

BRUNA PALODETTO

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS CYP2B6 G15631T, GSTM1,
GSTT1, NQO1 C609T
E MDR-1 C3435T NA RESPOSTA AO TRATAMENTO DE
LEUCEMIA AGUDA E SINDROME MIELODISPLÁSICA**



Campinas

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS CYP2B6 G15631T, GSTM1,
GSTT1, NQO1 C609T E MDR-1 C3435T NA RESPOSTA AO
TRATAMENTO DE LEUCEMIA AGUDA E SINDROME
MIELODISPLÁSICA

Bruna Palodetto

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade de Campinas –
UNICAMP para obtenção de título de Mestre
em Fisiopatologia Médica, área de concentração
em Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do
Desenvolvimento . Sob orientação da Profa.
Dra. Sara Teresinha Olalla Saad.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

P186i Palodetto, Bruna, 1987 -
Influência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T,
GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T na
resposta ao tratamento de leucemia aguda e síndrome
mielodisplásica / Bruna Palodetto. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2012.

Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia Aguda. 2. Síndromes Mielodisplásicas.
3. Polimorfismo. 4. Drogas - Metabolismo. I. Saad,
Sara Teresinha Olalla. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Influence of polymorphisms CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T and MDR-1 C3435T in treatment response of acute leukemia and myelodysplastic syndrome

Palavra-chave em inglês:

Acute Leukemia

Myelodysplastic Syndromes

Polymorphism

Drug Metabolism

Área de Concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Sara Teresinha Olalla Saad [Orientador]

Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso

Carmen Sílvia Bertuzzo

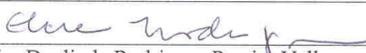
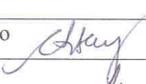
Data da defesa: 20-01-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca examinadora de Tese de Mestrado

Bruna Palodetto

Orientador(a): Prof. Dr. Sara Teresinha Olalla Saadi

Membros:

Professor (a) Mestre (a) Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso

Professor (a) Mestre (a) Carmen Silvia Bertuzzo

Professor (a) Mestre (a) Sara Teresinha Olalla Saadi

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/01/2012

DEDICATÓRIA

*DEDICO ESTE TRABALHO A TODOS
QUE SEMPRE ME APOIARAM,
PRINCIPALMENTE A MINHA MÃE,
QUE SEMPRE ESTEVE AO MEU
LADO E ME DEU INCENTIVO PARA
CONTINUAR.*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Vânia, por ser a minha base, meu porto seguro, meu pai e minha mãe. Por me ensinar a dar valor aos estudos, por estar sempre ao meu lado e principalmente pelo amor e carinho de todos os dias.

Ao meu pai Antônio Carlos, aonde quer que você esteja tenho certeza que continua ao meu lado olhando por mim.

Aos meus tios Elaine e Luciano, minhas primas Aline e Patrícia e minha vó Nair, por estarem sempre do meu lado, por me incentivarem nos estudos, por terem paciência comigo, por serem realmente uma família para mim, me amarem e apoiarem sempre.

Ao meu namorado, Sandro, por toda a ajuda na parte gráfica, por todo amor e apoio e principalmente pela paciência durante a elaboração desse trabalho.

A minha orientadora, Profa Dra. Sara T. Olalla-Saad por sua grande orientação e apoio para a realização deste trabalho e principalmente por ter me aceitado em seu laboratório, por ser um exemplo para mim e me permitir adquirir ensinamentos que levarei por toda vida.

A Dra. Fabiola Traina, por sua disponibilidade e paciência e por não medir esforços para me ajudar sempre que eu precisei.

A Dra. Paula e o Dr. Bruno, por me salvarem com os dados dos pacientes e as infundáveis tabelas.

A Tereza pela ajuda essencial no laboratório e pelos ensinamentos.

As secretárias Patrícia e a Raquel pelo auxílio, orientação e pela amizade.

Aos meus amigos, pela paciência, apoio e por entender minhas ausências.

A Rita, pelas alegrias, risadas, tristezas, viagens, aventuras, conversas, pela companhia e amizade fundamentais durante meu período na Unicamp.

Aos amigos do laboratório, Letícia, Mariana Lazarini, Mariana Baratti, Fernanda, Karin, Juliana, João, Victor, Tiago, Isabela, Matheus, Anamika, Patrícia, João Kleber, Pedro, Gisele, Laure, Carol, Vanessa e Daniella por dividirem as frustrações e as alegrias de todos os dias.

Aos funcionários Karla, Fernanda, Luis, Simone, Renata, Janine, Lena, Irene e Ana Leda e Audrey por me auxiliarem durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos pacientes que aceitaram participar desse estudo, pois sem eles nada seria possível.

Ao departamento de estatística do Hemocentro e da FCM pela ajuda prestada.

Aos membros da banca examinadora da minha defesa, por aceitarem fazer parte desta grande etapa da minha vida.

As agências financiadoras FAPESP, CNPQ e INCT do sangue.

A Deus por minha saúde, minha família, minha vida e pelas oportunidades e objetivos alcançados.

EPÍLOGO

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogêneo de doenças hematopoiéticas caracterizadas pela hematopoiese ineficaz resultando em citopenia no sangue periférico; cerca de 30% das SMDs evolui para leucemia mielóide aguda secundária. Leucemias agudas (LA) são doenças malignas do sangue caracterizadas por acúmulo de blastos podendo ser classificadas em mielóide agudas (LMA), quando há envolvimento de mieloblastos, ou linfóides agudas (LLA), quando há envolvimento de linfoblastos. A sobrevida média dos pacientes com leucemia aguda ainda é muito baixa e muitos deles são resistentes ao tratamento ou apresentam recaída. O melhor entendimento sobre os mecanismos de progressão da mielodisplasia e da resposta ao tratamento em leucemias agudas poderia melhorar a taxa de resposta ao tratamento e aumentar a sobrevida dos pacientes. O metabolismo e o efluxo de drogas são mecanismos de defesa responsáveis pela proteção contra agentes tóxicos e estão envolvidos na biotransformação de diversos xenobióticos. O metabolismo de drogas pode ser dividido em duas fases (Fase I: Oxidação; Fase II: Conjugação), sendo ambas mediadas por enzimas metabolizadoras de drogas. O efluxo de drogas é outro mecanismo de proteção contra tóxicos, similar ao metabolismo de drogas, porém mediado por proteínas de membrana. Essas proteínas são polimórficas e esses polimorfismos alteram a atividade enzimática, podendo modificar a resposta ao tratamento e a sua resistência. O gene CYP2B6 codifica uma enzima da fase I do metabolismo responsável pela ativação dos fármacos. Esse gene possui o polimorfismo G15631T onde há troca do aminoácido (Gln172His) resultando em perda da atividade enzimática. Os genes GSTM1, GSTT1 e NQO1 codificam enzimas da fase II do metabolismo, responsáveis pela conjugação com outras substâncias para facilitar a excreção. Os genes GSTM1 e GSTT1 possuem um polimorfismo que causa deleção homozigota do gene; e o gene NQO1 possui o polimorfismo C609T que resulta em troca do aminoácido codificado (Pro187Ser). Esses polimorfismos levam a perda da atividade enzimática. O gene MDR-1 codifica a P-glicoproteína que é uma proteína de membrana responsável pelo efluxo de drogas. Esse gene possui o polimorfismo C3435T que apesar de ser silencioso (Ile1142Ile) diminui a expressão de P-glicoproteína. Assim, o objetivo deste

estudo foi identificar a influência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTT1, GSTM1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T no risco de leucemias agudas e SMD, na progressão de SMD e resposta ao tratamento de leucemia aguda. Foram analisados 90 pacientes com leucemia aguda (66 LMA e 24 LLA), 68 pacientes com SMD e 100 controles normais utilizando os métodos de PCR-RFLP e Multiplex. Não houve diferença estatística na frequência dos polimorfismos entre pacientes e grupo controle. Em SMD encontramos maior frequência de deleções de GST em pacientes que progrediram comparados aos pacientes que não progrediram: 50% e 21% (P=0,019). Também encontramos menor frequência do alelo polimórfico T do polimorfismo MDR-1 C3435T em pacientes que progrediram comparada a dos pacientes que não progrediram: 50% e 81% (P=0,012). Na resposta ao tratamento de leucemias agudas, encontramos uma tendência à maior frequência do polimorfismo NQO1 C609T em pacientes com falha de indução quando comparados a pacientes com remissão em leucemias agudas, em geral, (P=0,093) e pacientes somente com LMA (P=0,125); e quando comparamos falha de indução com o grupo controle em leucemias agudas, em geral, (P=0,101) e somente em LMA (P=0,08). Observamos a mesma tendência quando comparamos a frequência do polimorfismo NQO1 C609T em pacientes com óbito precoce versus a população normal (P=0,058). Em conclusão, estes resultados sugerem que os polimorfismos não estão relacionados ao risco de leucemia aguda e SMD, embora a amostra aqui analisada possa ter sido insuficiente; as deleções GST e o polimorfismo MDR-1 C3435T estão envolvidos na progressão de SMD e o polimorfismo NQO1 C609T tem uma tendência a estar relacionado à falha de indução e ao óbito precoce em pacientes com leucemias agudas, em geral, e somente LMA.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of hematopoietic disorders characterized by ineffective hematopoiesis resulting in peripheral blood cytopenia, about 30% of MDS patients progresses to acute myeloid leukemia. Acute leukemia (AL) are malignant blood diseases characterized by accumulation of blasts and they can be classified into acute myeloid (AML), when there is myeloblasts involvement or acute lymphoid (ALL), when there is lymphoblasts involvement. The median survival of acute leukemia patients is very low and many of them are resistant to treatment or relapsed. The better understanding of the myelodysplasia progression mechanisms and the acute leukemia response to treatment could improve the treatment response rate and patients survival. The metabolism and drug efflux are defense mechanisms responsible for protection against toxic agents and are involved in the biotransformation of various xenobiotics. The drug metabolism can be divided into two phases (Phase I: Oxidation; Phase II: Conjugation), both being mediated by drug metabolizing enzymes. The drug efflux is a similar mechanism of protection but is mediated by membrane proteins. These enzymes are polymorphic and these polymorphisms alter the enzyme activity and may modify treatment response and resistance. The CYP2B6 gene encodes a phase I enzyme responsible for drug activation. This gene has the G15631T polymorphism where there is exchange of the amino acid (Gln172His) resulting in loss of enzyme activity. The GSTM1, GSTT1 and NQO1 genes encoding phase II metabolizing enzymes that are responsible for combining with other substances to facilitate drug excretion. GSTM1 and GSTT1 genes have a polymorphism that causes homozygous deletion of the gene; and the NQO1 gene has the C609T polymorphism that results in amino acid changes (Pro187Ser). These polymorphisms lead to loss of enzyme activity. The MDR-1 gene encodes P-glycoprotein (P-gp) which is a membrane protein responsible for drug efflux. This gene has the C3435T polymorphism that despite being silent (Ile1142Ile) leads to lower P-gp expression. The aim of this study was to identify the influence of CYP2B6 G15631T, GSTT1, GSTM1, NQO1 C609T and MDR-1 C3435T polymorphisms in acute leukemia and MDS risk, MDS progression and acute leukemia response to treatment. We analyzed 90 patients with acute

leukemia (66 AML and 24 ALL), 68 MDS patients and 100 normal controls using the PCR-RFLP and Multiplex methods. There was no statistical difference in the frequency of polymorphisms between patients and control group. In MDS we found higher frequency of GST deletions in patients who progressed compared to patients who did not progress: 50% and 21% ($P = 0.019$). We also found less frequently polymorphic allele T of MDR-1 C3435T polymorphism in patients who progressed compared to patients who did not progress: 50% and 81% ($P = 0.012$). In acute leukemia response to the treatment, we found a trend toward a higher frequency of NQO1 C609T polymorphism in patients with induction failure compared to patients in remission, with acute leukemia in general, ($P = 0.093$) and AML patients only ($P = 0.125$); and induction failure when compared with the control group in acute leukemia in general ($P = 0.101$) and only in AML patients ($P = 0.08$). We observed the same trend when comparing the frequency of NQO1 C609T polymorphism in patients with early death versus normal population ($P = 0.058$). In conclusion, these results suggest that these polymorphisms are not related to acute leukemia and MDS risk, although the sample analyzed here may have been insufficient; GST deletions and MDR-1 C3435T polymorphism are involved in MDS progression and NQO1 C609T polymorphism has a tendency to be related to induction failure and early death in patients with acute leukemia, in general, and AML only.

Lista de Abreviaturas

ABC - *ATP binding cassette*

AR - Anemia refratária

AREB - Anemia refratária com excesso de blasto

AREBt - Anemia refratária com excesso de blasto em transformação

ARSA - Anemia refratária com sideroblasto em anel

β -Globina – Gene da globina beta

CRDM - Citopenia refratária com displasia multilinear

CRDU - Citopenia refratária com displasia unilinear

CYP - *Citocromo P450*

CYP2B6 - *Citocromo P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6*

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

FAB - French-American-British

Gln - Glutamina

GSH - Glutathiona

GST - *Glutathione S-transferase*

GSTM1 - *Glutathione S-transferase mu 1*

GSTT1 - *Glutathione S-transferase theta 1*

His - Histidina

HIV - *Human immunodeficiency virus*

IC - Intervalo de confiança

Ile - Isoleucina

INT-1 - Intermediário-1

INT-2 - Intermediário-2

IPSS - *International Prognostic Scoring System*

LA- Leucemias agudas (LMA e LLA)

LLA - Leucemia Linfóide Aguda

LMA - Leucemia Mieloide Aguda

LMMC - Leucemia Mielomonocítica Crônica

MDR-1 - *Multidrug-resistance Transporte 1*

MLL - *Myeloid/lymphoid or Mixed-lineage Leukemia*

mRNA - RNA mensageiro

NAD(P)H - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-P

NQO1 - *NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1*

OR: Odds Ratio

PCR - Polymerase Chain Reaction

P-gp - P-Glicoproteína

Pro - Prolina

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

Ser - Serina

SMD - Síndrome Mielodisplásica

SMD-5q - Síndrome Mielodisplásica com deleção do cromossomo 5q

SMD-N - Síndrome Mielodisplásica não classificada

SMD-t - Síndrome Mielodisplásica associada à terapia

UBS – Unidade Básica de Saúde

WHO - *World Health Organization*

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características dos pacientes com diagnóstico de SMD.....	50
Tabela 2. Características dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda.	51
Tabela 3. Sequência dos iniciadores utilizados para o rastreamento dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T.	58
Tabela 4. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T no grupo controle e nos pacientes com SMD, LMA e LLA e equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	63
Tabela 5. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T em leucemias agudas, LMA, LLA, SMD e grupo controle comparada por análise de regressão logística univariada.	65
Tabela 6. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T em progressão e baixo e alto risco na classificação IPSS de pacientes com SMD comparada por análise de regressão logística univariada.	67
Tabela 7. Análise de regressão logística multivariada para progressão em mielodisplasia.	68
Tabela 8. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T em falha de indução, remissão e recaída em pacientes com leucemias agudas, em geral, ou LMA isoladamente e no grupo controle comparadas por teste exato de Fisher.	69
Tabela 9. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T em pacientes que com leucemias agudas, em geral, e LMA isoladamente que apresentaram óbito precoce e no grupo controle comparadas por teste exato de Fisher.....	70
Tabela 10. Dados encontrados na literatura sobre a relação entre os polimorfismos e o risco de LMA, LLA, Leucemias agudas, no geral, e SMD.....	73

Lista de Figuras

- Figura 1. Hipótese das etapas da patogênese da mielodisplasia. Diagrama simplificado mostrando as possíveis etapas da patogênese da SMD e a progressão para LMA..... 39
- Figura 2. Identificação das deleções de GSTM1 e GSTT1. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio contendo os produtos da reação de PCR Multiplex de 630pb, 480pb e 273pb que correspondem aos genes β -globina, controle interno, e a presença normal dos alelos GSTT1 e GSTM1 respectivamente. L indica o marcador de 100 pb, O indivíduo 1 possui deleção homozigota de GSTT1, os indivíduos 2 e 3 possuem deleção homozigota de GSTM1, o indivíduo 4 não possui deleção e o indivíduo 5 possui deleção homozigota de ambos os alelos GSTM1 e GSTT1..... 52
- Figura 3. PCR para detecção do polimorfismo CYP2B6 G15631T. Produto de 578pb fracionado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio que corresponde a região do polimorfismo CYP2B6 G15631T..... 53
- Figura 4. Identificação do polimorfismo CYP2B6 G15631T. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio, contendo os produtos da reação de digestão com a enzima de restrição *FastDigest BseNI*. Na figura, L indica o marcador de DNA de 100pb, o indivíduo heterozigoto GT está representado pela presença das bandas de 578pb, 518pb e 60pb. O indivíduo homozigoto normal GG está representado pela presença das bandas 518pb e 60pb. O indivíduo homozigoto polimórfico TT está representado pela presença de uma única banda de 578pb. 54
- Figura 5. PCR para detecção do polimorfismo NQO1 C609T. Produto de 166pb fracionado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio que corresponde a região do polimorfismo NQO1 C609T..... 55
- Figura 6. Identificação do polimorfismo NQO1 C609T. Gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio, contendo os produtos da reação de digestão com a enzima de restrição *FastDigest HinfI*. Na figura, L indica o marcador de DNA de 100pb, o indivíduo homozigoto normal CC está representado pela presença de uma única banda de 166pb, o indivíduo heterozigoto CT está representado pela presença das bandas de 166pb, 103pb e

63pb. O indivíduo homozigoto polimórfico TT está representado pela presença das bandas de 103pb e 63pb.....	56
Figura 7. PCR para detecção do polimorfismo MDR-1 C3435T. Produto de 249pb fracionado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio que corresponde a região do polimorfismo MDR-1 C3435T.....	57
Figura 8. Identificação do polimorfismo MDR-1 C3435T. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio, contendo os produtos da reação de digestão com a enzima de restrição <i>FastDigest Sau3AI</i> . Na figura, L indica o marcador de DNA de 100pb, o indivíduo heterozigoto CT está representado pela presença das bandas de 249pb, 158pb e 91pb. O indivíduo homozigoto normal CC está representado pela presença das bandas de 158pb e 91pb. O indivíduo homozigoto polimórfico TT está representado pela presença de uma única banda de 249pb.	58

Sumário

DEDICATÓRIA.....	vii
AGRADECIMENTOS.....	ix
EPÍLOGO.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xviii
Lista de Abreviaturas.....	xxii
Lista de Tabelas.....	xxvi
Lista de Figuras.....	xxviii
Sumário.....	xxxii
Introdução.....	36
Objetivos.....	44
1. Objetivo Geral.....	46
. Objetivos Específicos:.....	46
Material e Métodos.....	47
1. Casuística:.....	49
2. Extração do DNA a partir dos leucócitos:.....	51
3. Identificação dos polimorfismos dos genes GSTM1 e GSTT1:.....	51
4. Identificação dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T	53
4.1 Polimorfismo CYP2B6 G15631T:.....	53
4.2 Polimorfismo NQO1 C609T:.....	54
4.3 Polimorfismo MDR-1 C3435T:.....	56
5. Análise Estatística:.....	59
Resultados.....	60
1. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T no grupo controle e nos pacientes com SMD, LMA e LLA e verificação de equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	62
2. Associação dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T com o risco de leucemias agudas, LMA, LLA e SMD.....	64
3. Influência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T na progressão em síndromes mielodisplásicas.....	66

4. Influência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1	68
C609T e MDR-1 C3435T na resposta ao tratamento de leucemias agudas	68
Discussão	71
Conclusões	79
Referências	82
Anexos	94
Anexo 1	95
Anexo 2	99
Anexo 3	102
Anexo 4	105
Anexo 5	111

Introdução

O processo de metabolismo dos fármacos é complexo e inúmeras enzimas estão envolvidas. Muitas dessas enzimas são polimórficas e estes polimorfismos podem influenciar sua atividade e modificar a resposta e a resistência ao tratamento[1].

Síndromes mielodisplásicas e leucemias agudas

Síndromes mielodisplásicas constituem um grupo heterogêneo de desordens hematopoéticas clonais, que exibem hematopoese ineficaz. A expansão do clone anômalo resulta em displasia morfológica, diferenciação deficiente e células não funcionais. As consequências desta hematopoese deficiente são citopenias no sangue periférico, que podem envolver os três segmentos do sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A anemia e seus sintomas relacionados são as manifestações clínicas mais comuns na maioria das SMDs[2, 3].

Estudos sugerem que a causa da SMD possa estar relacionada a radiações ionizantes, tabagismo, sexo masculino e exposição a produtos químicos como solventes orgânicos, benzeno, pesticidas e fungicidas. Há também SMD associadas à terapia (SMD-t), resultado de exposição a drogas citotóxicas, em particular agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase II e radiação terapêutica[4, 5].

As SMD foram classificadas em 1982 pelo grupo cooperativo Franco americano-inglês (FAB) nas seguintes categorias: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em forma de anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREBt), e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), apresentando dentre estas classes um aumento progressivo no número de precursores imaturos na medula (de 5% até 30% de blastos) e considerando progressão para leucemia mielóide aguda acima de 30% de blastos[6]. Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, WHO) propôs uma nova classificação que foi revisada e atualizada em 2008[7, 8]. Esta classificação considera progressão para LMA acima de 20% de blastos na medula e é composta pelas seguintes categorias: Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), citopenia refratária com displasia unilinear (CRDU), citopenia refratária com displasias multilinear (CRDM), anemia refratária com excesso de blastos-1 e 2 (AREB-1 e AREB-2), síndrome mielodisplásica não classificada (SMD-N) e SMD associada com deleção isolada no

cromossomo 5q (SMD-5q). Além dessas classificações, foi criado o Índice de Prognóstico Internacional (*Internacional Prognostic Score System, IPSS*) que avalia o prognóstico das SMD baseado no número de blastos no aspirado de medula óssea e a citogenética. O IPSS possui 4 subgrupos: Pacientes com baixo risco ou Intermediário- 1 e alto risco ou Intermediário- 2. Este índice prognóstico prediz com certa precisão a sobrevida e o risco de evolução para LMA secundária[9].

Acredita-se que a patogênese da SMD tenha início a partir de mutações em células tronco hematopoéticas normais. O acúmulo dessas mutações pode afetar o controle do ciclo celular e a transcrição de genes supressores de tumor, resultando na expansão de clones com SMD que inicialmente possuem uma taxa alta de apoptose. Durante a progressão da doença ocorre a diminuição de apoptose e o aumento da proliferação clonal, podendo levar a LMA[10] (Figura 1).

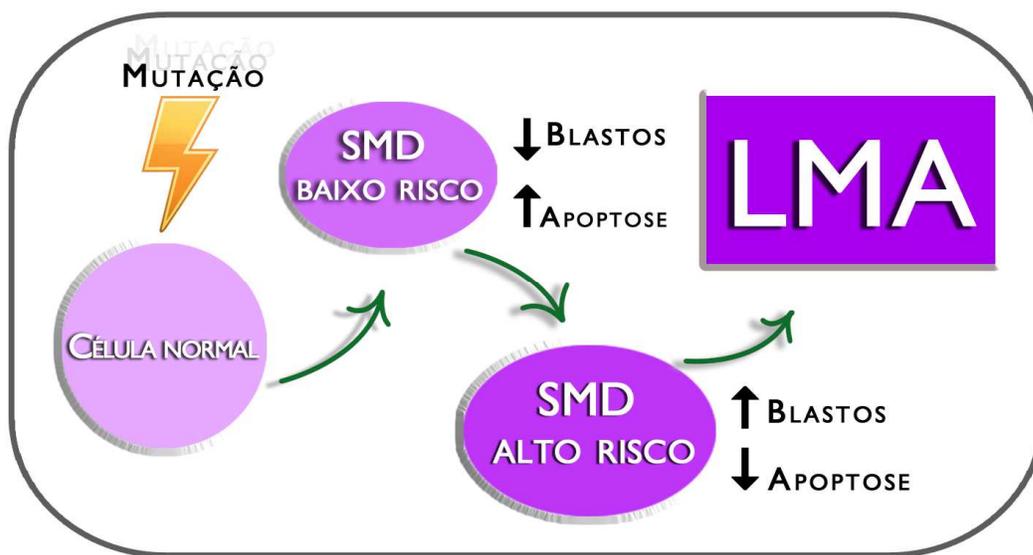


Figura 1. Hipótese das etapas da patogênese da mielodisplasia. Diagrama simplificado mostrando as possíveis etapas da patogênese da SMD e a progressão para LMA.

As leucemias agudas são um grupo de doenças malignas caracterizadas por defeitos na diferenciação celular e elevada proliferação de progenitores hematopoéticos, resultando na expansão e acúmulo de blastos. Os sintomas mais frequentes são: anemia, neutropenia, trombocitopenia e infiltração de órgãos como fígado, baço, linfonodos, entre outros[11, 12]. As leucemias agudas são subdivididas em leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia

linfóide aguda (LLA) dependendo da presença de mieloblastos ou linfoblastos, respectivamente.

Cerca de um terço dos pacientes com SMD evoluem para LMA secundária e em casos muito raros pode evoluir para LLA[13]. O único tratamento que pode potencialmente trazer a cura para SMD é o transplante de medula óssea, porém esse tratamento não é uma opção para todos os pacientes. Os outros tipos de tratamento oferecidos são apenas suporte ou quimioterápicos quando há grande chance de progressão para LMA secundária[14]. Pacientes com baixo risco de progressão levam em média 9,4 anos para progredir e tem uma sobrevida média de 5,7 anos, em contraste, pacientes com alto risco levam em média 0,2 anos para progredir e tem sobrevida média de 0,4 anos[9]. Pacientes com LMA secundária têm pior prognóstico e maior resistência ao tratamento comparado a pacientes com LMA primária[15].

Cerca de 30% dos pacientes com LMA primária apresentam resistência ao tratamento e 50% apresentam recaída [16, 17]; a sobrevida média desses pacientes é de 18 meses[15]. LLA é o câncer mais comum em crianças[18], cerca de 30% dos pacientes apresentam resistência ao tratamento ou recaída[19] e 80% em média têm sobrevida de 5 anos ou mais[20].

Um maior entendimento dos mecanismos que influenciam a resposta ao tratamento de pacientes com leucemia e dos fatores que levam a progressão de pacientes com mielodisplasia poderia aumentar a taxa de resposta ao tratamento e a sobrevida desses pacientes.

Metabolismo de drogas

O metabolismo de drogas tem como principal objetivo proteger nosso organismo contra substâncias tóxicas[21] e pode ser basicamente dividido em duas fases: Fase I responsável pela ativação; e Fase II responsável pela conjugação[22]. Na fase I o fármaco é ativado e se torna mais polar e reativo, e na fase II ocorre a conjugação com outras substâncias produzindo um substrato mais hidrofílico que pode ser facilmente excretado[23]. As mediadoras desse processo em ambas as fases são enzimas conhecidas como metabolizadoras de drogas que desempenham um papel fundamental no metabolismo e na proteção contra danos potencialmente causados pela exposição a

xenobióticos[24]. A maioria dos tecidos e órgãos do nosso corpo estão bem equipados com diversos tipos de enzimas de fase I, fase II e de proteínas transportadoras de membrana, responsáveis pelo efluxo de drogas, a fim de potencializar a proteção contra agentes tóxicos[24, 25].

Porém muitas dessas enzimas e proteínas possuem polimorfismos genéticos que se manifestam, na maioria das vezes, sob forma de trocas de nucleotídeo simples na região codificadora do gene ou por deleções e inserções de bases nitrogenadas em alguns de seus íntrons, ou ainda nas regiões flanqueadoras dos éxons[26], produzindo formas diferentes de uma mesma enzima ou proteína, podendo alterar a sua capacidade de ativar ou inativar compostos químicos[23]. Essa variação poderia modificar a toxicidade de fármacos e a resposta e resistência de pacientes ao tratamento[1].

Fase I do metabolismo e o gene CYP2B6

Na fase I do metabolismo de drogas ocorrem reações de oxidação, redução ou hidrólise que resultam em metabólitos mais polares devido à adição de um grupo reativo (OH, SH ou NH₂), resultando na ativação do fármaco[27, 28].

As principais enzimas metabolizadoras que participam dessa fase são as da superfamília do citocromo P450 (CYP), que representam 80% de todas as enzimas da fase I[23] e são muito expressas no fígado, rim e trato pulmonar[29]. A superfamília do citocromo P450 é dividida em diversas subclasses, onde as classes CYP1, CYP2, CYP3 foram previamente relacionadas ao metabolismo de xenobióticos[28].

O gene que selecionamos para estudo foi o Citocromo P450, família 2, subfamília B, polipeptídeo 6 (CYP2B6), localizado no cromossomo 19 e na região 19q13.2[30], que é responsável pelo metabolismo de 25% das drogas e compostos químicos[31] e tem um importante papel na biotransformação de ciclofosfamida e de efavirenz[31, 32] utilizados no tratamento de leucemia crônica[33] e HIV[34] respectivamente.

No gene CYP2B6 foi identificado o polimorfismo G15631T (rs3745274), localizado no éxon 4 do gene, que causa uma substituição do aminoácido glutamina por uma histidina (Gln172His)[31, 35] e essa substituição resulta na diminuição da expressão do gene pois cria uma região aberrante de clivagem de RNA mensageiro que leva a menor atividade

enzimática[36]. O polimorfismo CYP2B6 G15631T foi encontrado em 25,9% da população chinesa e foi previamente associado ao risco de LMA e LLA[31, 35].

Fase II do metabolismo e os genes GSTM1, GSTT1 e NQO1

Na fase II do metabolismo de drogas ocorrem reações de conjugação que modificam os grupos reativos recém introduzidos, aumentando a hidrofília dos substratos facilitando sua excreção, tendo papel principal no processo detoxificação[27, 37]. Selecionamos para o estudo da Fase II do metabolismo os genes GSTM1, GSTT1 e NQO1.

As glutationas S-transferases (GSTs) constituem uma família de enzimas codificadas por 5 famílias de genes: mu (μ), theta (θ), pi (μ), alfa (α) e sigma (σ). Essas enzimas estão envolvidas na fase II do metabolismo e participam da desintoxicação de uma ampla gama de compostos, incluindo xenobióticos, pesticidas, carcinógenos ambientais e quimioterápicos[38]. As GSTs catalisam a conjugação de glutationas (GSH) a componentes eletrofílicos, como carbono e nitrogênio, formando compostos mais solúveis, menos tóxicos e que serão mais facilmente excretados[39].

O gene GSTM1 (classe mu 1) compreende 5,9 kb de DNA genômico, contém 8 éxons e está localizado no braço curto do cromossomo 1, na região 1p13[40]. O gene GSTT1 (theta 1) compreende 7,6 kb de DNA genômico, contém 5 éxons e está localizado no braço longo do cromossomo 22, na região 22q11[41]. Esses genes são polimórficos em humanos e esses polimorfismos consistem na deleção homozigota completa do gene resultando em perda da atividade enzimática[38]. As frequências de deleções encontradas para os genes GSTM1 e GSTT1 foram de 40-50% e 16-24% respectivamente em diferentes populações étnicas[42-46]. Esse polimorfismo foi previamente relacionado ao risco de diversos tipos de câncer[1], incluindo LMA[47].

Outro gene que participa da fase II do metabolismo é o NAD(P)H desidrogenase quinona 1 (NQO1) localizado no cromossomo 16 e na região 16q22[48]. O gene NQO1 codifica as NADPH-Quinonas oxidoreduases que são enzimas responsáveis por catalisar uma redução de dois elétrons e converter quinonas, que são compostos derivados de benzeno, em hidroquinonas para que possam ser mais facilmente excretadas[47]. Esse processo é importante para a detoxificação de diversos quimioterápicos, incluindo antraciclina que são utilizadas no tratamento de LMA[1].

No gene NQO1 foi descrito o polimorfismo C609T (rs1800566), localizado no éxon 6[49], que resulta na substituição de um aminoácido Prolina por uma Serina (Pro187Ser). Essa substituição de aminoácidos muda a conformação do sítio ligante e altera a habilidade funcional da enzima, levando à perda da atividade enzimática[47, 50]. A frequência do polimorfismo encontrada foi de 46,2% na população da Turquia[51] e esse polimorfismo foi previamente relacionado ao risco de LLA com translocação MLL em crianças[52].

Efluxo de drogas e o gene MDR-1

O gene humano *multi-drug resistance*, ou MDR-1, está localizado no cromossomo 7, na região 7q21, compreende 28 éxons e codifica uma proteína de membrana de 170 kD chamada P-glicoproteína (P-gp). A P-gp pertence a super família de transportadores de resíduos na membrana plasmática, ABC (*ATP Binding Cassette*), que funcionam como transportadores no efluxo de diversos xenobióticos[53]. O principal papel da P-gp é a proteção do organismo contra substâncias tóxicas e sua expressão modifica a farmacocinética das drogas devido a regulação da absorção no intestino e eliminação pela urina[54, 55].

Foi identificado no gene MDR-1 o polimorfismo C3435T que está localizado no éxon 26 e é silencioso, ou seja, apesar da substituição da base nitrogenada citosina por uma timina o aminoácido codificado continua sendo uma Isoleucina (Ile1142Ile). Apesar de ser silencioso, o polimorfismo MDR-1 C3435T está associado a menor expressão de P-gp, por possível alteração na estabilidade do mRNA[56, 57]. O genótipo TT foi previamente associado ao risco de LLA e o genótipo CC foi associado ao pior prognóstico em câncer de mama e LLA[56, 58, 59].

Em vista do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar a relação dos polimorfismos acima descritos com as síndromes mielodisplásicas e leucemias agudas.

Objetivos

1. Objetivo Geral:

Avaliar a influência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T na resposta ao tratamento de leucemias agudas, na progressão das síndromes mielodisplásicas e no risco dessas doenças.

2. Objetivos Específicos:

1.1 Investigar a associação dos polimorfismos com risco de leucemias agudas, LMA, LLA e SMD:

a. Comparar a frequência dos polimorfismos entre pacientes e grupo controle.

1.2 Em pacientes com SMD:

a. Comparar a frequência dos polimorfismos entre pacientes que apresentaram progressão com os que não apresentaram progressão.

b. Comparar a frequência dos polimorfismos entre pacientes classificados pelo IPSS como de baixo risco e intermediário-1 com os classificados como alto risco e intermediário-2.

1.3 Avaliar a resposta ao tratamento em pacientes com leucemias agudas:

a. Comparar a frequência dos polimorfismos entre pacientes que atingiram remissão com os que não atingiram devido a falha na indução.

b. Dentre os pacientes que atingiram remissão, comparar a frequência dos polimorfismos entre pacientes que apresentaram recaída com os que não apresentaram recaída.

c. Verificar a frequência dos polimorfismo em pacientes com óbito precoce e comparar com a população normal.

Material e Métodos

1. Casuística:

As amostras de DNA foram obtidas a partir de sangue periférico de pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. Foram convidados a participar do estudo pacientes com diagnóstico preciso de mielodisplasia e leucemia aguda, e no caso de pacientes com SMD, subtipo AR (FAB), em acompanhamento em nosso serviço por pelo menos 6 meses. Os diagnósticos foram realizados com base em critérios clínicos e morfológicos, utilizados em nosso serviço há pelo menos 15 anos, com exclusão de causas como carências vitamínicas, doenças inflamatórias, infecciosas, hepáticas, renais, endócrinas e outras neoplasias. As amostras foram coletadas entre o período de Fevereiro de 2009 a Dezembro de 2010. Foi incluído um total de 158 pacientes, dentre esses, 68 com diagnóstico de SMD e 90 com diagnóstico de leucemia aguda, sendo 66 LMA e 24 LLA. As características dos pacientes com SMD e com leucemia aguda estão descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Nos pacientes com SMD, progressão foi definida como mudança de categoria na classificação WHO ou IPSS por uma de maior risco e em leucemias agudas remissão foi considerada tanto no primeiro quanto no segundo ciclo de tratamento dos pacientes e não remissão foi classificada em óbito precoce e falha na indução. Como grupo controle foram selecionados 100 voluntários com idade média de 37 (17-89) anos, sendo 54 do sexo masculino e 46 do sexo feminino, composto de doadores de sangue, funcionários e alunos e população sadia que compareceu a UNICAMP ou UBS (Unidade básica de saúde) para avaliação de rotina e sem doenças hematológicas.

Tabela 1. Características dos pacientes com diagnóstico de SMD.

	Número
Pacientes	68
Progressão (%)	20(29)
Idade media dos pacientes com progressão	68
Sexo	
Masculino/Feminino	38/30
Idade média (Max-Min)	61(22-91)
WHO	
CRDU/CRDM/ARSA	9/37/1
-5q/AREB-1/AREB-2	3/10/8
IPSS	
baixo-risco/INT-1	31/25
alto-risco/INT-2	6/4
não avaliável	2

Abreviações: -5q: SMD associada com deleção isolada no cromossomo 5q; AREB-1: Anemia refratária com excesso de blastos-1; AREB-2: Anemia refratária com excesso de blastos-2; ARSA: Anemia refratária com sideroblastos em anel; CRDM: Citopenia refratária com displasia multilinear; CRDU: Citopenia refratária com displasia unilinear; INT-1: Intermediário-1; INT-2: Intermediário-2; IPSS: *International Prognostic Scoring System*; Max: Máximo; Min: Mínimo; SMD: Síndrome mielodisplásica; WHO: *World Health Organization*.

Tabela 2. Características dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda.

	Número
Pacientes com LMA	66
Falha na indução(%)	16(24)
Óbito Precoce(%)	13(19)
Remissão(%)	37(56)
Recaída(%)	6(16)
Sexo	
Masculino/Feminino	25/41
Idade média (Max-Min)	53(20-88)
Pacientes com LLA	24
Falha na indução(%)	3(12)
Óbito Precoce(%)	0(0)
Remissão(%)	21(87)
Recaída(%)	4(19)
Sexo	
Masculino/Feminino	15/9
Idade média (Máx-Min)	36(18-72)

Abreviações: LLA: leucemia linfóide aguda; LMA: leucemia mielóide aguda. Max: Máximo; Min: Mínimo.

2. Extração do DNA a partir dos leucócitos:

O sangue periférico dos pacientes e do grupo controle foi coletado em tubos contendo EDTA. O DNA foi extraído dos leucócitos por método previamente descrito[60].

3. Identificação dos polimorfismos dos genes GSTM1 e GSTT1:

O método de PCR Multiplex foi utilizado para identificar a presença ou a ausência dos genes GSTM1 e GSTT1[61], nesse método ambos os genes GST são amplificados numa mesma reação incluindo um terceiro gene selecionado como controle interno da reação, nesse caso foi selecionado o gene da β -globina[62].

O PCR multiplex foi realizado com a utilização de uma mistura de 10x Tampão de PCR (10mM de Tris-HCl, pH 8,8), 3mM de MgCl₂, 10mM de solução com desoxirribonucleotídeos fosfatados (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 20pmol/ml de cada sequência iniciadora, 1 unidade de Taq polimerase e 200 a 500ng de DNA genômico em um volume final de 25uL[42]. A reação compreendeu uma desnaturação inicial de 95°C (3 min) seguida por 35 ciclos de incubação a 95°C (1 min), 60°C (1 min) e a 72°C (1 min), com extensão final de 72°C por 10 minutos. Foram obtidos fragmentos de 273pb, 480pb e 630pb para os genes GSTM1, GSTT1 e β-globina respectivamente. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídio e a deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 foram identificadas pela ausência das bandas de 273pb e 480pb respectivamente (Figura 2).

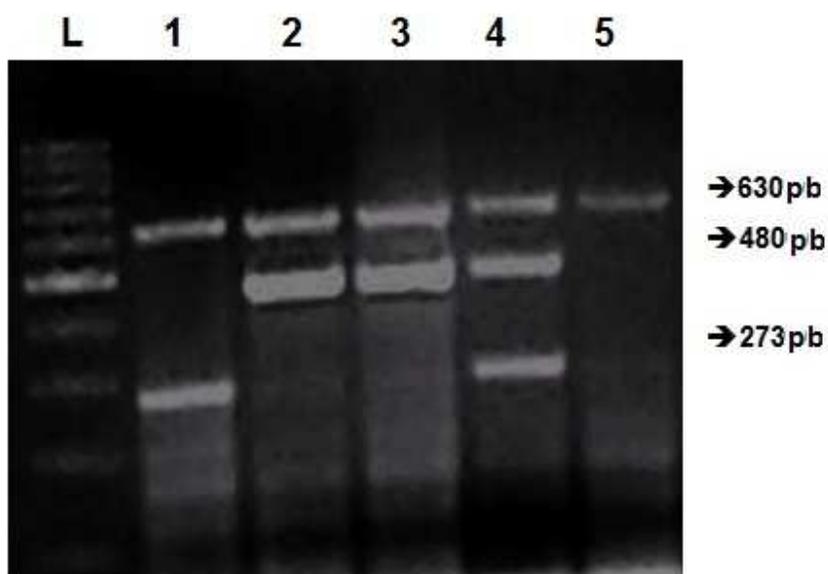


Figura 2. Identificação das deleções de GSTM1 e GSTT1. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio contendo os produtos da reação de PCR Multiplex de 630pb, 480pb e 273pb que correspondem aos genes β-globina, controle interno, e a presença normal dos alelos GSTT1 e GSTM1 respectivamente. L indica o marcador de 100 pb, O indivíduo 1 possui deleção homocigota de GSTT1, os indivíduos 2 e 3 possuem deleção homocigota de GSTM1, o indivíduo 4 não possui deleção e o indivíduo 5 possui deleção homocigota de ambos os alelos GSTM1 e GSTT1.

4. Identificação dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T

Para a análise dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T foi realizada a reação de PCR-RFLP (Reação de PCR seguida por digestão enzimática), contendo 10x Tampão de PCR (10mM de Tris-HCl, pH 8,8), 3mM de MgCl₂, 10mM de solução com desoxirribonucleotídeos fosfatados (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 20pmol/ml de cada sequência iniciadora, 1 unidade de Taq polimerase e 200 a 500ng de DNA genômico em um volume final de 50 uL.

4.1 Polimorfismo CYP2B6 G15631T:

A reação compreendeu uma desnaturação inicial de 94°C (5 min) seguida por 37 ciclos de incubação a 94°C (1 min), 58°C (1 min) e a 72°C (3 min), com extensão final de 72°C por 10 minutos[31]. O produto obtido foi um fragmento de 578pb (Figura 3).



Figura 3. PCR para detecção do polimorfismo CYP2B6 G15631T. Produto de 578pb fracionado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio que corresponde a região do polimorfismo CYP2B6 G15631T.

Um volume de 10uL do produto de PCR obtido foi digerido com 10 unidades da enzima de restrição *FastDigest BseNI* (Fermentas#FD0884) a 65°C por 15 minutos. Após a digestão indivíduos normais GG apresentam 2 bandas, de 518pb e 60 pb; indivíduos heterozigotos GT apresentam 3 bandas, de 578pb, 518pb e 60pb; e indivíduos homozigotos polimórficos TT apresentam apenas uma banda de 578pb. A banda de 60pb é difícil de ser

visualizada em gel de agarose mas não é necessária para a diferenciação dos genótipos (Figura 4).

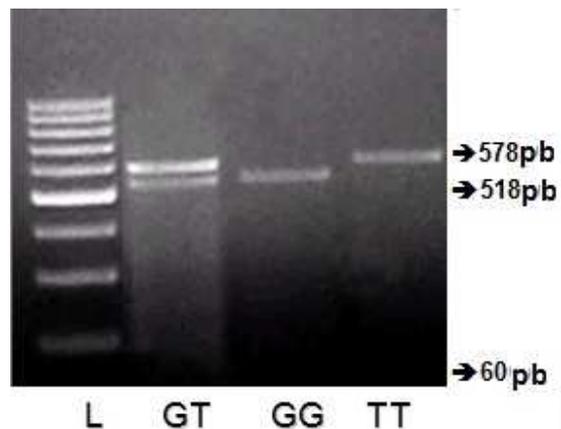


Figura 4. Identificação do polimorfismo CYP2B6 G15631T. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio, contendo os produtos da reação de digestão com a enzima de restrição *FastDigest BseNI*. Na figura, L indica o marcador de DNA de 100pb, o indivíduo heterozigoto GT está representado pela presença das bandas de 578pb, 518pb e 60pb. O indivíduo homozigoto normal GG está representado pela presença das bandas 518pb e 60pb. O indivíduo homozigoto polimórfico TT está representado pela presença de uma única banda de 578pb.

4.2 Polimorfismo NQO1 C609T:

A reação compreendeu uma desnaturação inicial de 94°C (3 min) seguida por 35 ciclos de incubação a 94°C (1 min), 65°C (1 min) e a 72°C (1 min), com extensão final de 72°C por 5 minutos[63]. O produto obtido foi um fragmento de 166pb (Figura 5).



Figura 5. PCR para detecção do polimorfismo NQO1 C609T. Produto de 166pb fracionado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio que corresponde a região do polimorfismo NQO1 C609T.

Um volume de 10uL do produto de PCR obtido foi digerido com 10 unidades da enzima de restrição *FastDigest HinfI* (Fermentas#FD0804) a 37°C por 15 minutos. Após a digestão indivíduos normais CC apresentaram 1 banda de 166 pb; indivíduos heterozigotos CT apresentaram 3 bandas, de 166pb, 103pb e 63pb; e indivíduos homozigotos polimórficos TT apresentaram duas bandas de 103pb e 63pb. A banda de 63pb é difícil de ser visualizada em gel de agarose mas não é necessária para a diferenciação dos genótipos. (Figura 6).

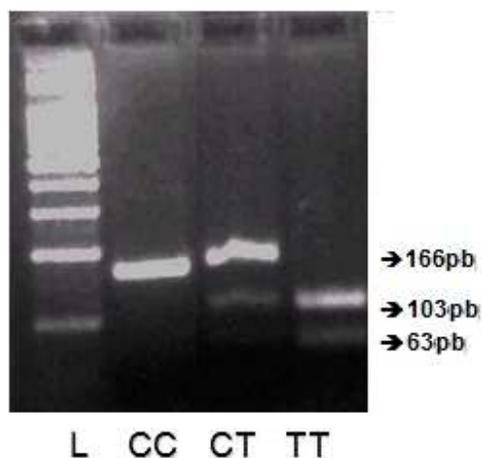


Figura 6. Identificação do polimorfismo NQO1 C609T. Gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio, contendo os produtos da reação de digestão com a enzima de restrição *FastDigest HinfI*. Na figura, L indica o marcador de DNA de 100pb, o indivíduo homozigoto normal CC está representado pela presença de uma única banda de 166pb, o indivíduo heterozigoto CT está representado pela presença das bandas de 166pb, 103pb e 63pb. O indivíduo homozigoto polimórfico TT está representado pela presença das bandas de 103pb e 63pb.

4.3 Polimorfismo MDR-1 C3435T:

A reação compreendeu uma desnaturação inicial de 94°C (5 min) seguida por 35 ciclos de incubação a 94°C (30s), 58°C (30s) e a 72°C (30s), com extensão final de 72°C por 5 minutos[58]. O produto obtido foi um fragmento de 249pb (Figura 7).



Figura 7. PCR para detecção do polimorfismo MDR-1 C3435T. Produto de 249pb fracionado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio que corresponde a região do polimorfismo MDR-1 C3435T.

Um volume de 10uL do produto de PCR obtido forai digerido com 10 unidades da enzima de restrição *FastDigest Sau3AI* (Fermentas#FD0784) a 37°C por 15 minutos. Após a digestão indivíduos normais CC apresentaram 2 bandas de 158 pb e 91pb; indivíduos heterozigotos CT apresentaram 3 bandas, de 249pb, 158pb e 91pb; e indivíduos homozigotos polimórficos TT apresentaram apenas uma banda de 249pb. A banda de 91pb é difícil de ser visualizada em gel de agarose, mas não é necessária para a diferenciação dos genótipos (Figura 8).

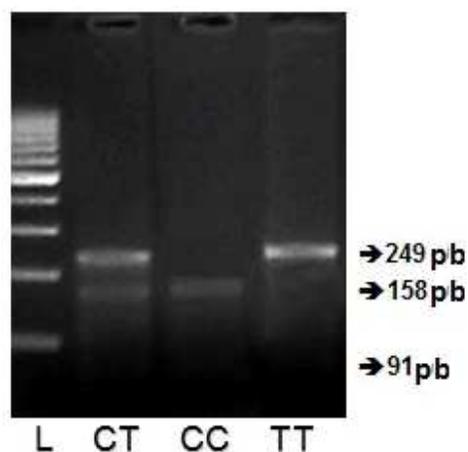


Figura 8. Identificação do polimorfismo MDR-1 C3435T. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio, contendo os produtos da reação de digestão com a enzima de restrição *FastDigest Sau3AI*. Na figura, L indica o marcador de DNA de 100pb, o indivíduo heterozigoto CT está representado pela presença das bandas de 249pb, 158pb e 91pb. O indivíduo homozigoto normal CC está representado pela presença das bandas de 158pb e 91pb. O indivíduo homozigoto polimórfico TT está representado pela presença de uma única banda de 249pb.

Tabela 3. Sequência dos iniciadores utilizados para o rastreamento dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T.

Genes	Iniciadores
GSTM1	Sense: 5'-CTGCCCTACTTGATTGATGGG-3' Antissense: 5'-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3'
GSTT1	Sense: 5'-TCCCTTACTGGTCCTCACATTC-3' Antissense: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
β -Globina	Sense: 5'-ATACAATGTATC ATGCCTCTTTGCACC-3' Antissense: 5'-GTATTTTCCCAAGGTTTGAAGTAGCTC-3'
CYP2B6	Sense: 5'-CTGTGTCCTTGACCTGCTGC-3' Antissense: 5'-TCCAGGAGCAGAATAGAC ATGAAG-3'
NQO1	Sense: 5'-CCTCTCT GTGCTTTCTGTATCCT-3' Antissense: 5'-GTGTCTCATCCCAAATATTCTC-3'
MDR-1	Sense: 5'-ATGGGCTCCGAGCACACCTG-3' Antissense: 5'-AGGCAGTGAAGGC-3'

5. Análise Estatística:

A comparação entre as frequências dos polimorfismos tanto em pacientes com grupo controle quanto em pacientes com leucemia aguda que atingiram ou não remissão e pacientes com SMD que apresentaram ou não progressão foi realizada através do teste exato de Fisher e regressão logística univariada e multivariada. Foi adotada uma significância de 5% ($P < 0,05$).

Para analisar as deleções dos genes GSTM1 e GSTT1 agrupamos ambas em deleções de GST.

De acordo com Stevens[64] para o cálculo de regressão logística ter validade são necessários 15 indivíduos para cada variável analisada, como estudamos 4 variáveis (CYP2B6 G15631T, Deleções de GST, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T) o número mínimo necessário seria de 60 indivíduos.

Para os cálculos de resposta ao tratamento em leucemias agudas, LLA e LMA foram agrupados em leucemias aguda. Também foi feito o cálculo somente para LMA, excluindo a análise separada de LLA devido ao seu baixo número amostral.

Resultados

1. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T no grupo controle e nos pacientes com SMD, LMA e LLA e verificação de equilíbrio de Hardy-Weinberg

Identificamos a frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T em pacientes com LMA, LLA e SMD e no grupo controle (tabela 4). Para avaliar se as populações estavam em equilíbrio Hardy – Weinberg calculamos o X^2 . Se $X^2 < 3,84$ há equilíbrio. Encontramos desequilíbrio no grupo controle para o polimorfismo MDR-1 C3435T e uma forte tendência de desequilíbrio em pacientes com SMD para o mesmo polimorfismo.

Tabela 4. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T no grupo controle e nos pacientes com SMD, LMA e LLA e equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Genótipo	Controle		SMD		LMA		LLA	
	n(%)	χ^2	n(%)	χ^2	n(%)	χ^2	n(%)	χ^2
CYP2B6								
G15632T								
GG	53(58)		35(51)		37(56)		15(63)	
GT	33(36)		26(39)		24(36)		07(29)	
TT	05(06)	0,002	07(10)	0,426	05(08)	0,160	02(08)	0,730
GST								
Normal	77(80)		48(70)		51(77)		18(75)	
Deletado	19(20)	N/A	20(30)	N/A	15(23)	N/A	06(25)	N/A
NQO1 C609T								
CC	73(73)		46(68)		41(62)		18(75)	
CT	25(25)		19(28)		23(35)		05(21)	
TT	02(02)	0,007	03(04)	0,322	02(03)	0,322	01(04)	0,644
MDR-1								
C3435T								
CC	39(39)		19(28)		19(29)		10(42)	
CT	30(30)		26(38)		29(44)		09(37)	
TT	31(31)	15,692*	23(34)	3,680	18(27)	0,966	05(21)	1,119

Abreviações: LLA: Leucemia linfóide aguda; LMA: Leucemia mielóide aguda; SMD: Síndromes mielodisplásicas. *Desequilíbrio Hardy-Weinberg.

2. Associação dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T com o risco de leucemias agudas, LMA, LLA e SMD

Para avaliar se os polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T influenciam o risco de leucemias agudas, LMA, LLA e SMD, nós comparamos a frequência dos polimorfismos entre os pacientes com o grupo controle (tabela 5). Não encontramos diferença estatística entre a frequência dos polimorfismos entre pacientes e o grupo controle, indicando que esses polimorfismos não influenciam o risco de leucemias agudas, LMA, LLA e SMD.

Tabela 5. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T em leucemias agudas, LMA, LLA, SMD e grupo controle comparada por análise de regressão logística univariada.

Genótipo	Controle	SMD	P	LMA	P	LLA	P	LA	P
	n(%)	(n=68) n(%)		(n=66) n(%)		(n=24) n(%)		(n=90) n(%)	
CYP2B6 G15632T									
GG	53(58)	35(51)		37(56)		15(63)		52(58)	
GT	33(36)	26(39)	0.474	24(36)	0.967	07(29)	0.484	31(34)	0.797
TT	05(06)	07(10)	0.212	05(08)	0.618	02(08)	0.750	07(08)	0.606
GT+TT	38(42)	33(49)	0.302	29(44)	0.848	09(37)	0.604	38(42)	0.950
GST									
Normal	77(80)	48(70)		51(77)		18(75)		69(77)	
Deletado	19(20)	20(30)	0.156	15(23)	0.688	06(25)	0.644	21(23)	0.612
NQO1 C609T									
CC	73(73)	46(68)		41(62)		18(75)		59(66)	
CT	25(25)	19(28)	0.601	23(35)	0.177	05(21)	0.634	28(31)	0.368
TT	02(02)	03(04)	0.352	02(03)	0.587	01(04)	0.602	03(03)	0.529
CT+TT	27(27)	22(32)	0.454	24(38)	0.160	06(25)	0.761	31(34)	0.314
MDR-1 C3435T									
CC	39(39)	19(28)		19(29)		10(42)		29(32)	
CT	30(30)	26(38)	0.137	29(44)	0.059	09(37)	0.606	38(42)	0.090
TT	31(31)	23(34)	0.284	18(27)	0.667	05(21)	0.438	23(26)	0.995
CT+TT	61(61)	49(72)	0.141	47(71)	0.158	14(58)	0.927	61(68)	0.280

Abreviações: LA: Leucemias agudas; LLA: Leucemia linfóide aguda; LMA: Leucemia mielóide aguda; SMD: Síndromes mielodisplásicas.

3. Influência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T na progressão em síndromes mielodisplásicas

Para avaliar a influência dos polimorfismos na progressão de pacientes com mielodisplasia comparamos a frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T entre pacientes que apresentaram progressão e pacientes que não apresentaram progressão (tabela 6). Encontramos uma maior frequência de deleções de GST em pacientes que progrediram comparada a dos pacientes que não progrediram: 50% e 21% (P=0,019). Encontramos também uma menor frequência do alelo polimórfico T do polimorfismo MDR-1 C3435T em pacientes que progrediram comparada a dos pacientes que não progrediram: 50% e 81% (P=0,012). Na análise multivariada novamente encontramos diferença estatística da taxa de progressão nos polimorfismo MDR-1 C3435T e deleções de GST(tabela 7). Não foi encontrada diferença estatística entre os polimorfismos CYP2B6 G15631 e NQO1 C609T e a taxa de progressão em pacientes com SMD. Também não foi encontrada diferença estatística entre os polimorfismos e a classificação IPSS (tabela 6).

Tabela 6. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T em progressão e baixo e alto risco na classificação IPSS de pacientes com SMD comparada por análise de regressão logística univariada.

Genótipo	Sem Progressão (n=48) n(%)	Progressão (n=20) n(%)	P	IPSS baixo/INT-1 (n=56) n(%)	IPSS alto/INT-2 (n=10) n(%)	P
CYP2B6 G15631T						
GG	24(50)	11(55)		28(50)	04(40)	
GT+TT	24(50)	09(45)	0.999	28(50)	06(60)	0.562
GST						
Normal	38(79)	10(50)		40(71)	06(60)	
Deletado	10(21)	10(50)	0.019*	16(29)	04(40)	0.472
NQO1 C609T						
CC	30(62)	16(80)		16(29)	03(30)	
CT+TT	18(38)	04(20)	0.167	40(71)	07(70)	0.982
MDR-1 C3435T						
CC	09(19)	10(50)	0.012*	39(70)	07(70)	
C+TT	39(81)	10(50)		17(30)	03(30)	0.927

Abreviações: IPSS: *Internacional Prognostic Score System*; INT: Intermediário. *P<0,05.

Tabela 7. Análise de regressão logística multivariada para progressão em mielodisplasia.

Polimorfismo	Genótipo	P	OR	IC 95%
GST	Deletado	0.019	3.80	1.24-11.64
MDR-1 C3435T	CT+TT	0.012	0.23	0.07-0.72

Abreviações: IC: Intervalo de confiança; OR: Odds Ratio.

4. Influência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T na resposta ao tratamento de leucemias agudas

Para avaliar a influência dos polimorfismos na resposta ao tratamento de pacientes com leucemias aguda em geral ou somente LMA, comparamos a frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T entre pacientes que atingiram remissão e pacientes que não atingiram remissão (tabela 8). Não observamos diferença significativa na frequência destes alelos se compararmos pacientes que tiveram falha de indução com os que entraram em remissão. Entretanto, encontramos uma tendência, na nossa amostra, de maior frequência do alelo polimórfico NQO1 C609T em pacientes com leucemias agudas que não atingiram remissão comparada aos pacientes que atingiram remissão ($P= 0,093$) ou ao grupo de pessoas normais ($P=0,101$). Analisando o grupo de pacientes com LMA isoladamente, observamos a mesma tendência ($P= 0,125$ e $P=0,080$ respectivamente) . Também não foi encontrada diferença estatística entre os polimorfismos e a taxa de recaída em leucemias agudas e LMA isoladamente (tabela 8). Em relação aos pacientes que tiveram óbito precoce, observamos que houve tendência, na nossa amostra, à maior frequência desse mesmo polimorfismo NQO1 C609T em relação à população normal ($P=0,058$) (Tabela 9).

Tabela 8. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T em falha de indução, remissão e recaída em pacientes com leucemias agudas, em geral, ou LMA isoladamente e no grupo controle comparadas por teste exato de Fisher.

Genótipo	LMA		Controle		LMA		LMA		LA		Controle		LA		LA	
	Falha na indução (16) n(%)		P	Remissão (37) (%)	P	Recaída (6)n(%)	P	Falha na indução (19) n(%)		P	Remissão (58)n(%)	P	Recaída (10)(%)	P		
CYP2B6																
G15631T																
GG	09(56)	53(58)		21(57)		03(50)		11(58)	53(58)		34(59)		05(50)			
GT+TT	07(44)	38(42)	1.00	16(43)	1.00	03(50)	1.00	08(42)	38(42)	1.00	24(41)	1.000	05(50)	0.733		
GST																
Normal	13(81)	77(80)		27(73)		06(100)		16(84)	77(80)		42(72)		09(90)			
Deletado	03(19)	19(20)	1.00	10(27)	0.731	00(00)	0.308	03(16)	19(20)	1.00	16(28)	0.372	01(10)	0.210		
NQO1 C609T																
CC	08(50)	73(73)		27(73)		04(67)		10(52)	73(73)		43(74)		06(60)			
CT+TT	08(50)	27(27)	0.080	10(27)	0.125	02(33)	1.00	09(48)	27(27)	0.101	15(26)	0.093	04(40)	0.440		
MDR-1																
C3435T																
CC	05(31)	39(39)		08(21)		00(00)		06(32)	39(39)		17(29)		01(10)			
CT+TT	11(69)	61(61)	0.782	29(79)	0.499	06(100)	0.574	13(68)	61(61)	0.613	41(71)	1.000	09(90)	0.269		

Abreviações: LA: Leucemias agudas; LMA: Leucemia mielóide aguda.

Tabela 9. Frequência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T em pacientes que com leucemias agudas, em geral, e LMA isoladamente que apresentaram óbito precoce e no grupo controle comparadas por teste exato de Fisher.

Genótipo	LMA		P	LA		P
	Óbito precoce (13) n(%)	Controle 53(58)		Óbito precoce (13) n(%)	Controle 38(42)	
CYP2B6 G15631T						
GG	07(54)	53(58)		07(54)	53(58)	
GT+TT	06(46)	38(42)	0.772	06(46)	38(42)	0.772
GST						
Normal	11(85)	77(80)		11(85)	77(80)	
Deletado	02(15)	19(20)	1.000	02(15)	19(20)	1.000
NQO1 C609T						
CC	06(46)	73(73)		06(46)	73(73)	
CT+TT	07(54)	27(27)	0.058	07(54)	27(27)	0.058
MDR-1 C3435T						
CC	06(46)	61(61)		06(46)	61(61)	
CT+TT	07(54)	39(39)	0.373	07(54)	39(39)	0.373

Abreviações: LA: Leucemias agudas; LMA: Leucemia mielóide aguda.

Discussão

Enzimas metabolizadoras de drogas são responsáveis pelo metabolismo de vários agentes quimioterápicos e muitas dessas enzimas são geneticamente polimórficas. Esses polimorfismos influenciam a atividade enzimática e poderiam modificar a resposta ao tratamento, a resistência a drogas e aumentar o risco de desenvolver câncer. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi investigar a influência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T no risco de leucemias agudas (LMA e LLA) e mielodisplasia (SMD); na resposta ao tratamento de pacientes com leucemias agudas; e na progressão de pacientes com SMD.

Para investigar a influência dos polimorfismos no risco de leucemia aguda, foi comparada a frequência dos polimorfismos em pacientes e no grupo controle. Não encontramos diferença estatística entre os pacientes e o grupo controle sugerindo que esses polimorfismos não estão associados ao risco dessas doenças, porém os dados na literatura são contraditórios (Tabela 10).

Tabela 10. Dados encontrados na literatura sobre a relação entre os polimorfismos e o risco de LMA, LLA, Leucemias agudas, no geral, e SMD.

	Risco	Não risco
<u>CYP2B6 G15631T</u>	44 LLA Turquia 36 LMA Turquia 164 LMA China 96 LLA China	40 SMD China
<u>Deleções GST</u>	94 LMA Turquia 177 LLA EUA 38 LMA Brasil 557 LA Europa 52 SMD China	156 LLA Turquia 94 LMA Turquia 49 SMD Brasil
<u>NQO1 C609T</u>	493 LA EUA 78 SMD Espanha	273 LA Turquia 138 LLA Alemanha 275 SMD China
<u>MDR-1 C3435T</u>	113 LLA Polônia 290 LA Índia	294 LLA EUA

Abreviações: LA: Leucemias agudas; LLA: Leucemia Linfóide Aguda; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; SMD: Síndromes mielodisplásicas.

Em relação ao polimorfismo CYP2B6 G15631T não encontramos associação com o risco das doenças. Corroborando nossos resultados, um estudo anterior[35] com 40 casos de SMD em pacientes chineses também não encontrou relação entre o polimorfismo e o risco da doença. Porém, em um estudo desenvolvido na Turquia[31] com 44 pacientes de LLA e 36 com LMA e outro estudo na China[35] com 164 pacientes com LMA e 96 com LLA o polimorfismo CYP2B6 G15631T foi relacionado ao risco de leucemias agudas. Existem poucos trabalhos associando esse polimorfismo à leucemia aguda e mielodisplasia, e o trabalho desenvolvido na Turquia[31] não encontrou nenhum paciente com o genótipo TT, provavelmente o número pequeno de amostras utilizadas nesses estudo podem influenciar o resultado. Portanto, são necessários mais estudos com um número amostral maior e com etnias diversificadas para confirmar a relação do polimorfismo e o risco dessas doenças.

Já a deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 foi muito estudada e continua sendo controversa. De acordo com nossos dados, um estudo na Turquia[65] com 156 pacientes com LLA e 94 com LMA não encontrou relação entre deleção de GSTM1 e LLA e deleção de GSTT1 e leucemias agudas; Outro estudo no Brasil[42] com 49 pacientes não conseguiu relacionar as deleções de GSTM1 e GSTT1 e o risco de SMD. Porém, estudos anteriores na Turquia com 94 pacientes com LMA[65] e 177 com LLA nos Estados Unidos[12] relacionaram a deleção de GSTM1 e LMA e LLA respectivamente; 38 pacientes com LMA brasileiros[42] e 557 europeus [66] possuíam frequência significativamente maior de a deleções de GSTT1 e foram relacionados ao risco de LMA e leucemias agudas respectivamente; 52 pacientes de um estudo em chineses[67] e 13 estudos numa meta análise variada[68] encontraram relação entre o risco de SMD e a deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 respectivamente. Cabe ressaltar que as frequências de deleções de GSTM1 e GSTT1 variam muito de acordo com a etnia da população estudada[42-46].

Sobre o polimorfismo NQO1 C609T nossos resultados demonstraram que não há relação com o risco de leucemia aguda e mielodisplasia, outros dois estudos prévios com 273 pacientes Turcos com leucemia aguda e 138 alemães com LLA, e 52 e 275 chineses com SMD não encontraram relação entre o polimorfismo e o risco de leucemias agudas, LLA e mielodisplasia respectivamente[51, 67, 69, 70]. Entretanto, encontramos na literatura o estudo de 493 pacientes de leucemia aguda dos Estados Unidos sendo 57 com anormalidades genéticas; e o estudo de 78 pacientes da Espanha com mielodisplasia

secundária a tratamento onde o polimorfismo NQO1 C609T foi associado ao risco de leucemia aguda e mielodisplasia respectivamente[52, 71, 72].

No nosso estudo também não encontramos relação entre o polimorfismo MDR-1 C3435T e o risco de leucemia aguda e mielodisplasia. Corroborando nossos dados, tem um estudo em 294 pacientes com LLA na Califórnia/Estados Unidos[73]. Entretanto encontramos na literatura um estudo com 113 crianças com LLA na Polônia[59] e outro com 290 pacientes Indianos com leucemia aguda[56] onde foi relatada associação entre o polimorfismo e risco de LLA e LMA respectivamente. Esse é o primeiro estudo sobre o polimorfismo MDR-1 C3435T e o risco de mielodisplasia primária. Encontramos na literatura apenas um estudo prévio sobre o polimorfismo MDR-1 C3435T e risco de mielodisplasia secundária[74].

A etiologia exata das leucemias agudas e mielodisplasias ainda é desconhecida, mas sabe-se que diversos fatores ambientais como radiação, compostos aromáticos, pesticidas, infecções, álcool, cigarros e narcóticos podem contribuir para o desenvolvimento dessas doenças. Além dos fatores ambientais existem também os fatores genéticos como mutações, polimorfismos e translocações cromossômicas[35]. A interação entre esses fatores poderia explicar a discrepância dos resultados encontrados na literatura sobre o risco de leucemias e mielodisplasias. Considerando que a frequência dos polimorfismos genéticos varia de acordo com o grupo étnico estudado que a população brasileira é extremamente heterogênea, misturando nativos americanos indígenas e imigrantes da Europa, Ásia e África[42] e que os indivíduos dos diversos estudos estão expostos a diferentes fatores ambientais por serem de áreas diferentes, é possível que a susceptibilidade a leucemias e mielodisplasias varie de acordo com a população estudada. Outro fator importante a ser considerado é o número de indivíduos estudados: o tamanho pequeno das amostras pode influenciar o resultado e não representar a população real.

Para estudarmos a influência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T na progressão de síndromes mielodisplásicas, comparamos a frequências dos polimorfismos entre pacientes que apresentaram progressão e os que não apresentaram progressão. Também comparamos a frequência entre os grupos de baixo risco e intermediário-1 com os de alto risco e intermediário-2, de acordo com o

IPSS, e não encontramos diferença estatística. Também não encontramos relação entre os polimorfismos CYP2B6 G15631T e NQO1 C609T e a progressão de mielodisplasia.

Encontramos uma menor frequência do genótipo CC do polimorfismo MDR-1 C3435T em pacientes com SMD livres de progressão em comparação aos pacientes que apresentaram progressão. Em vista deste polimorfismo levar a uma menor expressão de P-glicoproteína, que desempenha um papel anti-apoptótico devido ao aumento do pH intracelular e consequente inativação das Caspases[56, 75], é possível que a presença do genótipo CC leve a maior risco de progressão para LMA secundária. Por contribuir para a maior taxa de apoptose, o polimorfismo pode ter um papel protetor contra a progressão da doença uma vez que subtipos com baixo risco de progressão estão associados a maior taxa de apoptose[10]. Esse resultado é interessante pois o polimorfismo poderia ser utilizado como fator na predisposição da evolução de mielodisplasia. Esse efeito foi descrito pela primeira vez, portanto, futuros estudos são necessários para confirmar nossa hipótese.

Também encontramos maior frequência de deleções de GST nos pacientes que apresentaram progressão comparado aos que não apresentaram progressão. Os genes GST estão envolvidos na fase 2 do metabolismo de drogas e são responsáveis pela detoxificação de drogas e dos próprios metabólitos produzidos pelas células[1]. A falta de atividade enzimática resultante da deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 poderia, possivelmente, favorecer o acúmulo de substâncias tóxicas geradas pelo metabolismo anormal das células cancerígenas, podendo aumentar a toxicidade celular e esse acúmulo poderia causar danos na molécula de DNA. O acúmulo de mutações causadas por dano no DNA juntamente com outras mutações e fatores epigenéticos estão associados a maior risco de progressão da doença. Como estes são os primeiros resultados sobre a progressão de SMD, mais estudos com maior número de pacientes são necessários para confirmar estes resultados.

Para verificar se os polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T influenciam a resposta ao tratamento da leucemia aguda, comparamos a frequência dos polimorfismos entre os pacientes que atingiram remissão e aqueles que não atingiram devido à falha de indução, e então entre aqueles que apresentaram recaída ou não. Apesar de não ser uma diferença estatística, encontramos uma tendência a maior frequência do polimorfismo NQO1 C609T em pacientes que apresentaram falha na indução comparado aos pacientes que entraram em remissão; e não

encontramos nenhuma diferença entre esse polimorfismo e a taxa de recaída. Estes resultados se assemelham a dados publicados por Barragan e colaboradores[1] que descreveram que o polimorfismo NQO1 C609T influencia a taxa de remissão em pacientes com LMA, estando relacionado a falha de indução, mas não tem nenhuma influência após a remissão ser atingida, ou seja não tem influência na taxa de recaída em 135 pacientes da Espanha diagnosticados com LMA; e por da Silva Silveira e colaboradores[76] que também relataram menor taxa de remissão devido a falha na indução em 95 pacientes brasileiros com LLA que possuem o alelo polimórfico T. Quando analisamos o óbito precoce, encontramos a mesma tendência de maior alelo polimórfico comparado ao grupo controle. Provavelmente a causa da diferença encontrada não ter sido significativa, seja o número insuficiente de pacientes utilizados no nosso trabalho. É possível que o gene NQO1 esteja envolvido na inativação do quimioterápico, fato que explicaria sua relação com a maior taxa de falha na indução. Vale lembrar que o gene NQO1 está envolvido na fase II do metabolismo e é responsável pela detoxificação de drogas e dos metabólitos das células cancerígenas, portanto a presença do polimorfismo pode estar relacionada ao aumento da toxicidade celular. O polimorfismo também foi previamente relacionado à menor taxa de sobrevida de pacientes com LLA[77, 78], porém esse achado não foi confirmado em pacientes com LMA[79]. O metabolismo de drogas é um processo complexo e diversas enzimas estão envolvidas, sendo possível que outras enzimas não estudadas também influenciem o processo de resistência ao tratamento.

Nos nossos resultados não encontramos relação entre os polimorfismos CYP2B6 G15631, GSTM1, GSTT1 e MDR-1 e a resposta ao tratamento de leucemia aguda e a literatura mostra resultados contraditórios. Enquanto Voso e colaboradores[80] relataram resistência a quimioterapia e menor sobrevida de 106 pacientes Italianos com LMA, Chen e colaboradores[81] não encontraram relação entre as deleções de GST, fatores prognósticos e probabilidade de remissão em 177 pacientes com LLA nos Estados Unidos. Sobre o polimorfismo MDR-1 C3435T, o genótipo CC foi associado com pior prognóstico em 290 pacientes com leucemia aguda na Índia[56], o genótipo CT com menor taxa de indução em 44 pacientes com LMA na China[82] e o alelo T com maior risco de recaída em 110 pacientes com LMA na Espanha[83]; Outros estudos afirmam que não há relação entre o

polimorfismo e a sobrevida de 101 pacientes com LMA na Coréia[84] e não há relação com a resistência ao tratamento ou prognóstico de 53 pacientes com LLA na Alemanha[85].

Em conclusão, há muito se conhece que a hiperexpressão de P-glicoproteína está relacionada com pior prognóstico de pacientes com leucemias agudas e com mielodisplasias[86, 87], porém este é o primeiro estudo que investiga a relação do polimorfismo MDR-1 C3435T com risco de progressão em mielodisplasias. Os nossos resultados nos permitem concluir que esse polimorfismo desempenha um fator protetor na progressão da doença e formulamos a hipótese que o possível papel da P-glicoproteína como anti-apoptótica, possa estar contribuindo para esse resultado. Finalmente, há muito se investiga as deleções dos genes GST no risco de leucemias agudas e mielodisplasias ou no prognóstico destas doenças. Os resultados da literatura apontam para pior prognóstico de leucemias agudas nos portadores de deleção nos genes GST[80]. Porém este é o primeiro estudo que investiga a relação destes polimorfismos com a progressão das mielodisplasias e nossos resultados demonstram que as deleções favorecem a progressão da doença.

Conclusões

Esse trabalho nos permite concluir que:

1. Os polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T parecem não estar relacionados ao risco de leucemias agudas, LMA, LLA e SMD.
2. As deleções de GST e o polimorfismo MDR-1 C3435T podem estar envolvidos na progressão de SMD, onde as deleções de GST podem estar relacionadas a maior taxa de progressão e o alelo T do polimorfismo MDR-1 C3435T parece ter efeito protetor contra progressão em SMD.
3. O polimorfismo NQO1 609T apresenta uma tendência a influenciar menor taxa de indução comparado aos pacientes que apresentaram remissão em leucemias agudas em geral e somente em LMA.
4. O polimorfismo NQO1 C609T apresenta uma tendência a maior relação de óbito precoce comparado com o grupo controle.
5. Até o momento, este é o primeiro estudo entre o polimorfismo MDR-1 C3435T e risco de mielodisplasia primária.

Esses resultados geraram a produção de um manuscrito submetido para a publicação (Anexo II).

Referências

1. Barragan E, Collado M, Cervera J, Martin G, Bolufer P, Roman J, Sanz MA: **The GST deletions and NQO1*2 polymorphism confers interindividual variability of response to treatment in patients with acute myeloid leukemia.** *Leuk Res* 2007, **31**(7):947-953.
2. List AF, Vardiman J, Issa JP, DeWitte TM: **Myelodysplastic syndromes.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004:297-317.
3. Mufti GJ: **Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome.** *Best Pract Res Clin Haematol* 2004, **17**(4):543-557.
4. Jadersten M, Malcovati L, Dybedal I, Della Porta MG, Invernizzi R, Montgomery SM, Pascutto C, Porwit A, Cazzola M, Hellstrom-Lindberg E: **Erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor treatment associated with improved survival in myelodysplastic syndrome.** *J Clin Oncol* 2008, **26**(21):3607-3613.
5. Khan AM, Komrokji RS, Haddad RY: **Myelodysplastic syndromes: what a primary care physician needs to know.** *Dis Mon* 2010, **56**(8):468-478.
6. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: **Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes.** *Br J Haematol* 1982, **51**(2):189-199.
7. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD: **The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms.** *Blood* 2002, **100**(7):2292-2302.
8. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A *et al*: **The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.** *Blood* 2009, **114**(5):937-951.
9. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D *et al*: **International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes.** *Blood* 1997, **89**(6):2079-2088.
10. Nolte F, Hofmann WK: **Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes.** *Ann Hematol* 2008, **87**(10):777-795.
11. Testa U, Riccioni R: **Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia.** *Haematologica* 2007, **92**(1):81-94.

12. Krajcinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D: **Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms.** *Blood* 1999, **93**(5):1496-1501.
13. Disperati P, Ichim CV, Tkachuk D, Chun K, Schuh AC, Wells RA: **Progression of myelodysplasia to acute lymphoblastic leukaemia: implications for disease biology.** *Leuk Res* 2006, **30**(2):233-239.
14. Sanchez JF: **Treatment of myelodysplastic syndromes in elderly patients.** *Adv Ther* 2011, **28 Suppl 2**:1-9.
15. De Witte T, Muus P, De Pauw B, Haanen C: **Intensive antileukemic treatment of patients younger than 65 years with myelodysplastic syndromes and secondary acute myelogenous leukemia.** *Cancer* 1990, **66**(5):831-837.
16. Burnett A, Wetzler M, Lowenberg B: **Therapeutic advances in acute myeloid leukemia.** *J Clin Oncol* 2011, **29**(5):487-494.
17. Feldman EJ, Gergis U: **Management of Refractory Acute Myeloid Leukemia: Re-induction Therapy or Straight to Transplantation?** *Curr Hematol Malig Rep* 2011.
18. Tesfai Y, Ford J, Carter KW, Firth MJ, O'Leary RA, Gottardo NG, Cole C, Kees UR: **Interactions between acute lymphoblastic leukemia and bone marrow stromal cells influence response to therapy.** *Leuk Res* 2011.
19. Pui CH, Robison LL, Look AT: **Acute lymphoblastic leukaemia.** *Lancet* 2008, **371**(9617):1030-1043.
20. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Howard SC, Hudson MM *et al*: **Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital.** *Blood* 2004, **104**(9):2690-2696.
21. Hatagima A: **Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility.** *Cad Saude Publica* 2002, **18**(2):357-377.
22. Xu C, Li CY, Kong AN: **Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics.** *Arch Pharm Res* 2005, **28**(3):249-268.

23. Nebert DW, Dalton TP: **The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(12):947-960.
24. Meyer UA: **Overview of enzymes of drug metabolism.** *J Pharmacokinet Biopharm* 1996, **24**(5):449-459.
25. Wang H, LeCluyse EL: **Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes.** *Clin Pharmacokinet* 2003, **42**(15):1331-1357.
26. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C: **Silent (synonymous) SNPs: should we care about them?** *Methods Mol Biol* 2009, **578**:23-39.
27. Lin J, Schyschka L, Muhl-Benninghaus R, Neumann J, Hao L, Nussler N, Dooley S, Liu L, Stockle U, Nussler AK *et al*: **Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism.** *Arch Toxicol* 2011.
28. Singh D, Kashyap A, Pandey RV, Saini KS: **Novel advances in cytochrome P450 research.** *Drug Discov Today* 2011, **16**(17-18):793-799.
29. Gonzalez FJ, Nebert DW: **Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation.** *Trends Genet* 1990, **6**(6):182-186.
30. Jacob RM, Johnstone EC, Neville MJ, Walton RT: **Identification of CYP2B6 sequence variants by use of multiplex PCR with allele-specific genotyping.** *Clin Chem* 2004, **50**(8):1372-1377.
31. Berkoz M, Yalin S: **Association of CYP2B6 G15631T polymorphism with acute leukemia susceptibility.** *Leuk Res* 2009, **33**(7):919-923.
32. Daly AK: **Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes.** *Fundam Clin Pharmacol* 2003, **17**(1):27-41.
33. Palma M, Hansson L, Choudhury A, Nasman-Glaser B, Eriksson I, Adamson L, Rossmann E, Widen K, Horvath R, Kokhaei P *et al*: **Vaccination with dendritic cells loaded with tumor apoptotic bodies (Apo-DC) in patients with chronic lymphocytic leukemia: effects of various adjuvants and definition of immune response criteria.** *Cancer Immunol Immunother* 2011.

34. Wang J, Sonnerborg A, Rane A, Josephson F, Lundgren S, Stahle L, Ingelman-Sundberg M: **Identification of a novel specific CYP2B6 allele in Africans causing impaired metabolism of the HIV drug efavirenz.** *Pharmacogenet Genomics* 2006, **16**(3):191-198.
35. Yuan ZH, Liu Q, Zhang Y, Liu HX, Zhao J, Zhu P: **CYP2B6 gene single nucleotide polymorphisms and leukemia susceptibility.** *Ann Hematol* 2011, **90**(3):293-299.
36. Hofmann MH, Blievernicht JK, Klein K, Saussele T, Schaeffeler E, Schwab M, Zanger UM: **Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver.** *J Pharmacol Exp Ther* 2008, **325**(1):284-292.
37. Rushmore TH, Kong AN: **Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes.** *Curr Drug Metab* 2002, **3**(5):481-490.
38. Kelly KM, Perentesis JP: **Polymorphisms of drug metabolizing enzymes and markers of genotoxicity to identify patients with Hodgkin's lymphoma at risk of treatment-related complications.** *Ann Oncol* 2002, **13 Suppl 1**:34-39.
39. Morel M, Ngadin AA, Droux M, Jacquot JP, Gelhaye E: **The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium.** *Cell Mol Life Sci* 2009, **66**(23):3711-3725.
40. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR: **Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion.** *J Biol Chem* 1998, **273**(6):3517-3527.
41. Parl FF: **Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk.** *Cancer Lett* 2005, **221**(2):123-129.
42. Arruda VR, Lima CS, Grignoli CR, de Melo MB, Lorand-Metze I, Alberto FL, Saad ST, Costa FF: **Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) gene defects.** *Eur J Haematol* 2001, **66**(6):383-388.

43. Hayes JD, Pulford DJ: **The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995, **30**(6):445-600.
44. Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M, Xu X *et al*: **Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta.** *Carcinogenesis* 1995, **16**(5):1243-1245.
45. Warwick A, Sarhanis P, Redman C, Pemble S, Taylor JB, Ketterer B, Jones P, Alldersea J, Gilford J, Yengi L *et al*: **Theta class glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cervical neoplasia: interactions with GSTM1, CYP2D6 and smoking.** *Carcinogenesis* 1994, **15**(12):2841-2845.
46. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB: **Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism.** *Biochem J* 1994, **300** (Pt 1):271-276.
47. Bolufer P, Barragan E, Collado M, Cervera J, Lopez JA, Sanz MA: **Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression.** *Leuk Res* 2006, **30**(12):1471-1491.
48. Bock CH, Wenzlaff AS, Cote ML, Land SJ, Schwartz AG: **NQO1 T allele associated with decreased risk of later age at diagnosis lung cancer among never smokers: results from a population-based study.** *Carcinogenesis* 2005, **26**(2):381-386.
49. Harth V, Donat S, Ko Y, Abel J, Vetter H, Bruning T: **NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 codon 609 polymorphism and its association to colorectal cancer.** *Arch Toxicol* 2000, **73**(10-11):528-531.
50. Traver RD, Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Danenberg PV, Ross D, Gibson NW: **NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity.** *Cancer Res* 1992, **52**(4):797-802.

51. Sirma S, Agaoglu L, Yildiz I, Cayli D, Horgusluoglu E, Anak S, Yuksel L, Unuvar A, Celkan T, Apak H *et al*: **NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 null genotype is not associated with pediatric de novo acute leukemia.** *Pediatr Blood Cancer* 2004, **43**(5):568-570.
52. Smith MT, Wang Y, Kane E, Rollinson S, Wiemels JL, Roman E, Roddam P, Cartwright R, Morgan G: **Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults.** *Blood* 2001, **97**(5):1422-1426.
53. Lin JH, Yamazaki M: **Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications.** *Clin Pharmacokinet* 2003, **42**(1):59-98.
54. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM: **Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999, **39**:361-398.
55. Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P: **Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A.** *J Clin Invest* 1995, **96**(4):1698-1705.
56. Rao DN, Anuradha C, Vishnupriya S, Sailaja K, Surekha D, Raghunadharao D, Rajappa S: **Association of an MDR1 gene (C3435T) polymorphism with acute leukemia in India.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2010, **11**(4):1063-1066.
57. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M *et al*: **Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(7):3473-3478.
58. Rodrigues FF, Santos RE, Melo MB, Silva MA, Oliveira AL, Rozenowicz RL, Ulson LB, Aoki T: **Correlation of polymorphism C3435T of the MDR-1 gene and the response of primary chemotherapy in women with locally advanced breast cancer.** *Genet Mol Res* 2008, **7**(1):177-183.
59. Jamroziak K, Mlynarski W, Balcerczak E, Mistygacz M, Trelinska J, Mirowski M, Bodalski J, Robak T: **Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an**

- impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Eur J Haematol* 2004, **72**(5):314-321.
60. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr.: **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** *Nucleic Acids Res* 1991, **19**(19):5444.
61. Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, Bell DA: **Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect.** *Lancet* 1996, **347**(8997):295-297.
62. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* 1988, **239**(4839):487-491.
63. Wang B, Jin F, Xie Y, Tang Y, Kan R, Zheng C, Yang Z, Wang L: **Association analysis of NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene 609 C/T polymorphism with Alzheimer's disease.** *Neurosci Lett* 2006, **409**(3):179-181.
64. Stevens J (ed.): **Applied Multivariate Statistics for the Social Sciences**, 2 edn. New Jersey; 1992.
65. Aydin-Sayitoglu M, Hatirnaz O, Erensoy N, Ozbek U: **Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias.** *Am J Hematol* 2006, **81**(3):162-170.
66. Rollinson S, Roddam P, Kane E, Roman E, Cartwright R, Jack A, Morgan GJ: **Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia.** *Carcinogenesis* 2000, **21**(1):43-47.
67. Yang L, Zou X, Zhang MR, Zhang Y, Hao YS, Xiao ZJ: **[Investigation of GSTT1, GSTM1 and NQO1 genes polymorphisms in myelodysplastic syndromes].** *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2005, **26**(11):674-677.
68. Dahabreh IJ, Giannouli S, Gota V, Voulgarelis M: **GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and myelodysplastic syndrome risk: a systematic review and meta-analysis.** *Int J Cancer* 2010, **126**(7):1716-1723.
69. Kracht T, Schrappe M, Strehl S, Reiter A, Elsner HA, Trka J, Cario G, Viehmann S, Harbott J, Borkhardt A *et al*: **NQO1 C609T polymorphism in distinct entities of pediatric hematologic neoplasms.** *Haematologica* 2004, **89**(12):1492-1497.

70. Li L, Yang L, Zhang Y, Xu Z, Qin T, Hao Y, Xiao Z: **Detoxification and DNA repair genes polymorphisms and susceptibility of primary myelodysplastic syndromes in Chinese population.** *Leuk Res* 2011, **35**(6):762-765.
71. Smith MT, Wang Y, Skibola CF, Slater DJ, Lo Nigro L, Nowell PC, Lange BJ, Felix CA: **Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children.** *Blood* 2002, **100**(13):4590-4593.
72. Bolufer P, Collado M, Barragan E, Calasanz MJ, Colomer D, Tormo M, Gonzalez M, Brunet S, Batlle M, Cervera J *et al*: **Profile of polymorphisms of drug-metabolising enzymes and the risk of therapy-related leukaemia.** *Br J Haematol* 2007, **136**(4):590-596.
73. Urayama KY, Wiencke JK, Buffler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL: **MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, **16**(6):1172-1177.
74. Rund D, Krichevsky S, Bar-Cohen S, Goldschmidt N, Kedmi M, Malik E, Gural A, Shafran-Tikva S, Ben-Neriah S, Ben-Yehuda D: **Therapy-related leukemia: clinical characteristics and analysis of new molecular risk factors in 96 adult patients.** *Leukemia* 2005, **19**(11):1919-1928.
75. Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ: **Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein?** *Trends Biochem Sci* 2000, **25**(1):1-6.
76. da Silva Silveira V, Canalle R, Scrideli CA, Queiroz RG, Bettioli H, Valera ET, Tone LG: **Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and DNA repair genes and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Leuk Res* 2009, **33**(7):898-901.
77. Krajcinovic M, Labuda D, Sinnott D: **Childhood acute lymphoblastic leukemia: genetic determinants of susceptibility and disease outcome.** *Rev Environ Health* 2001, **16**(4):263-279.
78. Krajcinovic M, Labuda D, Mathonnet G, Labuda M, Moghrabi A, Champagne J, Sinnott D: **Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing**

- enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**(3):802-810.
79. Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, Koderu Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Kusumoto S, Shimazaki C, Saito K *et al*: **Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy.** *Leukemia* 2002, **16**(2):203-208.
80. Voso MT, D'Alo F, Putzulu R, Mele L, Scardocci A, Chiusolo P, Latagliata R, Lo-Coco F, Rutella S, Pagano L *et al*: **Negative prognostic value of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) deletions in adult acute myeloid leukemia.** *Blood* 2002, **100**(8):2703-2707.
81. Chen CL, Liu Q, Pui CH, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro R, Evans WE, Relling MV: **Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia.** *Blood* 1997, **89**(5):1701-1707.
82. Wang D, Ke XY, Wang J, Xu F, Hu YF: **[Correlation between MDR1 genetic polymorphism and prognosis in acute myeloid leukemia].** *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007, **87**(20):1384-1388.
83. Monzo M, Brunet S, Urbano-Ispizua A, Navarro A, Perea G, Esteve J, Artells R, Granell M, Berlanga J, Ribera JM *et al*: **Genomic polymorphisms provide prognostic information in intermediate-risk acute myeloblastic leukemia.** *Blood* 2006, **107**(12):4871-4879.
84. Kim DH, Park JY, Sohn SK, Lee NY, Baek JH, Jeon SB, Kim JG, Suh JS, Do YR, Lee KB: **Multidrug resistance-1 gene polymorphisms associated with treatment outcomes in de novo acute myeloid leukemia.** *Int J Cancer* 2006, **118**(9):2195-2201.
85. Efferth T, Sauerbrey A, Steinbach D, Gebhart E, Drexler HG, Miyachi H, Chitambar CR, Becker CM, Zintl F, Humeny A: **Analysis of single nucleotide polymorphism C3435T of the multidrug resistance gene MDR1 in acute lymphoblastic leukemia.** *Int J Oncol* 2003, **23**(2):509-517.
86. Sonneveld P, van Dongen JJ, Hagemeijer A, van Lom K, Nooter K, Schoester M, Adriaansen HJ, Tsuruo T, de Leeuw K: **High expression of the multidrug**

resistance P-glycoprotein in high-risk myelodysplasia is associated with immature phenotype. *Leukemia* 1993, **7**(7):963-969.

87. Luan FJ, Yang CZ, Shao XF: **[Detection and analysis of multidrug resistance in 100 cases of acute leukemia]**. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1994, **16**(5):360-363.

Anexos

Anexo 1

Parecer do comitê de ética



CEP, 24/05/05.
(Grupo I)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-8925
www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
cep@fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO: Nº 124/2005

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL E CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE NOVOS GENES ALVO E NOVAS TERAPÊUTICAS NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS E EM LINHAGENS LEUCÊMICAS"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Terezinha Olalla Saad

INSTITUIÇÃO: Centro de Hematologia e Hemoterapia - UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/05/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/05/06

II - OBJETIVOS

O projeto visa a investigação funcional de novos genes alvo e novas terapêuticas nas mielodisplasias. Em vista de não haver modelos de células ou animais com mielodisplasias, para cumprimento de alguns objetivos serão utilizados linhagens leucêmicas. Analisar a regulação da expressão dos genes ARHGAP10, MASK em linhagens leucêmicas submetidas a diferentes agentes terapêuticos cultivadas em suspensão. Analisar a expressão diferencial dos genes ARHGAP10 e MASK em células de pacientes com SMDs cultivadas em suspensão e um ambiente de células estromais submetidas a diferentes terapias anti-tumorais. Huperexpressar MASK e ARHGAP10 em células hematopoéticas e verificar o perfil de expressão gênica por microarray. Induzir Ros e verificar a expressão de MASK, ARHFGAP10, formita, APAF e FLIP. Verificar a expressão das isofarmas de APAF e FLIP em células de medula óssea de pacientes com mielodisplasias e correlacionar com subgrupo e IPSS. Verificar a expressão de formita em células linfóides de pacientes com SMD e correlacionar com padrão de celularidade da medula óssea, grau de anemia, subgrupo de SMD e IPSS. Verificar a expressão de WT1 e PRAME e correlacionar com subgrupo de SMD e IPSS. Verificar o crescimento de colônias a partir de células precursoras de medula óssea de pacientes com SMD, em culturas de longa duração, submetidas a tratamento com diferentes drogas. Verificar a expressão de citocinas e moléculas de adesão em células aderente da cultura de longa duração. Verificar o perfil de expressão gênica de células CD34 + de pacientes co SMD, utilizando conjunto de genes conhecidos e transcritos humanos novos, imobilizados em lâminas de microarrays. Verificar a capacidade da célula dendrítica de SMD, derivada de célula mononuclear, induzir imunogenicidade quando transformada com mRNA de WT1. Investigar mutações nos genes PTPN11, AML-1, FLT3 e GATA-1 e verificara se estas mutações se relacionam com subgrupo de SMD, IPSS, progressão para leucemia.

III - SUMÁRIO

Para esse estudo participarão, no mínimo, 34 pacientes, 23 mulheres, 11 homens, com idade entre 18 e 89 anos; sendo que pacientes novos admitidos no serviço serão convidados a participar. Serão incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica, acompanhados no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp por pelo menos 6 meses. O diagnóstico será feito com base em critérios clínicos e morfológicos, utilizados no serviço há pelo menos 15 anos, com exclusão de causas como carências vitamínicas, doenças inflamatórias, infecciosas, hepáticas, renais, endócrinas e outras neoplasias. Os pacientes e controles que aceitarem voluntariamente em participar do estudo serão submetidos a coleta de 5ml de medula óssea para extração de mRNA; citometria de fluxo para análise de PRAME, formina em leucócitos e células dendríticas; cultivo de células estromais (apenas em pacientes com idade acima de 65 anos); tratamento *in vitro* de células em suspensão com agentes terapêuticos (apenas pacientes com idade acima de 65 anos); tratamento *in vitro* com agentes terapêuticos em ambiente de células estromais (apenas pacientes com idade acima de 65 anos); extração de DNA para investigação das mutações.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

É um projeto bem elaborado, condizente com as normas do CEP e do CONEP. Apresenta bibliografia atualizada; o orçamento tem como fonte financiadora a FAPESP, no valor de R\$ 250.000,00. Após modificações o TCLE ficou adequado.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro

centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2005.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2

Artigo submetido para publicação

MDR-1 and GST polymorphisms are involved in Myelodysplasia progression. Bruna Palodetto, Bruno Deltreggia Benites, Paula de Melo Campos, Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille, Fabiola Traina e Sara Teresinha Olalla Saad. Submetido para Drug Metabolism and Disposition.

Title: MDR-1 and GST polymorphisms are involved in Myelodysplasia progression

Running head: MDR-1 and GST are involved in MDS progression

Bruna Palodetto, Bruno Deltreggia Benites, Paula de Melo Campos, Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille, Fabiola Traina and Sara Teresinha Olalla Saad

Laboratory of Molecular and Cell Biology - Hematology and Hemoterapy Center_ University of Campinas-SP and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (INCTS).

Corresponding author: Bruna Palodetto, Hemocentro, Rua Carlos Chagas, 480 Cidade Universitária, Barão Geraldo, Campinas 13083-970-SP, Brazil. Phone +55 19 35218734 Fax +55 19 32891089, brunapalodetto@hotmail.com

Conflicts of interest: None declared.

Source of funding: Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (INCT).

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal stem cell disorders characterized by abnormal hematopoietic differentiation and maturation, which progress towards acute leukemia in approximately 30% of the cases. Drug metabolism polymorphisms in Cytochrome P450 (*CYP2B6*), Glutathione S-transferase (*GST*) and Dehydrogenase quinone 1 (*NQO1*) enzymes and P-glycoprotein (*MDR-1*) could modify treatment response and resistance. Thus, the aim of this study was to identify the influence of *CYP2B6* G15631T, *GSTT*, *GSTM1*, *NQO1* C609T and *MDR-1* C3435T polymorphisms on acute leukemia and MDS risk, acute leukemia progression and relapse; and MDS progression. We analyzed 92 acute leukemia patients, 68 MDS patients and 165 normal controls using the PCR-RFLP and Multiplex method. There was no difference in polymorphism frequency between patients and control group. The frequency of *NQO1* C609T mutated allele was lower in patients who achieved remission than in patients who did not, 26% vs. 52% in acute myeloid leukemia ($P=0.043$), and 25% vs. 48% in acute leukemia ($P=0.037$). In MDS, the frequency of *GST* deletions and *MDR-1* CC genotype was lower in progression-free patients compared to patients with progression; *GST*: 21% vs. 50% ($P=0.021$); *MDR-1* gene: 19% vs. 55% ($P=0.016$). In conclusion, these results suggested that *NQO1* C609T is involved in acute leukemia remission and *GST* deletions and *MDR-1* C3435T are involved in MDS progression.

Key Words: Polymorphism, drug metabolism, acute leukemia, myelodysplastic syndrome

Anexo 3

Pacientes com LLA

PACIENTES	DIAGNÓSTICO	INDUÇÃO	RECAÍDA	CYP2B6	GST	NQO1	MDR1	CITOGENÉTICA	SEGUIMENTO	STATUS	TRATAMENTO
1	LLA-Pré-B	Falha	N/A	GG	Sem Deleção	CC	CT	46,XY	Óbito na segunda indução	Óbito 12/2009	Gmall
2	LLA-B	Remissão	N/A	GG	Sem Deleção	CC	TT	46,XX	Óbito durante consolidação	Óbito 08/2009	Gmall
3	LLA-Filadélfia	Remissão	Não	GT	Deleção	CC	CT	N/A	Manutenção	Remissão Completa	Glivec
4	LLA-T	Remissão	Não	GG	Deleção	CT	CC	46,XY	Fim do tratamento 12/2009	Remissão Completa	Gmall
5	LLA-B	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CC	CT	46,XX	Manutenção até 11/2009	Remissão Completa	Gmall
6	LLA-T	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	TT	CT	N/A	Fim do tratamento 10/2008	Remissão Completa	Gmall
7	LLA	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CC	TT	N/A	Manutenção	Remissão Completa	Gmall
8	LLA-T	Remissão	Não	GT	Sem Deleção	CC	CC	N/A	Preparação para TMO	Óbito Perdeu	Gmall
9	LLA	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CC	TT	46,XY	Fase II de indução Remissão, recaída	seguimento	Gmall
10	LLA-B	Remissão	Sim	GT	Sem Deleção	CT	TT	N/A	na semana 51 e TMO	Remissão Óbito	Lla-br
11	LLA Filadélfia	Remissão	Sim	GT	Sem Deleção	CC	CC	46,XY	Recaída Tratamento	11/2011	GBTL 93/Glivec
12	LLA-B	Remissão	Não	TT	Sem Deleção	CC	CC	N/A	concluído	Alta por cura	

13	LLA	Falha	N/A	GT	Sem Deleção	CC	CT	46,XY	Falha na indução Tratamento	Óbito 04/2011	Gmall
14	LLA	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CC	CC	46,XX	concluído Recaída em 2006, manutenção até	Alta por cura Remissão	
15	LLA-T	Remissão	Sim	GG	Sem Deleção	CT	CT	Inconclusivo	2008 Tratamento	Remissão Completa	Gmall
16	LLA-T	Remissão	Não	GG	Deleção	CC	CT	Inconclusivo	concluído Tratamento	Remissão Completa	Gmall
17	LLA-T	Remissão	Não	TT	Sem Deleção	CT	CC	Inconclusivo	concluído Tratamento	Alta por cura	
18	LLA-T	Remissão	Não	GG	Deleção	CC	CC	Inconclusivo	concluído Resistente ao	Alta por cura Óbito	
19	LLA	Falha	N/A	GG	Sem Deleção	CT	CC	Inconclusivo	tratamento TMO devido a alto	Óbito 04/2011	Gmall
20	LLA	Remissão	Não	GT	Sem Deleção	CC	CT	Inconclusivo	risco e Remissão	Óbito	Gmall
21	LLA Filadélfia	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CC	CC	46,XX,t(9;22)(q34;q11) [17]/46,XX[03]	Em tratamento	Remissão	Gmall
22	LLA-B	Remissão	Não	GG	Deleção	CC	TT	46,XY	Em tratamento	Remissão Remissão	LSA2L2
23	LLA-Pré-B	Remissão	Não	GT	Sem Deleção	CC	CC	Inconclusivo	Manutenção Recaída SNC	Completa Óbito	Gmall
24	LLA-T	Remissão	Sim	GG	Deleção	CC	CT	46,XY	04/2011	05/2011	Gmall

Anexo 4

Pacientes com LMA

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	INDUÇÃO	RECAÍDA	CYP	GST	NQ01	MDR1	CITOGENÉTICA	STATUS		
									SEGUIMENTO	ATUAL	TRATAMENTO
1	LMA Displasia trilinear	Óbito precoce	N/A	GG	Sem Deleção	CC	TT	45,XY,-7[07]/46,XY[17]	Perdeu Seguimento Consolidação	Perdeu Seguimento	Dauno+ARAC
2	LMA M2	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CC	TT	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[18]/46,XX[02].	com TMO	Remissão Perdeu	Dauno+ARAC
3	LMA M4	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CC	CT	46,XY	Remissão	Seguimento	Dauno+ARAC
4	LMA M3	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CC	CC	Inconclusivo	Remissão	Remissão	Dauno+ATRA
5	LMA M1	Falha	N/A	TT	Sem Deleção	CC	TT	46,XX	Falha na indução Perdeu	Óbito Perdeu	Dauno+ARAC
6	LMA	Falha	N/A	GG	Sem Deleção	CC	TT	Inconclusivo	Seguimento Perdeu	Seguimento Perdeu	Gmall
7	LMA M3	Remissão	Não	GT	Sem Deleção	CC	TT	46,XY,t(15;17)(q22;q11)	Seguimento	Seguimento Óbito	Dauno+ATRA
8	LMA M2	Falha	N/A	GT	Sem Deleção	CC	CT	46,XX	Falha na indução	09/2009	ARAC SC
9	LMA M7	Remissão Óbito	Não	TT	Sem Deleção	CT	TT	Inconclusivo	Consolidação	Remissão Óbito	ETI/ARAC SC
10	LMA M2	precoce	N/A	GT	Sem Deleção	CT	CC	Inconclusivo	Óbito precoce	07/2009 Perdeu	ARAC SC
11	LMA M2	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CC	CC	46,XX,del(8)(q22)[10]/46,XX[10].	Consolidação	Seguimento	Dauno+ARAC
12	LMA M3	Remissão	Não	GT	Sem Deleção	CC	CT	Inconclusivo	Remissão	Remissão Óbito	Dauno+ATRA
13	LMA	Falha	N/A	GG	Sem Deleção	CT	CT	Inconclusivo	Falha na indução	09/2009	ARAC SC

14	LMA M3	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CT	CT	46,XX,t(15;17)(q22;q11)[02]/46,XX[08]	Manutenção até 08/2009	Remissão completa	Dauno+ATRA
15	LMA M3	Remissão	Não	TT	Sem Deleção	CT	TT	Inconclusivo	Manutenção até 04/2011	Remissão completa	Dauno+ATRA
16	LMA M2	Remissão	Sim	GT	Sem Deleção	CT	CT	Inconclusivo	Recaída	Óbito 06/2010	ARAC SC
17	LMA M7	Remissão Óbito	Não	GT	Sem Deleção	CT	TT	46,XX	Remissão	Óbito 09/2009	Dauno+ARAC
18	LMA M2	precoce Óbito	N/A	GT	Sem Deleção	CT	CC	45,XX,-7,-10,-18,+2mar	Óbito precoce	12/2007	ARAC SC
19	LMA M4	precoce	N/A	GT	Sem Deleção	CT	CC	46,XX	Óbito precoce	Óbito	N/A
20	LMA	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CC	CT	46,XX	TMO	Remissão Óbito	TAD9
21	LMA Secundária	Falha	N/A	GT	Sem Deleção	CC	CT	46,XY	Falha na indução Consolidação	12/2008	ARAC SC
22	LMA M1	Remissão	Não	GG	Sem Deleção	CC	CT	Inconclusivo	com TMO Perdeu	Remissão Perdeu	TAD9
23	LMA	Falha	N/A	GT	Sem Deleção	CT	CC	46,XY	Seguimento	Seguimento	ARAC SC
24	LMA LMA	Falha	N/A	GG	Sem Deleção	CT	CT	46,XX[17]/45,XX,t(1;14)(p31;q32), del(7)(q32),t(17;?)(p13;?)-22[03]	Falha na indução	Óbito 05/2010	ETI/ARAC SC
25	Bifenotípica	Remissão	Sim	GG	Sem Deleção	CC	CT	Inconclusivo	Consolidação	Remissão Óbito	Dauno+ATRA
26	LMA M1	Falha	N/A	GG	Sem Deleção	CC	TT	46,XY	Falha na indução	Óbito 01/2010	Dauno+ARAC
27	LMA M2	Remissão	Não	GT	Sem Deleção	CT	CC	46,XX	TMO	Óbito 02/2010	Dauno+ARAC
28	LMA M6	Remissão	Sim	GT	Sem Deleção	CC	TT	46,XX	TMO e recaída	12/2010	TAD9
29	LMA	Óbito	N/A	TT	Sem	CC	CT	46,XX	Óbito precoce	Óbito	Dauno+ARAC

		precoce			Deleção						11/2009	
					Sem						Remissão	
30	LMA Secundária	Remissão	Não	GG	Deleção	CC	CC	46,XX		Manutenção	completa	Dauno+ARAC
31	LMA M3	Remissão	Não	GG	Deleção	CT	CT	46,XY		Manutenção	completa	Dauno+ATRA
					Sem						Óbito	
32	LMA	Falha	N/A	GG	Deleção	CT	TT	46,XY		Falha na indução	01/2010	Dauno+ARAC
					Sem					Reindução por	Perdeu	
33	LMA M3	Remissão	Sim	GT	Deleção	CC	CT	46,XY,t(4;6)(p16;q13),t(15;17)(q22;q11)		recaída 12/2009	Seguimento	Dauno+ATRA
		Óbito			Sem					Óbito durante		
34	LMA	precoce	N/A	GG	Deleção	CT	CT	Inconclusivo		inducao	Óbito	Dauno+ARAC
					Sem					Remissão	Remissão	
35	LMA	Remissão	Não	GT	Deleção	CC	CT	46,XX		completa	completa	TAD9
					Sem							
36	LMA	Remissão	Não	GG	Deleção	CC	CT	Inconclusivo		Manutenção	Remissão	ETI
					Sem							
37	LMA Trissomia 8	Remissão	Não	GT	Deleção	CC	CT	47,XY,+8[10]/46,XY[10].		Remissão	Remissão	ETI
					Sem							
38	LMA Secundária	Remissão	Não	GG	Deleção	CC	CC	46,XX		Consolidação	Remissão	Dauno+ARAC
39	LMA M3	Remissão	Não	GT	Deleção	CC	CT	Inconclusivo		Manutenção	Remissão	Dauno+ATRA
	LMA Displasia				Sem			45,XY,-17[9] /			Óbito	
40	trilinear	Falha	N/A	GT	Deleção	CC	CC	52,XY,+1,+6,+8,t(17;?)(p13;?),+21,+2mar[6].		Falha na indução	07/2010	ARAC SC
					Sem						Óbito	
41	LMA M2	Falha	N/A	GG	Deleção	CC	CT	46,XY		Falha na indução	12/2009	Dauno+ARAC
					Sem						Remissão	
42	LMA M3	Remissão	Não	GG	Deleção	CC	CC	Inconclusivo		Manutenção	completa	ATRA+Dauno
											Remissão	
43	LMA M3	Remissão	Não	GT	Deleção	CC	CT	Inconclusivo		Manutenção	completa	Dauno+ATRA
					Sem						Remissão	
44	LMA M3	Remissão	Não	GG	Deleção	CC	CT	46,XY,t(15;17)(q22;q11)		Manutenção	completa	Dauno+ATRA
45	LMA	Falha	N/A	GT	Sem	CT	CT	46,XX[04]/43,XX,del(3)(q21),-4,-5, -16,-		Falha na indução	Óbito	ARAC SC

					Deleção			17,-21,+2mar[16].			03/2010	
					Sem						Remissão	
46	LMA M3	Remissão	Não	GG	Deleção	CC	TT	46,XX		Manutenção	completa	Dauno+ATRA
										Perdeu	Perdeu	
47	LMA M2	Remissão	Não	GT	Deleção	CC	CC	Inconclusivo		Seguimento	Seguimento	
		Óbito			Sem					Óbito durante		
48	LMA M6	precoce	N/A	GT	Deleção	CC	CT	Inconclusivo		indução	Óbito	Dauno+ARAC
											Remissão	
49	LMA M3	Remissão	Não	GG	Deleção	CC	CT	Inconclusivo		Manutenção	completa	Dauno+ATRA
		Óbito			Sem						Óbito	
50	LMA	precoce	N/A	GG	Deleção	CC	CT	48,XX,+8,+10[12]/46,XX[08]		Falha na indução	03/2010	ARAC SC
					Sem						Óbito	
51	LMA Secundária	Falha	N/A	GT	Deleção	CC	CC	Inconclusivo		Falha na indução	05/2010	ARAC SC
										Recaída e falha		
					Sem					na segunda	Óbito	
52	LMA M2	Remissão	Sim	GG	Deleção	CC	TT	46,XY		indução	12/2010	Dauno+ARAC
		Óbito										
53	LMA	precoce	N/A	GG	Deleção	TT	CC	Inconclusivo		Óbito precoce	Óbito	
								48,X,-Y,-5,del(6)(q22),+del(11)(q23),+13, -				
					Sem			14,-16,-			Óbito	
54	LMA M6	Falha	N/A	GG	Deleção	CT	CT	17,+19,+21,+22,+2mar[08]/46,XY[12]		Falha na indução	09/2010	ETI
		Óbito			Sem							
55	LMA	precoce	N/A	GG	Deleção	CT	CC	45,XY,-7.		Óbito na indução	Óbito	Dauno+ARAC
					Sem						Remissão	
56	LMA-M2	Remissão	Não	TT	Deleção	CC	CC	Inconclusivo		Consolidação	completa	Dauno+ARAC
					Sem						Óbito	
57	LMA Secundária	Falha	N/A	GG	Deleção	CT	CC	46,XX		Falha na indução	10/2010	ARAC SC
		Óbito			Sem							
58	LMA	precoce	N/A	GT	Deleção	CC	TT	46,XY		Óbito na indução	Óbito	Dauno+ARAC
		Óbito			Sem						Óbito	
59	LMA	precoce	N/A	GG	Deleção	CC	TT	Inconclusivo		Óbito precoce	08/2010	Transfusões

60	LMA M2	Remissão	Não	GG	Deleção Sem	CC	CT	46,XX,t(8;21)(q22;q22).	Remissão Recaída em SNC e TMO	Óbito	Dauno+ARAC
61	LMA M3	Remissão	Sim	GG	Deleção	CT	CT	46,XY,t(15;17)(q22;q11)		Óbito	Dauno+ATRA
62	LMA M3	Remissão	Não	GG	Deleção Sem	TT	TT	Inconclusivo	Manutenção Consolidação com TMO	Remissão completa	Dauno+ATRA
63	LMA M4	Remissão	Não	GG	Deleção	CC	TT	46,XY,inv(16)[18]/46,XY[05]		completa	Dauno+ARAC
64	LMA M2	Remissão Óbito	Não	GT	Deleção Sem	CC	TT	46,XY	Consolidação Óbito durante indução	Óbito	Dauno+ARAC
65	LMA	precoce	N/A	GG	Deleção	CT	CC	46,XX	Óbito durante reindução	Óbito	Dauno+ARAC
66	LMA M7	Falha	N/A	GG	Deleção	CT	CC	Inconclusivo		Óbito	Dauno+ARAC

Anexo 5

Pacientes com progressão em mielodisplasia

PACIENTE	IDADE	WHO	IPSS	TEMPO PARA PROGRESSÃO	DESEFECHO	CYP2B6	GST	NQO1	MDR-1
1	71	AREB-2	INT-2	2 meses	Óbito	GT	Sem Deleção	CC	CC
2	75	AREB-2	Alto	Desconhecido	Óbito	GT	Deleção	CC	TT
3	68	AREB-2	Alto	1 mês	Óbito	GG	Deleção	CC	TT
4	79	AREB-1	INT-1	10 meses	Óbito	GG	Sem Deleção	CT	CC
5	69	AREB-1	INT-1	2 meses	Tratamento	GT	Deleção	CC	TT
6	70	AREB-2	INT-1	1 mês	Óbito	TT	Sem Deleção	CC	CC
7	80	5q	Baixo	17 meses	Óbito	GG	Sem Deleção	CT	CC
8	44	AREB-2	Alto	6 meses	Óbito	GG	Sem Deleção	CC	TT
9	60	AREB-1	INT-1	2 meses	Óbito	GT	Sem Deleção	CC	CC
10	69	AR	Baixo	7 meses	Perdeu Seguimento	GG	Deleção	CC	CC
11	29	AREB-2	Alto	1 meses	Óbito	GT	Deleção	CC	CC
12	66	AREB-1	INT-1	15 meses	Tratamento	GG	Sem Deleção	CC	TT
13	76	CRDM	INT-1	6 meses	Perdeu Seguimento	GG	Deleção	CC	CT
14	67	AREB-2	INT-2	7 meses	Óbito	GG	Sem Deleção	CC	TT
15	76	CRDM	INT-1	7 meses	Tratamento	GT	Deleção	CC	CC
16	76	AREB-1	INT-1	3 meses	Perdeu Seguimento	GG	Deleção	CC	TT
17	70	AREB-1	INT-1	2 meses	Óbito	GT	Deleção	CC	CC
18	78	CRDM	INT-1	3 meses	Perdeu Seguimento	TT	Sem Deleção	CC	CC
19	70	CRDM	N/A	Desconhecido	Tratamento	GG	Sem Deleção	CT	TT
20	69	AREB-2	Alto	Desconhecido	Perdeu Seguimento	GG	Deleção	CT	TT