo homozigoto selvagem do polimorfismo *NQO1* 609C>T em pacientes e controles, respectivamente. Este dado foi discordante dos achados no estudo de Krajinovic e cols. (2002), que descreveram as frequências genotípicas de 47,7% e 60,4% para o genótipo homozigoto selvagem em pacientes e controles, respectivamente. Com relação à frequência do genótipo heterozigoto, os achados do presente estudo foram de 31,6% e 37% e, para o genótipo homozigoto mutante, as frequências foram de 7,9% e 4,9% em pacientes e controles, respectivamente. Os dados descritos se aproximam dos

achados de Krajinovic e cols. (2002), que descreveram frequências de 47,1% e 33,7% para o genótipo heterozigoto e de 5,1% e 5,8% para o genótipo homozigoto mutante em pacientes e controles, respectivamente. Entretanto, a presença desse e outros polimorfismos no gene *NQO1* tem sido associada ao risco de ocorrência de LLA, principalmente quando associado à translocação no gene *MLL* localizado no cromossomo 11q23 (BOLUFER *et al.*, 2006; GUHA *et al.*, 2008). Entretanto, Kracht e cols. (2004) descreveram a ausência de associação do polimorfismo *NQO1* 609C>T ao estudarem 138 crianças com LLA provenientes do grupo de estudo I-BFM-SG que congrega pacientes da Alemanha, Áustria e Chequiloquia e Silveira e cols. (2010) que associaram a presença deste polimorfismo a um efeito protetor nas crianças com LLA. Entretanto, a análise do polimorfismo *NQO1* 609C>T no presente estudo identificou que os pacientes com LLA e o alelo mutante apresentaram mais palidez, mais infiltração de MO e positividade no líquido no D1, sugerindo uma associação ao fenótipo mais grave da doença. Esses dados reforçam os achados de Silveira e cols. (2009) que ao estudarem polimorfismos diversos em 95 crianças com LLA encontraram associação do polimorfismo *NQO1* 609C>T com a sobrevida livre de doença em crianças menores de 5 anos e sugerem que os pacientes com este polimorfismo pode ser importante para a avaliação da resposta a indução de terapia e a evolução no tratamento na LLA e aos achados de Yamaguti e cols. (2010) que também associaram esse polimorfismo a um fator de risco para a LLA.

Polimorfismo nos genes *GSTM1* e *GSTM1* e sua associação a clínica e alterações laboratoriais na LLA-B

As GSTs são enzimas fase II de compostas envolvidas no detoxificação de xenobióticos, pesticidas, carcinógenos ambientais e quimioterápicos (BOLUFER *et al.*, 2006). No presente estudo foram encontradas frequências de 35,1% e 32,1% para o genótipo nulo do gene *GSTM1* para pacientes e controles, respectivamente. Esses dados, no geral, não diferiram dos achados de D'Aló e cols. (2004) que descreveram frequências do genótipo nulo de 42,5% e 46,9% em pacientes e controles, respectivamente quando investigaram um grupo de indivíduos italianos adultos com LMA. Com relação ao papel do genótipo nulo no gene *GSTM1* na LLA da infância os dados são controversos e ainda não são conclusivos com relação a um possível risco associado a sua presença (BOLUFER *et al.*, 2006).

As frequências para o genótipo nulo no gene *GSTT1* descritas neste estudo foram de 21,6% e 20,5% nos pacientes e controles, sendo diferentes das descritas por Chan e cols. (2011) ao estudarem 185 crianças Javanesas com LLA que obtiveram frequências para o genótipo nulo no gene *GSTT1* de 34,6% e 27,7% em pacientes e controles, respectivamente.

A presença do genótipo nulo no gene da *GSTT1* tem sido associado a susceptibilidade a LLA infantil e a uma estreita associação com a etnia e sexo. O trabalho de Chen e cols. (1997) descreve a prevalência elevada de LLA em crianças afrodescendentes com o genótipo nulo e o trabalho de Chan e cols. (2011) descreve a RP= 2.2 com $p= 0,027$ para as meninas com LLA e *GSTT1* nulo. O presente estudo não confirmou achado referente ao sexo, sendo que a associação relacionada à etnia foi difícil de ser conduzida, uma vez que não

foram investigados marcadores genéticos apropriados para determinar a origem étnica do grupo estudado. Cumpre ressaltar que a população brasileira e, mais precisamente, a população do estado da Bahia, na qual o estudo foi realizado, é conhecida pela sua miscigenação racial (AZEVEDO, 1973).

A análise do genótipo nulo para o gene *GSTT1* e os dados laboratoriais esteve estatisticamente associado a contagem diminuída de leucócitos no D1 e a presença de contagens mais elevadas no D7. Estes resultados confirmam os dados obtidos por Gonçalves e cols. (2010), que estudaram os polimorfismos no gene da *GST* e descreveram o risco de 5,92 do genótipo nulo no gene *GSTT1* para a ocorrência de leucopenia ($p=0.002$) em 278 indivíduos desta mesma população. O fato dos leucócitos se apresentarem em número mais elevado no genótipo nulo no D7 sugere que estes indivíduos devem estar metabolizando mais lentamente os quimioterápicos utilizados no tratamento, podendo representar um grupo que necessita de acompanhamento direto quanto a esta resposta. Esses mesmos indivíduos apresentaram contagem de plaquetas mais elevadas no D1 e de segmentados neutrófilos no D7, fato que pode representar preservação maior das plaquetas nos portadores do genótipo *GSTT1* nulo e resistência maior dos segmentados aos quimioterápicos, já que o número de leucócitos foi elevado no D7. Entretanto, dados semelhantes não foram descritos na literatura, necessitando confirmação com a realização de um estudo com número maior de pacientes com LLA.

7. Conclusões

De acordo com os objetivos e com os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

1. O estudo não evidenciou associações entre o polimorfismo no gene *CYP2E1* e a evolução clínica dos pacientes;
2. Os achados para o genótipo nulo do gene *GSTT1* pode estar associado a um grupo de pacientes que necessita de acompanhamento direto quanto a resposta ao tratamento;
3. Com relação ao papel do genótipo nulo no gene *GSTM1* na LLA da infância os dados são controversos e ainda não são conclusivos com relação a um possível risco associado a sua presença;
4. Os achados referentes ao genótipo mutante dos genes *NQO1* e *MPO* sugere que estes polimorfismos podem estar associados ao fenótipo mais grave da doença com a ocorrência de quadros clínicos mais graves na LLA-B, uma vez que estiveram associados à infiltração da medula óssea e a presença de bastos no líquido.

8. Referências

1. AYDIN-SAYITOGU, M.; HATIRNAZ, O.; ERENDOY, N.; OZBEK, U. Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias. **Am. J. Hematol.**, n.81, vol.3, p.162-170, 2006.
2. AZEVÊDO, E. Historical note on inheritance of sickle cell anemia. **Am. J. Hum. Genet.**, n. 25, p. 457-58, 1973.
3. BARRAGAN, E.; COLLADO, M.; CERVERA, J.; MARTIN, G.; BOLUFER, P.; ROMAN, J.; SANZ, M. A. The GST deletions and NQO1*2 polymorphism confers interindividual variability of response to treatment in patients with acute myeloid leukemia. **Leukemia Research**, vol. 31, p. 947–953, 2006.
4. BASU, T.; GALE, R.E.; LANGABEER, S.; LINCH, D.C. Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) gene defect in myelodysplasia and acute myeloid leukaemia. **The Lancet**, vol.349, p.1450, 1997
5. BOING, A. F.; VARGAS, S. A. L.; BOING, A.C. A carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade hospitalar entre 2002-2004. **Revista Associação Médica Brasileira**, vol.53, n. 4, p. 317-322, 2007.
6. BOLUFER, P.; BARRAGAN, E.; COLLADO, M.; CERVERA, J.; LÓPEZ, J-A.; SANZ, M.A. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. **Leukemia Research**, vol. 30, p. 1471-1491, 2006.
7. CÉZAR, R.C. **Avaliação de marcadores de prognóstico e da mutação *jak2v617f* na evolução de pacientes com leucemia linfóide aguda da infância no estado da Bahia – Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal da Bahia – Salvador.
8. CHABNER, A. B.; WILSON, W.; SUPKO, J. Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs. In: **Williams Hematology**, USA: McGraw-Hill Medical, p. 249-274, 2006.
9. CHAN, J.Y-S.; UGRASENA, D.G.; LUM, D.W-K.; LU, Y.; YEOH, A.E-J. Xenobiotic and folate pathway gene polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia in Javanese children. **Hematological Oncology**. vol. 29, p. 116-123, 2011.
10. CHEN, C.L.; LIU, Q.; PUI, C.H.; RIVERA, G.K.; SANDLUND, J.T.; RIBEIRO, R.; EVANS, W.E.; RELLING, M.V. Higher Frequency of Glutathione S-Transferase Deletions in Black Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, vol. 89, N.5, p. 1701-1707, 1997.
11. CHU, E. & SARTORELLI, A.C. Quimioterapia do câncer. In: **Farmacologia Básica e Clínica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.751-777, 2005.

12. COLE, P. & RODU, B. Descriptive epidemiology: cancer statistics. In: De vita, VT.; Hellman S.; Rosenberg S.A. **Cancer: principles and practice of oncology**, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, p. 228-241, 2001.
13. CORTES, J. Central Nervous System Involvement In Adult Acute Lymphocytic Leukemia. **Hematology/Oncology Clinics Of North America**, n.1, vol.15, 2001
14. Comissão Técnica de Biossegurança da Fiocruz - CTBio – FIOCRUZ. **Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na Fiocruz**. Rio de Janeiro, 2005.
Disponível em: http://www.crfce.org.br/novo/images/stories/pdf/10.1-BIBLIOT_LABORAT_ProcedManip.pdf
Acesso em: 18 mai.2012, 17:46.
15. DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. **Practical haematology**. 6.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984.
16. D'ALÒ, F.; VOSO, M.T.; GUIDI, F.; MASSINI, G.; SCARDOCC, A.; SICA, S.; PAGANO, L.; HOHAUS, S.; LEONE, G. Polymorphisms of CYP1A1 and glutathione S-transferase and susceptibility to adult acute myeloid leukemia. **Haematologica**, vol. 89, p.664-670, 2004.
17. DEB, D.D.; PARIMALA, G.; DEVI, S.S.; CHAKRABORTY, T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelocytic cancer cell line HL-60. **Chemico-Biological Interactions**. vol.193, p. 97-106, 2011.
18. FALCÃO, R.P. & REGO, E.M. Classificação das Neoplasias Hematológicas. Marcadores. Imunofenotipagem. In: **Hematologia Fundamentos e Prática**, São Paulo: Editora Atheneu, p. 383-384, 2004.
19. FARIAS, M.G.; BIERMANN, M.B. Análise morfológica, imunofenotípica e molecular na identificação da leucemia megacariocítica aguda (LMA-M7). **Rev. Bras. Hematologia Hemoterapia**, v. 29, n. 4, 2007.
20. GONÇALVES, M.S.; MOURA NETO, J.P.; SOUZA, C.L.; MELO, P.; REIS, MG. Evaluating glutathione S-transferase (GST) null genotypes (GSTT1 and GSTM1) as a potential biomarker of predisposition for developing leucopenia. **Int. J. Lab. Haematol.** vol.32, p. 49-56, 2010.
21. GRA, O.; MITYAEVA, O.; BERDICHEVETS, I.; KOZHEKBAEVA, Z.; FESENKO, D.; KURBATOVA, O.; GOLDENKOVA-PAVLOVA, I.; NASEDKINA, T. Microarray-Based Detection of CYP1A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, GSTT1, GSTM1, MTHFR, MTRR, NQO1, NAT2, HLA-DQA1, and AB0 Allele Frequencies in Native Russians. **Genetic Testing And Molecular Biomarkers**, vol.14, n. 3, p. 329–342, 2010.

22. GUHA, N.; CHANG, J.S.; CHOKKALINGAM,A.P.; WIEMELS, J.L.; SMITH, M.T.; BUFFLER, P.A. NQO1 Polymorphisms and De Novo Childhood Leukemia: A HuGE Review and Meta-Analysis. **American Journal of Epidemiology**. vol. 168, n. 11, 2008

23. HAN, X.; ZHENG, T.; FOSS, F. M.; LAN, Q.; HOLFORD, T. R.; ROTHMAN, N.; MA, S. ZHANG, Y. Genetic polymorphisms in the metabolic pathway and non-Hodgkin lymphoma survival. **American Journal Hematology**, vol. 85, n.1, p.51–56, 2010.

24. IMANISHI, H.; OKAMURA, N.; YAGI, M.; NORO, Y.; MORIYA, Y.; NAKAMURA, T.; HAYAKAWA, A.; TAKESHIMA, Y.; SAKAEDA, T.; MATSUO, M.; OKUMURA, K. Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. **Journal of Human Genetics**, vol.52, p. 166-171, 2007.

25. INCA – Disponível em:

<http://www.inca.gov.br/tumores_infantis/pdf/livro_tumores_infantis_0904.pdf>

Acesso em: 28 jan. 2010, 16:06.

26. INCA – Disponível em:

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>> Acesso em:

21 mar.2012, 20:40.

27. KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M. A.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; PRCHAL, J. T. Williams Hematology. 8th ed. New York: **The McGraw-Hill Professional Inc.**; 2010. 2460 p.

28. KOSCHEK, P.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S; GATTASS, C.R. The husk fiber of *Cocos nucifera* L. (Palmae) is a source of anti-neoplastic activity. **Braz J Med Biol Res**, vol. 40, n.10, p. 1339-1343, 2007.

29. KRACHT,T. SCHRAPPE, M.; STREHL, S.; REITER, A.; ELSNER, H-A.; TRKA, J.; CARIO, G.; VIEHMANN, S.; HARBOTT, J.; BORKHARDT, A.; METZLER, M.; LANGER, T.; REPP, R.; MARSCHALEK, R.; WELTE, K.; HAAS, O.A.; STANULLA, M. NQO1 C609T polymorphism in distinct entities of pediatric hematologic neoplasms. **Haematologica**, vol.89, n. 12, 2004.

30. KRAJINOVIC, M.; LABUDA, D.; SINNETT, D. Childhood acute lymphoblastic leukemia: genetic determinants of susceptibility and disease outcome. **Rev Environ Health**, Vol. 16, n. 4, p. 263-279, 2001.

31. KRAJINOVIC, M.; SINNETT, H.; RICHER, C.; LABUDA, D.; SINNETT, D. Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Int. J. Cancer**, vol. 97, p.230–236, 2002.

32. LAN, Q.; ZHANG, L.; LI, G.; VERMEULEN, R.; WEINBERG, R.S.; DOSEMECI, M.; RAPPAPORT, S.M.; SHEN, M.; ALTER, B.P.; WU, Y.; KOPP, W.; WAIDYANATHA, S.; RABKIN, C.; GUO, W.; CHANOCK, S.; HAYES, R.B.; LINET, M.; KIM, S.; YIN, S.; ROTHMAN, N.; SMITH, M.T. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of Benzene. **Science**, vol. 306(5702), p.1774–1776, 2004.
33. LEITE, E.P; MUNIZ, M.T.C.; AZEVEDO, A.C.A.C.; SOUTO, F.R.; MAIA, A.C.L.; GONDIM, C.M.F.; BANDEIRA, F.M.G.C.; MELO, R.A.M. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, n.7, vol.4, p. 413-421, 2007.
34. LI, J; THOMPSON, T. D.; MILLER, J.W.; POLLACK, L.A.; STEWART, S.L. Cancer Incidence Among Children and Adolescents in the United States, 2001-2003. **Pediatrics**, vol.121, p.e1470-e1477, 2008.
35. LOSI-GUEMBAROVSKI, R. & CÓLUS, I. M. S. Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1): distribuição étnica e relação com câncer. **Semina: Ci. Biol. Saúde**, vol. 22, p. 3-9, 2001.
36. MATHONNET, G.; KRAJINOVIC, M.; LABUDA, D.; SINNETT, D. Role of DNA mismatch repair genetic polymorphisms in the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br. J. Hematol.**, n.123, vol.1, p.45-48, 2003.
37. NI, C.; ZENG, N.; XU, F.; GOU, L.; LIU, J.; WANG, J.; XIA, H. Effects of aromatic resuscitation drugs on blood brain barrier in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**. n.36, vol.18, p. 2562-2566, 2011.
38. NORONHA, E.P.; MARINHO, H.T.; THOMAZ, E.B.A.F.; SILVA, C.A.; VERAS, G.L.R.; OLIVEIRA, R.A.G. Immunophenotypic characterization of acute leukemia at a public oncology reference center in Maranhão, northeastern Brazil. **Sao Paulo Med. J.**, n.129, vol.6, p. 392-401, 2011
39. PALODETTO, B; POSTAL, M.; GRIGNOLI, C.R.E.; SARTORATO, E.L.; OLIVEIRA, C.A. Influence of glutathione s-transferase on the ototoxicity caused by aminoglycosides. **Braz J Otorhinolaryngol**, n.76, v.3, p.306-9, 2010.
40. PAN, S.S.; FORREST, G.L.; AKMAN, S.A.; HU, L.T. NAD(P)H:quinone oxidoreductase expression and mitomycin C resistance developed by human colon cancer HCT 116 cells. **Cancer Res**. n.55, vol.2, p.330-335, 1995.
41. POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S.; CORDOBA, J.C.; ALENCAR, D.M; CAMPOS, M.M; CARRIÇO, K.; DOBBIN, J.; DOREA, M.D.; FERREIRA, R.; MENDONÇA, N.; MAGALHÃES, I.Q. Biological diversity variations of pediatric acute leukemia in Brazil: contribution of immunophenotypic profiles to epidemiological studies. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, n.27, vol.1, p.21-26, 2005.

42. PUI, C.H.; CAMPANA, D.; EVANS, W. E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia – current status and future perspectives. **The Lancet Oncology**, vol. 2, p.597-607, 2001.

43. SEER – Disponível em: <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/>, based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010. Acesso em: 07 nov. 2010, 17:12.

44. SILVEIRA, V.S.; CANALLE, R. SCRIDELI, C.A.; QUEIROZ, R.G.P.; BETIOL, H.; VALERA, E. T.; TONE, L.G. Polimorphism of xenobiotic metabolizing enzymes and DNA repair genes and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**. vol.33, p. 898-901, 2009

45. SILVEIRA, V.S.; CANALLE, R. SCRIDELI, C.A.; QUEIROZ, R.G.P.; TONE, L.G. Role of *CYP2D6*, *EPHX1*, *MPO*, and *NQO1* genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. vol.51, p. 48-56, 2010.

46. STELIAROVA-FOUCHER, E.; STILLER, C.; KAATSCH, P.; BERRINO, F.; COEBERG, J.W.; LACOUR, B.; PARKIN, D.M. Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCis project): an epidemiological study. **Lancet**, vol.364, p. 2097-2105, 2004.

47. TASPINAR, M.; AYDOS, S. E.; COMEZ, O.; ELHAN, A. H.; KARABULUT, H. G.; SUNGUROGLU, A. CYP1A1, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukemia. **Swiss Med Wkly**, p. 12-17, 2008.

48. THOMPSON, [E.B.](#); [THULASI, R.](#); [SAEED, M.F.](#); [JOHNSON, B.H.](#) Glucocorticoid antagonist RU 486 reverses agonist-induced apoptosis and c-myc repression in human leukemic CEM-C7 cells. [Ann N Y Acad Sci.](#), vol.12, p. 261-275, 1995

49. VIJAYAKRISHNAN, J.; HOULSTON, R.S. Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Haematologica**, Vol. 95, n.8, p.1405-1414, 2010.

50. XI, Y.M.; SHI, X.E.; LI, P.; ZHANG, H.; LI, M.; LIU, B.; YAO, X.J.; XU, J.W. Relationship between polymorphism of myeloperoxidase gene and susceptibility of acute leukemia in Chinese Gansu population. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**. n.18, vol.6, p.1431-1434, 2010

51. WEINBERG, O.K.; SEETHARAM, M.; REN, L.; SEO, K.; MA, L.; MERKER, J.D.; GOTLIB, J.; ZEHNDER, J.L.; ARBER D.A. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. **Blood**, vol.113, p. 1906-1908, 2009.

52. YAMAGUTI, G.G.; LOURENÇO, G.J.; SILVEIRA, V.S.; TONE, L.G.; LOPES, L.F.; LIMA, C.S.P. Increased risk for acute lymphoblastic leukemia in children with cytochrome P450A1 (*CYP1A1*) – and NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*)- inherited gene variants. **Acta Haematologica**. vol.124, p. 182-184, 2010.
53. YAMAMOTO, M.; FIGUEIREDO, V.L.P. Epidemiologia da leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica crônica familiar. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**, vol. 27, n.4, p. 229-232, 2005.
54. YE, Z.; SONG, H. Glutathione s-transferase polymorphisms (*GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1*) and the risk of acute leukaemia: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Cancer**, vol. 41, p. 980–989, 2005.
55. ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e prática**. Ed. Rev. Atual. São Paulo: Atheneu, 2005.
56. ZHANG, J.; ZHU, F.Y.; PU, Y.P.; YIN, L.H.; LUO, J.; WANG, W.P.; ZHOU, G.H. Analysis of multiple single nucleotide polymorphism (SNPs) of myeloperoxidase (MPO) to screen for genetic markers associated with acute leukemia in Chinese Han population. **J. Toxicol. Environ. Health A**. n.70, vol.11, p. 901-907, 2007.

Anexo 1

Quadro1. Definições mais comumente utilizadas no protocolo do Grupo Brasileiro para o Tratamento das Leucemias Infantis (GBTLI LLA 93)

DEFINIÇÕES DE RISCO DE RECAÍDA

RISCO BÁSICO VERDADEIRO	Pacientes com idade ≥ 1 e ≤ 10 anos, com contagem leucocitária inicial $\leq 10.000/\text{mm}^3$, ausência de massa mediastinal, ausência de envolvimento no SNC, hepato-esplenomegalia inferior a 5 cm do rebordo costal (RC) medida na linha hemiclavicular (LHC). Os critérios recomendáveis: imunofenotipagem não T não B com CD10 $\geq 20\%$, hiperdiploidia > 50 e ausência de cromossomo Philadelphia (Ph).
RISCO BÁSICO	São critérios imprescindíveis: pacientes com idade ≥ 1 e ≤ 10 anos, contagem leucocitária inicial acima de 10.000 e até 50.000/ mm^3 e/ou presença de massa mediastinal e/ou fígado e baço ≥ 5 cm do RC na LHC. São critérios recomendáveis: imunofenotipagem não T e não B, citogenética com hiperdiploidia de 47 a 50 e/ou ausência do cromossomo Ph.
ALTO RISCO	São critérios imprescindíveis: pacientes com idade inferior a 12 meses e superior a 10 anos, e/ou com contagem leucocitária inicial acima de 50.000/ mm^3 e/ou envolvimento do SNC. São critérios recomendáveis: imunofenotipagem T derivada, e/ou com achados desfavoráveis da citogenética (hipodiploidia 46, pseudodiploidia, cromossomo Ph +).

DEFINIÇÕES DO ESTADO DA MEDULA

MEDULA M1	O aspirado da MO deverá conter $< 5\%$ de blastos leucêmicos, independente da proporção de linfócitos maduros. A remissão medular verdadeira requer o estado M1, com celularidade medular normal e apresentando todas linhagens celulares (série mielóide, eritróide e megacariocitária).
MEDULA M2	O esfregaço da MO deverá conter entre 5 e 25% de blastos leucêmicos, independente da proporção de linfócitos maduros.
MEDULA M3	Medula com contagem de blastos leucêmicos $> 25\%$, representando uma medula refratária ao tratamento, ou uma recaída.

OUTRAS DEFINIÇÕES

REMISSÃO MEDULAR	Definida como M.O. apresentando os três setores hematopoéticos bem representados e menos de 5% de linfoblastos leucêmicos.
REMISSÃO CLÍNICA COMPLETA	Definida quando o paciente estiver sem sintomas e/ou sinais físicos atribuíveis a leucemia, além de M.O. em remissão. A contagem de neutrófilos no sangue periférico deverá ser $\geq 500 / \text{mm}^3$ e das plaquetas $\geq 75.000 / \text{mm}^3$.
PACIENTES RESPONDEDORES RÁPIDOS	São os pacientes com leucometrias inferiores a 5000 / mm^3 no D7, sem blastos periféricos detectáveis e que não apresentam, também, blastos leucêmicos no D14 e, adicionalmente, têm o diagnóstico M1/M2 na medula óssea colhida naquele dia. No caso de infiltração em SNC, o líquido no dia 14 não deverá conter blastos.

PACIENTES RESPONDEDORES LENTOS	São os pacientes com leucometrias no D7 $\geq 5.000 /\text{mm}^3$ e/ou blastos periféricos presentes em qualquer número e/ou que apresentam blastos leucêmicos, detectados no sangue periférico após duas semanas do início da indução e/ou medula M3, obtida no dia 14 da indução. Incluem-se neste grupo, os que apresentaram infiltração inicial em SNC e que ainda apresentam blastos leucêmicos no exame liquórico do dia 14.
PACIENTES NÃO RESPONSIVOS	São os pacientes que apresentam no final da terapia de indução (28° dia), a medula M2/M3, ou que ainda apresentem acometimento leucêmico extramedular. Será considerada também falha indutória , os pacientes que apresentarem linfoblastos, em prazo inferior a 60 dias, após a obtenção da medula de remissão.
RECAÍDA MEDULAR	Caracterizada pelo reaparecimento de $\geq 5\%$ de blastos leucêmicos na M.O. (M2) ou $\geq 25\%$ de blastos (M3). A recaída poderá ser isolada na M.O. ou combinada, se houver envolvimento simultâneo do SNC ou outros sítios, como os testículos.
RECAÍDA EM SNC	É caracterizado pelo achado de células leucêmicas no LCR e/ou aparecimento de sinais e sintomas neurológicos secundários à leucemia.
RECAÍDA TESTICULAR	A infiltração leucêmica em um ou ambos testículos deve ser comprovada por biópsia aberta para a comprovação deste tipo de recaída.
SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA	É o tempo decorrido entre a obtenção da RCC até a ocorrência da primeira recidiva.
TEMPO DE SOBREVIDA	Definido como o tempo decorrido entre o momento do diagnóstico de leucemia até a ocorrência de morte do paciente.

Apêndice 1 – Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, detentor de
integral

(nome ou responsável legal)

competência para dar consentimento

a _____

(nome do menor)

participar como voluntário do estudo denominado **“Investigação das Anormalidades Cromossômicas, Polimorfismos do Gene TNF e da Glutathiona-S-Transferase em Neoplasias Hematológicas”**, sob a coordenação da Dra. Marilda de Souza Gonçalves. Tenho conhecimento de que este estudo é importante, pelo fato de fornecer condições de avaliação do grau de prognóstico, acompanhamento da doença e de introdução das técnicas de biologia molecular no auxílio diagnóstico das leucemias na nossa população. As implicações relativas a minha participação voluntária, incluindo a natureza, duração e objetivo do estudo, os métodos e meios através dos quais o estudo deve ser conduzido foram explicados por

(nome do investigador)

no (a) _____

(nome da Instituição)

Entendo também que eu tenho permissão para a qualquer momento revogar o meu consentimento e me retirar do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de direitos. Entretanto, poderei ser solicitado a realizar exames, caso o médico que me assiste, julgue-os necessários para minha saúde e bem estar.

Assinatura do responsável _____

Data ____/____/____ Número de identidade _____

Endereço _____

Eu presenciei a explicação acima descrita, confirmando a oportunidade concedida de formular perguntas e testemunho a assinatura neste documento.

Assinatura da testemunha(1) _____

Nome da testemunha (1) _____

Assinatura da testemunha(2) _____

Nome da testemunha (2) _____

Assinatura do investigador _____

Apêndice 2. Caracterização imunofenotípica e estratificação de risco dos pacientes com LLA-B na infância.

Paciente	Sexo	Idade	Leucometria ao diagnóstico (x 10 ³ /mm ³)	Linhagem Celular	Imunofenótipo	Infiltração no SNC ao Diagnóstico	Grupo de Risco	Situação ao final do estudo
1	M	9 a*	18,0	B	PRÉ B	+	AR	V
2	F	6 a	11,1	B	COMUM	-	RB	V
3	F	7 a	1,4	B	COMUM	-	RB	V
4	M	1 a, 8 m**	3,1	B	PRÉ B	+	AR	V
5	F	1 a, 6 m	5,6	B	B	+	AR	V
6	M	3 a, 9 m	3,2	B	COMUM	-	AR	V
7	F	3 a, 6 m	17,6	B	COMUM	-	RB	V
8	M	4 a, 1 m	74,4	B	COMUM	-	AR	V
9	M	1 a, 5 m	4,8	B	PRÉ B	-	RB	V
10	F	7 a, 7 m	43,3	B	COMUM	-	AR	V
11	F	3 a	33,4	B	COMUM	+	AR	V
12	F	14 a	10,0	B	COMUM	-	AR	V
13	F	6 a	3,2	B	PRÓ B	-	RB	V
14	M	4 a, 6 m	11,4	B	COMUM	-	RB	V
15	M	5 a, 8 m	13,9	B	PRÓ B	+	AR	V
16	M	4a, 1 m	4,6	B	PRÓ B	-	RB	V
17	F	11 a, 11 m	513,5	B	PRÓ B	-	AR	O
18	M	5 a	22,0	B	COMUM	-	RB	V
19	F	5 a, 8 m	2,6	B	***	-	RB	V
20	F	5 a, 11 m	2,5	B	COMUM	-	AR	V
21	M	5 a, 9 m	19,7	B	COMUM	-	AR	V
22	F	9 m	13,2	B	B	-	AR	V
23	M	2 a, 7 m	4,4	B	B	-	RB	V
24	F	2 a, 4 m	4,3	B	COMUM	-	RB	V
25	F	4 a, 9 m	2,2	B	COMUM	-	RB	O
26	M	6 a, 6 m	4,4	B	COMUM	-	AR	V
27	F	11 a, 1 m	5,4	B	COMUM	-	AR	O
28	M	3 a, 3 m	7,0	B	COMUM	-	RBV	V
29	M	7 a, 4 m	***	B	PRÉ B	-	AR	O
30	M	1 a, 4 m	***	B	PRÉ B	-	AR	O
31	M	3 a, 11 m	7,3	B	COMUM	-	AR	V
32	M	2 a, 2 m	18,5	B	COMUM	-	RB	V
33	M	5 a, 8 m	6,0	B	COMUM	-	RBV	V

*a= anos, **m= meses, V= vivo, O= óbito, AR= Alto risco, RB= Risco baixo, RBV = Risco baixo verdadeiro, ***dado inexistente.

Fonte: Extraído de Cézar, 2011.

Apêndice 3. Características imunofenóticas dos blastos dos pacientes com LLA-B

LLA-B (33)								
	n	%		n	%		n	%
CD1a	0	0	CD19	27	81,8	CD135	1	3
CD2	0	0	CD20	6	18,2	cCD3	0	0
CD3	2	6,1	CD22	1	3	cCD13	3	9,1
CD4	1	3	CD33	5	15,1	cCD22	18	54,5
CD5	1	3	CD34	10	30,3	cCD79a	16	48,5
CD7	1	3	CD38	4	12,1	mCD22	1	3
CD8	1	3	CD45	19	57,6	cIgM	2	6,1
CD10	23	69,7	CD56	1	3	TdT	13	39,4
CD13	4	12,1	CD58	4	12,1	HLA-DR	18	54,5
CD14	1	3	CD79a	0	0	aMPO	1	3

n= numero de pacientes

Fonte: Extraído de Cézar, 2011.