



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Pós-graduação em Patologia Molecular

Graciana Souza Lordelo de Carvalho

**Polimorfismo nos genes MTHFR, Glutathione S-transferase (GST) e Haptoglobina (HP) e sua relação na ocorrência da Leucemia Mielóide Crônica (LMC)**

Brasília  
Julho/ 2011

Graciana Souza Lordelo de Carvalho

**Polimorfismo nos genes MTHFR, Glutathione S-transferase (GST) e Haptoglobina (HP) e sua relação na ocorrência da Leucemia Mielóide Crônica (LMC)**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Mestre em Patologia Molecular na área de concentração em Genética.

Orientador: Dr. Cesar Koppe Grisolia  
Co-orientadora: Dra. Ana Luisa Miranda Vilela

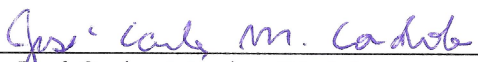
Brasília  
Julho/ 2011

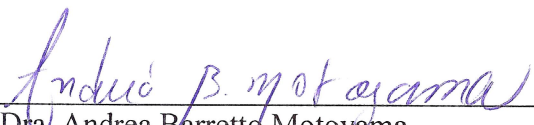
Graciana Souza Lordelo de Carvalho


**Polimorfismo nos genes MTHFR, Glutathione S-transferase (GST) e Haptoglobina (HP) e sua relação na ocorrência da Leucemia Mielóide Crônica (LMC)**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Mestre em Patologia Molecular na área de concentração em Genética.

Aprovada em: 13 de julho de 2011.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Carlos Martins Córdoba  
Hospital de Apoio SES-DF

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Andrea Barretto Motoyama  
Faculdade de Ciências da Saúde  
UnB

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Cesar Koppe Grisolia  
IB - Departamento de Genética e Morfologia  
UnB  
Orientador

Brasília  
Julho/ 2011

*Aos pacientes, pelo exercício diário de perseverança em busca  
da cura, e aos profissionais da saúde , que, seja na  
assistência, seja na pesquisa, empenham-se no entendimento  
desta patologia.*

*Dedico.*

*“Não são os mais fortes das espécies que sobrevivem, nem os mais inteligentes, mas sim os que respondem melhor às mudanças.”*  
Charles Darwin.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me capacitar e providenciar os meios necessários para concretização deste trabalho, trazendo pessoas muito especiais para contribuição da minha formação acadêmica.

Ao Jhonathan, ao Lucas e à Isabela, que compreenderam minha ausência e me abasteceram com a força necessária para conclusão deste;

Em especial, à Profª Drª Maria de Nazaré Klautau, pelo apoio fundamental na idealização deste trabalho, abrindo as portas do laboratório de Genética e contribuindo para minha formação com seus ensinamentos de genética de população;

Ao meu orientador, Prof. Cesar Kopper Grisólia, pela oportunidade, confiança e sobretudo por sua dedicação na formação de seus alunos;

À Ana Luisa, minha co-orientadora, pela amizade, paciência e principalmente orientação em todas as fases deste trabalho, desde a realização dos procedimentos de bancada, até a análise estatística dos dados e a redação da dissertação. Obrigada, serei sempre agradecida por toda atenção e apoio.

Ao Dr. Alexandre Nonino, pela orientação nos dados clínicos, pelo apoio na apresentação dos dados parciais e na redação;

À Drª Margarete Barbosa Daldegan, por ter acreditado neste trabalho e contribuído ativamente com palavras de incentivo e motivação.

Aos membros da banca Dr. José Carlos Córdoba, Profª. Drª. Andrea B. Motoyama e Profª. Drª. Zulmira Guerrero Lacava, cujas contribuições serão enriquecedoras.

Ao Arthur Akimoto, meu mestre nas PCRs e eletroforeses pelos preciosos ensinamentos, muito obrigada;

À querida amiga Cassinha, pela ajuda na padronização da haptoglobina e nas análises estatísticas;

À querida amiga Bélin, que carinhosamente me recebeu e ajudou com a redação.

Aos amigos de bancada Arthur, Penha, Bélin, Ingrid, Letícia, Flavinha, Lívia, Luciana, Cassinha, Carol, Mila, Eduardo, Arcanjo, Rafaela, Tatiana, Ieler, Lilian e Mariana, Stenia por todos os momentos especiais no laboratório de Genética.

A toda equipe médica e técnica do Núcleo de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base do Distrito Federal, particularmente Alessandra e Oziel pela ajuda durante a coleta.

À Cleuza, secretária Núcleo de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base do Distrito Federal, pela ajuda com a coleta de dados;

Aos professores do Laboratório de Genética do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Dr<sup>a</sup> Maria de Nazaré Klautau, Dr. Cesar Kopper Grisólia, Dr<sup>a</sup>. Zulmira Guerrero Lacava e Dr<sup>a</sup> Silviene Fabiana de Oliveira, que exercem papel fundamental na construção do conhecimento;

Ao professor César Marins Sá (*in memoriam*) pela sua dedicação na formação dos alunos;

À Fernanda Vinhaes de Lima, minha querida professora que sempre me incentivou na busca do conhecimento;

Aos meus amigos de todas as horas, Daphne e João Rogério, pelo apoio e carinho;

À querida Silvia Coutinho, que sempre me recebeu com sorriso especial e acompanhou esse trabalho desde o início;

Ao meu cunhado Thiago, pelas discussões das análises estatísticas,

Aos meus pais, Antonio e Carmelita, pela minha formação para o estudo e para vida;

Ao meu irmão Vital, pelos telefonemas de incentivo;

Aos meus familiares, meus avós, minhas tias Angelita e Estelita, meu primo Marconi que sempre contribuíram com apoio e motivação;

À Ana Luisa, Bélin, Penha, Cassinha, Athur, Lilian, Ieler, Ingrid, Tatiana, Daphne, João Rogério tão presentes nos momento de conclusão, muito obrigada,

A todos que não mencionei mais que, direta ou indiretamente colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

A leucemia mielóide crônica é uma doença de células hematopoiéticas na qual ocorre a proliferação celular descontrolada dos leucócitos. Embora os aspectos clínicos e biológicos estejam bem documentados, pouco se sabe sobre a susceptibilidade individual à doença. Neste trabalho foi realizado um estudo caso-controle analisando a prevalência dos polimorfismos MTHFR C6777T e A1298C, GSTM1, GSTT1 e haptoglobina em 105 pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC) e em 273 controles saudáveis, por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida ou não por digestão com enzimas de restrição (RFLP). Uma associação com risco de desenvolver LMC foi encontrada para os genótipos MTHFR 1298AA (OR = 1,794 IC 95% = 1,14-2,83) e GSTM1 não nulo (OR = 1,649; IC 95% = 1,05-2,6; p = 0,031), enquanto os genótipos MTHFR 1298AC (OR = 0,630; IC 95% = 0,40-0,99, p=0,047) e GSTM1 nulo (OR = 0,606; IC 95% = 0,21-0,77, p = 0,031) diminuíram este risco. Verificou-se para o genótipo MTHFR 1298AA, um aumento do risco para o sexo feminino (OR=2,052; 95% CI=1,08-3,92; p=0,028), como também para faixa etária de 20-40 anos (OR=1,980; 95% CI=1,06-4,65; p=0,047) e para indivíduos de pele branca (OR=2,218; 95% CI=1,09-4,51; p=0,026). Em relação a GSTM1, o aumento do risco foi também associado ao sexo feminino (OR=2,505; 95% CI=0,21-0,77; p=0,031) e para indivíduos >60 anos (OR=6,222; 95% CI=1,63-23,76; p=0,006). Indivíduos Hp1F-1S de pele negra também apresentaram aumento do risco (OR=7,200; 95% CI=0,94-54,94; p=0,037). A diminuição do risco anteriormente apresentada para MTHFR 1298AC e GSTM1 nulo foram também relacionados ao sexo feminino, para MTHFR (OR=0,520; 95% CI=0,27-0,99; p=0,046) e para GSTM1 (OR=0,399; 95% CI=0,21-0,77; p=0,005). Também se observou para GSTM1 nulo, a diminuição do risco para >60 anos (OR=0,161; 95% CI=0,04-0,61; p=0,006). Uma diminuição do risco para indivíduos de pele negra foi observada para o genótipo Hp1S-2 da haptoglobina (OR=0,619; 95% CI=0,44-0,87; p=0,011). Uma diminuição do risco no sexo masculino ocorreu apenas para o genótipo MTHFR 677CC (OR=0,495; 95% CI=0,26-0,95; p=0,032). Os resultados indicaram também a seleção a favor dos heterozigotos para o loco MTHFR 1298. A variabilidade em populações humanas pode refletir, em parte, processos distintos de seleção natural e adaptação às condições ambientais variáveis. A população brasileira é muito heterogênea e miscigenada, e nossos resultados indicaram que, pelo menos para esta população, esses dois polimorfismos são importantes no contexto da LMC, necessitando de maiores investigações em associação com dosagens de folato e dados clínicos.

**Palavras-chave:** Susceptibilidade, Leucemia Mielóide Crônica, polimorfismos genéticos, Equilíbrio de Hardy-Weinberg, população brasileira



## ABSTRACT

Chronic myeloid leukaemia is a haematopoietic stem cell disorder causing uncontrolled cell proliferation of white blood cells. Although these clinical and biological aspects are well documented, little is known about individual susceptibility to the disease. We conducted a case-control study analysing the prevalence of the polymorphisms *MTHFR* C6777T, *MTHFR* A1298C, *GSTM1*, *GSTT1* and Haptoglobin in 105 patients with chronic myeloid leukaemia (CML) and 273 healthy controls, using polymerase chain reaction (PCR)-based methods. An association with risk of developing CML was found for *MTHFR* 1298AA (OR= 1.794; 95% CI= 1.14–2.83) and *GSTM1* non-null (OR= 1.649; 95% CI= 1.05–2.6; p=0.031) genotypes, while *MTHFR* 1298AC (OR= 0.630; 95% CI= 0.40–0.99; p=0.047) and *GSTM1* null (OR= 0.606; 95% CI= 0.21–0.77; p=0.031) genotypes decreased this risk. For *MTHFR* 1298AA, this risk was particularly related to females (OR= 2.052; 95% CI= 1.08–3.92; p=0.028), age group of 20–40 years (OR= 1.980; 95% CI= 1.06–4.65; p=0.047) and white skin colour (OR= 2.218; 95% CI= 1.09–4.51; p=0.026); for *GSTM1*, it was related to females (OR=2.505; 95% CI= 0.21–0.77; p=0.031) and the age group >60 years (OR= 6.222; 95% CI= 1.63–23.76; p=0.006). Results also showed an increased risk for individuals of black skin colour carrying Hp1F-1S genotype, despite the small sample size and the large confidence interval (OR= 7.200; 95% CI= 0.94–54.94; p=0.037). A decreased CML risk was observed for the genotypes *MTHFR* 1298AC (OR= 0.630; 95% CI= 0.40–0.99; p=0.047) and *GSTM1* null (OR= 0.606; 95% CI= 0.21–0.77; p=0.031), and both were also related to females (OR= 0.520; 95% CI= 0.27–0.99; p=0.046 for *MTHFR*; and OR= 0.399; 95% CI= 0.21–0.77; p=0.005 for *GSTM1*). For *GSTM1* null genotype, it was also related to the age group >60 years (OR= 0.161; 95% CI=0.04–0.61; p=0.006). For males, a decreased risk was observed only for *MTHFR* 677CC genotype (OR= 0.495; 95% CI= 0.26–0.95; p=0.032). A decreased risk was also observed for individuals of black skin colour carrying Hp1S-2 genotype (OR= 0.619; 95% CI= 0.44–0.87; p=0.011). For males, a decreased risk was observed only for *MTHFR* 677CC genotype (OR= 0.495; 95% CI= 0.26–0.95; p=0.032). Results also indicated selection in favour of heterozygous for *MTHFR* 1298 loco. The considerable range of variation in human populations may reflect, in part, distinctive processes of natural selection and adaptation to variable environmental conditions. The Brazilian population is very mixed and heterogeneous, and our results indicated that, at least for this population, these two loci are important in the context of CML, needing further investigation in association with folate dosages and clinical data.

**Keywords:** Chronic myeloid leukaemia susceptibility, genetic polymorphisms, Hardy-Weinberg Equilibrium, Brazilian population

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> A translocação t(9;22)(q34;q11) em LMC.....	16
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática dos genes ABL e BCR na t (9,22 (q34;q11)).....	17
<b>Figura 3:</b> Domínios da proteína c-ABL .....	18
<b>Figura 4:</b> Domínios estruturais da proteína <i>BCR</i> .....	18
<b>Figura 5:</b> Mecanismo de ação dos ITK.....	23
<b>Figura 7:</b> Posição do gene MTHFR no cromossomo 1.....	27
<b>Figura 6:</b> Metabolismo do ácido fólico.....	26
<b>Figura 8:</b> Posição do gene GST T1 no cromossomo 22 .....	29
<b>Figura 9:</b> Posição do gene GST M1 no cromossomo 1 .....	29
<b>Figura 10:</b> Mecanismo de ligação de Hp à Hb prevenindo estresse oxidativo .....	30
<b>Figura 11:</b> Posição do gene da haptoglobina no cromossomo 16 .....	31
<b>Figura 12:</b> Análise dos genótipos C677T e A1298C no gene da MTHFR .....	41
<b>Figura 13:</b> Genotipagem do polimorfismo da GST M1T1. ....	43
<b>Figura 14:</b> Genotipagem do polimorfismo da cadeia $\alpha$ da haptoglobina. ....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Condições da mistura para reação de PCR para os genes estudados. ....	39
<b>Tabela 2:</b> Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para amplificação da MTHFR. ....	40
<b>Tabela 3:</b> Concentrações e quantidade dos reagentes empregados na digestão do produto da PCR da MTHFR C677T.....	40
<b>Tabela 4:</b> Concentrações e quantidade dos reagentes empregados na digestão do produto da PCR da MTHFR A1298C. ....	40
<b>Tabela 5:</b> Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para amplificação de GSTM1, GSTT1 e $\beta$ -globina. ....	42
<b>Tabela 6:</b> Pares de iniciadores do polimorfismo da Haptoglobina. ....	43
<b>Tabela 7:</b> Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para amplificação da Haptoglobina. ....	43
<b>Tabela 8:</b> Preparo do gel de Poliacrilamida 6%. ....	45
<b>Tabela 9:</b> Frequência da distribuição dos genótipos Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos grupos Controle e LMC. ....	49
<b>Tabela 10:</b> Frequência da distribuição por sexo dos genótipos Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos grupos Controle e LMC.....	50
<b>Tabela 11:</b> Frequência da distribuição por faixa etária dos genótipos Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos grupos Controle e LMC. ....	51
<b>Tabela 12:</b> Frequência da distribuição por cor da pele dos genótipos Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos grupos Controle e LMC ....	52
<b>Tabela 13:</b> Distribuição das frequências alélicas de Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos grupos Controle e LMC e dados para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). ....	54
<b>Tabela 14:</b> Tabela de contingência para o desequilíbrio genotípico entre os locos 677 e 1298 da MTHFR no grupo controle. ....	55
<b>Tabela 15:</b> Tabela de contingência para o desequilíbrio genotípico entre os locos 677 e 1298 da MTHFR no grupo LMC. ....	55
<b>Tabela 16:</b> Dados de diversidade genética nos grupos Controle e LMC, Estatísticas F e teste de heterogeneidade (qui-quadrado ( $\chi^2$ )) para os marcadores genéticos Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C.....	56
<b>Tabela 17:</b> Distribuição dos genótipos dos polimorfismos da Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C e Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%. ....	57

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**ABL-** Gene Abelson do vírus da leucemia murina ou seu homólogo humano

**Alo TMO-** Transplante alogênico de medula óssea

**BCR-** Breakpoint cluster region

**BCR-ABL-** Gene híbrido oriundo do cromossomo Ph

**HYD-** Hidroxiuréia

**DNA-** Ácido desoxirribonucléico

**DL-** Desequilíbrio de ligação

**EHW-** Equilíbrio de Hardy-Weinberg

**EROS-** Espécies Reativas de Oxigênio

**FIS-** Coeficiente de endocruzamento

**FISH -** Hibridização fluorescente in situ

**FST-** Índice de fixação

**FIT-** Coeficiente global de endocruzamentos

**GST-** Glutathione S Transferase

**Hp-** Haptoglobina

**Hb-** Hemoglobina

**INF-** Interferon

**INFa -** Interferon-alfa

**ITK-** Inibidores de tirosina quinase

**LLA-** Leucemia Linfóide Aguda

**LMA-** Leucemia Mielóide Aguda

**LMC -** Leucemia Mielóide Crônica

**MTHFR -** Metilenotetrahidrofolato redutase

**PCR -** Reação em cadeia da polimerase

**PDGFR** - Receptores do fator de crescimento derivados de plaquetas

**Ph** – Cromossomo Philadelphia

**RNA** – Ácido ribonucléico

**SAM** – S-adenosilmetionina

**SNP** – Polimorfismo de nucleotídeo único

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Biologia da LMC.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>Polimorfismo MTHFR.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3</b>	<b>Polimorfismo das Glutathiona S-transferase .....</b>	<b>28</b>
<b>1.4</b>	<b>Polimorfismo da Haptoglobina.....</b>	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Seleção dos pacientes .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Critérios de Inclusão .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Critérios de Exclusão .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Seleção do grupo controle .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Coleta de amostra de sangue periférico .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Extração de DNA .....</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5</b>	<b>Genotipagem da MTHFR C677T A1298C: .....</b>	<b>40</b>
<b>4.6</b>	<b>Genotipagem das GSTs (GSTM1 e GSTT1).....</b>	<b>42</b>
<b>4.7</b>	<b>Genotipagem da Haptoglobina.....</b>	<b>43</b>
<b>4.8</b>	<b>Procedimentos para eletroforese .....</b>	<b>44</b>
<b>4.9</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>45</b>
<b>4.9.1</b>	<b>Comparação das amostras dos grupos controle e LMC.....</b>	<b>45</b>
<b>4.9.2</b>	<b>Estatística de populações .....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1</b>	<b>Comparação das amostras dos grupos controle e LMC.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2</b>	<b>Estatística de populações .....</b>	<b>52</b>
<b>5.3</b>	<b>Odds Ratio (OR) .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PESPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
	<b>ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXO 2 – PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO.....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXO 3 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA SES-DF .....</b>	<b>86</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Biologia da LMC

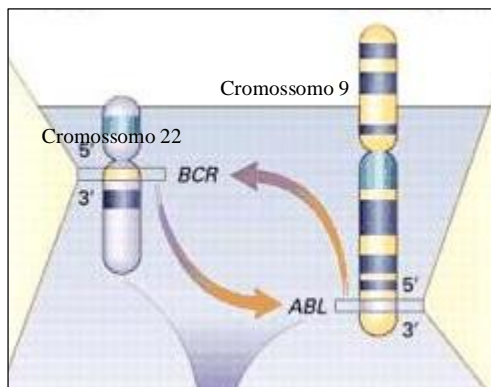
A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa da linhagem mielóide nos seus múltiplos estágios de maturação. As células progenitoras mielóides expandem-se em vários estágios de maturação, sendo liberadas no sangue periférico e, posteriormente, seguindo para locais extramedulares. A expansão desordenada destas células reflete a ocorrência de alterações na sua capacidade proliferativa, bem como, de mudanças no equilíbrio entre auto-renovação e diferenciação, aumentando o número de células progenitoras e reduzindo o número de células-tronco ou totipotentes (FADERL et al., 1999).

A ocorrência da LMC está relacionada a uma translocação cromossômica, a qual é, dentre outras anomalias estruturais, a mais freqüente nas malignidades hematológicas (ZAGO et al., 2001). A translocação cromossômica presente na LMC foi descoberta por NOWELL & HUNGERFORD (1960) ao observarem um cromossomo anômalo do grupo G, o cromossomo Filadélfia (Ph), presente em 95% dos indivíduos acometidos por essa síndrome (SAGLIO et al., 2004).

Com o aprimoramento das técnicas de bandeamento cromossômico, ROWLEY (1973) descreveu a alteração cromossômica existente nesses pacientes com LMC como uma translocação recíproca entre dois cromossomos, onde o cromossomo 22 apresenta perda da porção terminal do seu braço longo e o cromossomo 9 apresenta ganho desse respectivo material genético na porção terminal do seu braço longo. A quantidade de material genético translocado para o cromossomo 9 é aproximadamente equivalente àquela perdida pelo cromossomo 22, caracterizando a ocorrência de uma alteração balanceada. A definição do cromossomo Ph clássico é:  $t(9;22)(q34;q11)$ , indicando que a translocação relacionada ao surgimento de tal cromossomo ocorre entre a banda q34 do cromossomo 9 e a banda q11 do cromossomo 22.

O cromossomo Ph possui um gene quimérico resultante da fusão da extremidade 5' do gene BCR (exon b2 ou b3), localizado no cromossomo 22, com a extremidade 3' do exon 2 do gene ABL, localizado no cromossomo 9 (**Figura 1**). Tal gene quimérico promove a expressão do RNAm -ABL e, conseqüentemente, a produção da proteína BCR-ABL, cuja atividade de tirosina-quinase tem uma participação direta e crucial no desenvolvimento da LMC (DEKLEIN et al., 1982; BARTRAM et al., 1983; HEISTERKAMP et al., 1983), em

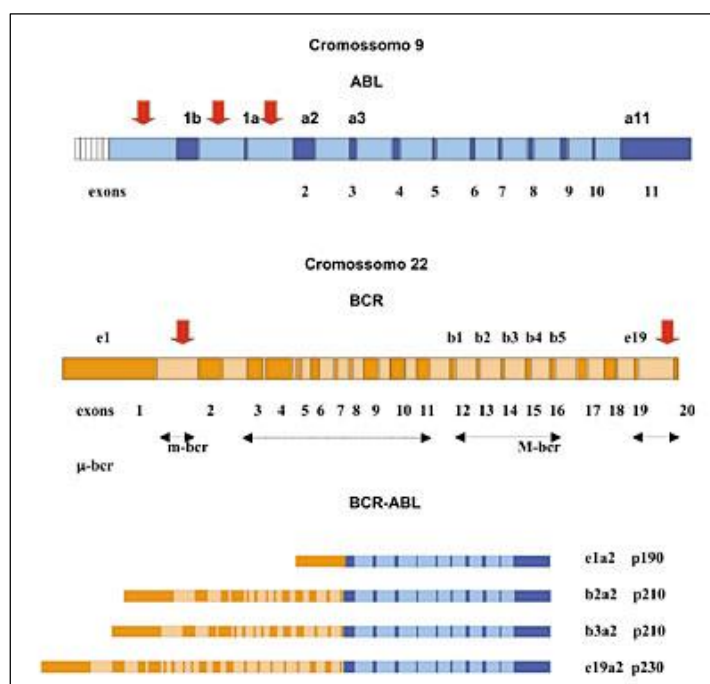
virtude de possuir um importante papel no estímulo da proliferação celular e na inibição da apoptose (VAN et al., 2004).



**Figura 1:** A translocação t(9;22)(q34;q11) em LMC (Adaptado FADERL et al., 1999).

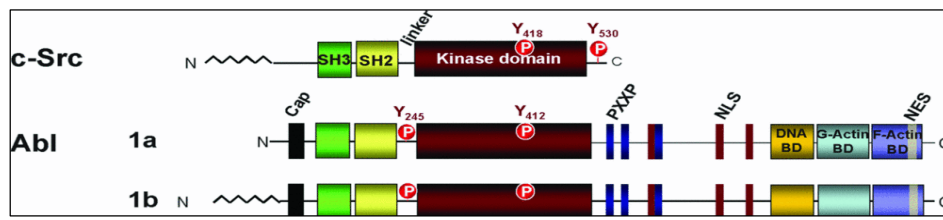
Sabe-se que a variação do ponto de quebra dos genes envolvidos na translocação ocorrida entre os cromossomos 9 e 22 pode promover a formação de diferentes transcritos, dos quais três são descritos para o gene BCR: maior (M-bcr), menor (m-bcr) e  $\mu$ -bcr (**Figura 2**). Uma nomenclatura foi desenvolvida para descrever esses diferentes pontos de quebra: o primeiro par alfanumérico refere-se ao exon do gene BCR, que se funde ao segundo exon do ABL. Os exons da região M-bcr são chamados b1 a b5; os exons da m-bcr de e1, e2, e1' e e2' e os exons do  $\mu$ -bcr de e19 e e20. Na LMC o híbrido BCR-ABL resulta, geralmente, de uma junção b3a2 ou b2a2, que codifica uma proteína de fusão de 210 KDa (p210). Uma minoria dos pacientes contém os transcritos e1a2 (p190), frequentes em crianças com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) (2/3 dos casos) e presente em 30% dos casos de LLA em adultos. Sua presença está relacionada com um pior prognóstico nos pacientes com LLA, o que tem exigido a adoção de novas propostas terapêuticas. O transcrito p210 também pode ocorrer em alguns casos de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) Ph+. A junção e19 e e20 ocorrem raramente na LMC e na Leucemia Neutrófila Crônica, originando a proteína p230 (LEE et al., 1998).





**Figura 2:** Representação esquemática dos genes ABL e BCR na t(9,22 (q34;q11). Os exons estão representados pelas cores azul e laranja escuros nos genes ABL e BCR, respectivamente e os introns pelas cores azul e laranja claros. As quebras no ABL, ilustradas pelas setas vermelhas, ocorrem acima do exon 1b, entre 1a e a2. Os pontos de quebra no BCR ocorrem dentro de uma das 3 regiões indicadas pelas duplas setas horizontais. Os exons de 12 a 16 do gene BCR correspondem aos exons b1 a b5 da região M-bcr. Em casos excepcionais os pontos de quebra no BCR caem na região m-bcr indicada pela dupla seta pontilhada. Abaixo, a estrutura de vários transcritos BCR-ABL e suas respectivas proteínas, os quais são formados de acordo com a posição de ponto de quebra no BCR (Adaptado MELO et al., 1996).

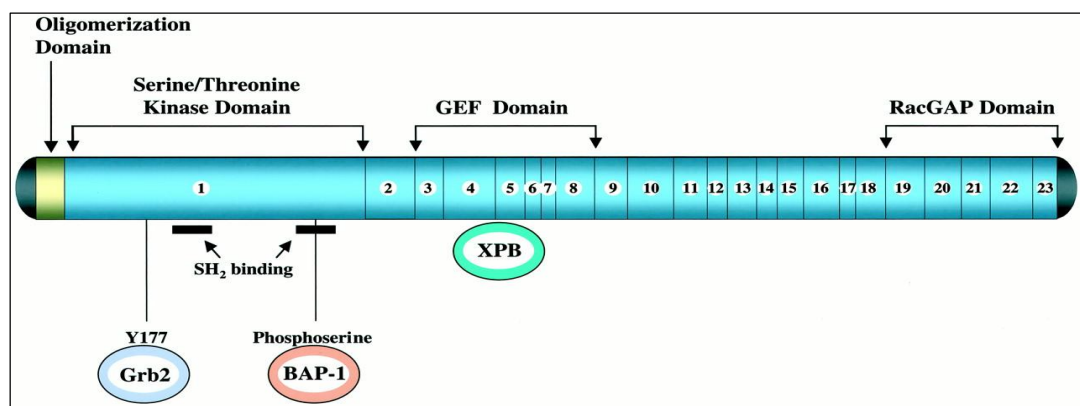
As proteínas geradas a partir dos diferentes pontos de quebra foram alvo de diversos estudos, dos quais vários, visando um melhor entendimento da LMC, se concentraram na investigação da função fisiológica das proteínas codificadas pelos genes ABL e BCR. O gene normal ABL codifica a proteína c-ABL (145 KDa), que pertence à família das tirosinas quinases não receptoras, possui funções no núcleo e no citoplasma, e regula diversos processos celulares, tais como: mitogênese, migração, adesão, resposta ao dano ao DNA, sobrevivência e resposta ao estresse oxidativo (SIRVENT et al., 2008). A organização estrutural dos domínios c-ABL é similar à da proteína SRC quinase (Sarcoma Aviário), possuindo um domínio tirosina quinase SH1(SRC Homology 1), um SH2 e um SH3 na direção do extremo N-terminal (**Figura 3**). Já na extremidade C-terminal, a molécula c-ABL apresenta uma sequência rica em prolina (PXXP), que interage com domínios SH3 de proteínas adaptadoras; um sítio de ligação ao DNA; um sítio de união para F-actina e outro para G-actina; um sinal de localização nuclear (NLS) e um sinal de exportação nuclear (NES) (PENDERGAST, 2002). O oncogene ABL é homólogo ao oncogene viral v-ABL, responsável pela malignização de células em cultura e indução de leucemia em ratos susceptíveis (KONOPKA & WITTE, 1985).



**Figura 3:** Domínios da proteína c-ABL (Adaptado SIRVENT et al., 2008).

O gene *Breakpoint Cluster Region* (BCR) codifica uma proteína de 160 KDa, encontrada principalmente no cérebro e em células hematopoéticas nos primeiros estágios de diferenciação mielóide, cujos níveis são reduzidos significativamente nos polimorfonucleares maduros (WETZLER, et al., 1993). A proteína *BCR* interage com a proteína do Xeroderma Pigmentoso (XPB), que desempenha importante papel no reparo do DNA e na regulação do ciclo celular (TAKEDA, et al., 1999, MARU et al., 1999).

O primeiro exon do BCR possui um domínio de atividade serina/treonina quinase, um domínio de dimerização e domínios SH2, relacionados com processos de sinalização intracelular (MARU et al., 1991). A região central do BCR tem homologia com a família dos fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs), que interage, em vários níveis, com as proteínas G, essenciais na sinalização intracelular, na organização do citoesqueleto e no crescimento celular. O domínio C-terminal, por sua vez, tem função ativadora de proteínas G, como a p21 GTPase (Rac), que regula a polimerização de actina (LAURENT, et al., 2001) (**Figura 4**).



**Figura 4:** Domínios estruturais da proteína *BCR* (LAURENT et al., 2001).

Quando da ocorrência da translocação e da fusão BCR-ABL, a proteína *c-ABL* perde sua conformação inativa e observa-se a constitutiva ação catalítica do seu domínio tirosina-quinase (PENDERGAST et al., 1991). Isso ocorre porque domínios de oligomerização de *BCR* fornecem à proteína quimérica a capacidade de agrupar-se e consequentemente estimular auto-fosforilações (HANTSCHHEL E SUPERTI-FUGA, 2004). Desta forma, a proteína *BCR-*

*ABL* induz a carcinogênese por diferentes quinases, por meio de diferentes vias de sinalização intracelular. As anormalidades celulares observadas na LMC são consequência dessa sinalização intracelular aberrante. Sabe-se que existe uma considerável sobreposição entre as diferentes vias e que, provavelmente, a ativação de múltiplas rotas é necessária para o fenótipo completo da LMC *in vivo* (SCHUSTER et al., 2003).

A atividade mitogênica primária da *BCR-ABL* pode estimular, mesmo na ausência de fatores de crescimento, a entrada de células hematopoiéticas no ciclo celular (CORTEZ et al., 1997, JONULEIT et al., 1998). Embora muitas vias de sinalização intracelular sejam ativadas, a ativação da rota MAPK quinase desempenha um papel central na promoção da proliferação descontrolada. *BCR-ABL* também ativa p21 Ras (CORTEZ et al., 1997, SKORSKI et al., 1995), que desempenha um importante papel na mitogênese, já que a ativação da rota Ras é necessária para transformação de fibroblastos e de células linfóides B pelo gene *BCR-ABL* (SAWYERS et al., 1995).

Na LMC, a aderência defeituosa de progenitores hematopoiéticos a elementos do estroma medular, atividade também relacionada à proteína *BCR-ABL*, facilita a liberação dessas células comuns à medula óssea para o sangue periférico. As células progenitoras hematopoiéticas normais aderem à matriz extracelular ou a citocinas de regulação de crescimento. A adesão é mediada por receptores da superfície celular nas células progenitoras, especialmente integrinas, que são glicoproteínas da superfície celular compostas de duas subunidades: alfa e beta. Na LMC ocorre a expressão de uma beta integrina variante que inibe a adesão dessas células ao estroma medular (FADERL et al., 1999). Outra característica da *BCR-ABL* é sua capacidade de impedir apoptose (morte celular programada), o que, acredita-se, pode ocorrer que isso ocorra por meio da interação em múltiplas vias de sinalização, como visto anteriormente, sob ação de um mecanismo ainda pouco conhecido (QUINTÁS-CARDAMA E CORTES, 2009).

As atividades de interação dos domínios protéicos da p210 *BCR-ABL* estão assim relacionadas a uma hiperplasia na medula óssea com predominância granulocítica, de aspecto morfológico normal ou exibindo discreto assincronismo de maturação (BEN-NERIAH et al., 1985; STAM et al., 1985). Quando da ocorrência de tal proliferação celular, a célula progenitora ou de menor grau de diferenciação, denominada mieloblasto, encontra-se na medula, geralmente, em proporções inferiores a 10%. Além disso, na circulação periférica há leucocitose em níveis superiores a 25.000/mm<sup>3</sup>, refletindo uma similaridade medular. Pacientes nesse estado de proliferação podem apresentar basofilia, eosinofilia, anemia,

trombocitose ou trombopenia e esplenomegalia, com sintomatologia relacionada ao hipermetabolismo celular (ZAGO et al., 2001).

A LMC tem incidência de 1 a 2 casos em 100.000 pessoas por ano e corresponde a cerca de 15% das leucemias em adultos. A média de idade dos pacientes à época do diagnóstico é de 45 a 55 anos. Entretanto, para a utilização de estratégias terapêuticas, tais como o transplante de células-tronco, é considerado o fato de que cerca de 12 a 30% dos pacientes tem 60 anos ou mais à época do diagnóstico (FADERL et al., 1999).

Estudos etiológicos da LMC indicam as radiações ionizantes como causa da translocação cromossômica relacionada à ocorrência da doença (ICHIMARU et al., 1978; PRESTON et al., 1994). Verificou-se que mulheres portadoras de câncer de colo uterino que se submeteram a tratamento radioterápico apresentaram frequência de LMC significativamente maior quando comparadas a grupos de pacientes que não se submeteram à radiação (BOICE et al., 1985).

Relatos sobre a evolução da LMC distinguem a fase crônica ou inicial com duração média de três a cinco anos, evoluindo para fase acelerada e fase blástica, caracterizada por uma resistência terapêutica e acentuação do quadro hematológico (KADAM et al., 1991). Estimativas de prognóstico de pacientes diagnosticados na fase crônica da LMC são realizadas utilizando mais comumente o escore de Sokal, no qual variáveis clínicas como são consideradas: idade, tamanho do baço, percentual de blastos e contagem de plaquetas em sangue periférico ao diagnóstico, e valores mais elevados representam pior prognóstico (SOKAL, et al., 1984).

A fase crônica é caracterizada pela proliferação e maturação de células mielóides, com aumento da contagem de leucócitos. Em pacientes não tratados, observa-se elevação progressiva na contagem de leucócitos de 20.000/mm<sup>3</sup> para mais de 500.000/mm<sup>3</sup>. Além disso, é comum a ocorrência de disfunções plaquetárias em pacientes com LMC e, em 25% dos casos, verifica-se a ocorrência de trombocitose, ocasionalmente com contagem de leucócitos acima de 1.000.000/mm<sup>3</sup> e tendências a sangramento. A maior parte dos pacientes não apresenta anemia no diagnóstico e, de forma geral, a qualidade de vida dos portadores de LMC não é alterada na fase crônica, especialmente se a contagem de leucócitos estiver controlada (GREER et al., 2004).

Durante a fase acelerada observa-se aumento do número de células blásticas ou indiferenciadas na medula e periferia, além de evolução clonal citogenética. Com o avanço da doença, o paciente atinge a fase blástica, diagnosticada através do número de blastos acima de 30%, febre, sudorese noturna, anorexia, perda de peso, dores ósseas e aumento da

esplenomegalia. Alterações citogenéticas são encontradas em 70% dos casos sendo as mais comuns: trissomia do 8 (33%), cromossomo Ph adicional (30%), isocromossomo 17 (20%), deleção do cromossomo Y (8%), trissomia 21(7%) e monossomia do cromossomo 7 (5%) e são marcadores de progressão de doença (KADAM et al., 1991, JOHANSSON et al., 2002). As fases posteriores à crônica têm curta duração, e correspondem ao período terminal da doença. A sobrevida média dos pacientes portadores de LMC após o diagnóstico é de 4 a 6 anos, sendo que as fases acelerada e blástica apresentam duração média de 3 a 6 meses (ZAGO et al., 2000; GREER et al., 2004).

A transformação da doença é freqüentemente precedida de refratariedade ao tratamento da leucocitose, com aumento nos blastos medulares e sanguíneos, pancitopenia, basofilia, aumentos ou diminuições da contagem de plaquetas não relacionadas à terapia e manifestações clínicas, tais como febre inexplicável, esplenomegalia, doenças extramedulares (sangramentos), perda de peso, dores nos ossos e nas articulações. As mudanças medulares e citogenéticas (evolução clonal, como trissomias e/ou monossomias) ocorrem em 50 a 70% dos pacientes durante a transição das fases acelerada e blástica. Anormalidades moleculares podem corresponder a mudanças citogenéticas (FADERL et al., 1999). Embora 5% dos casos de LMC não apresentem o cromossomo Ph clássico no estudo citogenético, a análise molecular detecta o rearranjo BCR-ABL na maioria dos casos (SAGLIO et al., 2004).

Inicialmente o tratamento da LMC baseou-se no uso de quimioterápicos com a capacidade de promover a redução ao nível normal dos leucócitos circulantes em excesso de acordo com a fase na qual se encontrava a doença, sendo utilizado, principalmente, o Bussulfano e a Hidroxiuréia, cujo mecanismo de ação é caracterizado, principalmente, pela interferência na síntese do DNA, por meio da inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (ZAGO et al., 2001).

A utilização inicial do Bussulfano e da Hidroxiuréia no tratamento da LMC objetiva promover uma rápida resposta clínica e hematológica. Entretanto, são utilizados com limitações por um período curto de tratamento - de aproximadamente 12 meses, podendo ocasionar aplasia medular (falência do tecido medular), fibrose pulmonar e amenorréia (ZAGO et al., 2001). Dados na literatura relatam que a sobrevida de pacientes tratados com hidroxiuréia (5 anos) - é significativamente maior que os tratados com Bussulfano (pouco mais de 3 anos) (KENNEDY, 1992).

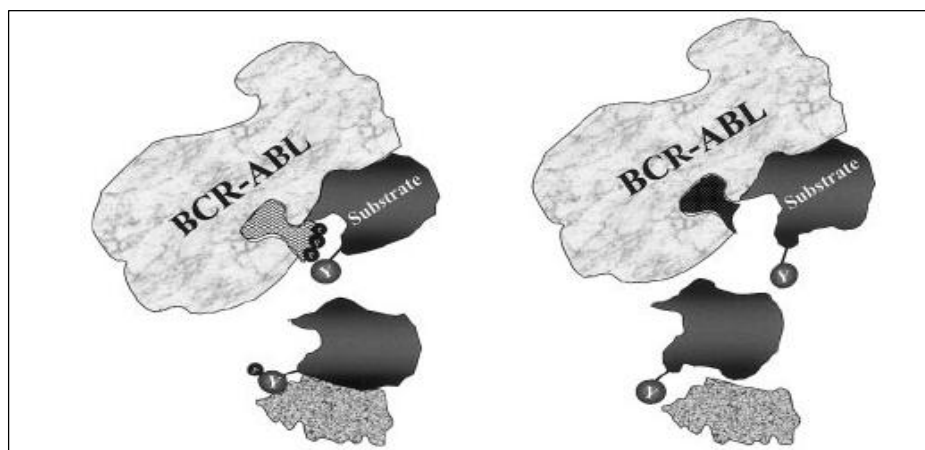
Posteriormente, o tratamento da LMC passou a utilizar, em alguns casos, o Interferon (INF), medicamento composto de proteínas próprias da resposta imunológica à atividade viral, também utilizado como inibidor da proliferação dos granulócitos. Com o uso do

Interferon Alfa (INFa) foram observadas remissões hematológicas na maioria dos pacientes e, em cerca de 13% a 27% dos casos, completa remissão citogenética (isto é, ausência do cromossomo Ph pela citogenética convencional) (BONIFAZI et al., 2001; KANTARJIAN et al., 2003a).

A taxa de resposta citogenética foi maior em pacientes mais jovens e naqueles com menor taxa de risco Sokal (SOKAL et al., 1988). Embora o grau de resposta citogenética possa melhorar ao longo do tempo, é raro observar resposta citogenética com o tratamento se, durante o primeiro ano, não houver redução na porcentagem de metáfases com cromossomo Ph. Em alguns pacientes, remissões citogenéticas foram mantidas por longos períodos de tempo, sendo verificado que a sobrevida parece ser melhorada naqueles que apresentam resposta citogenética maior (TALPAZ et al., 1991). Entretanto, o emprego terapêutico do INFa pode provocar reações gerais como auto-imunidade e distúrbios da esfera psíquica (TALPAZ et al., 1987). Desse modo, em virtude dos efeitos colaterais consideráveis deste medicamento, a terapia deve ser interrompida caso não haja resposta citogenética em um ano de tratamento.

Em dois estudos, a sobrevida em 10 anos variou de 72 a 78 por cento nos pacientes que obtiveram resposta citogenética completa com uso de INFa (BONIFAZI et al., 2001; KANTARJIAN et al., 2003a). A maioria dos pacientes que atingiram remissão citogenética completa após o tratamento com INFa ainda apresenta evidência molecular da doença quando avaliados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (KANTARJIAN et al., 2003a; LEE et al., 1992; TALPAZ et al., 1994; CHOMEL et al., 2000).

Uma evolução no tratamento da LMC foi obtida após a compreensão do mecanismo de ativação da tirosina quinase, que permitiu o desenvolvimento de compostos capazes de inibir, seletivamente, essa proteína quinase aberrante, conhecidos como inibidores da tirosina quinase (ITK). O primeiro medicamento deste tipo a ser utilizado no tratamento da LMC foi o Mesilato de Imatinibe (STI-571), que inibe competitivamente a ativação da tirosina quinase, bloqueando a ligação do sítio do ATP, impedindo assim a mudança conformacional da proteína para forma ativa (MAURO et al., 2001; TSAO et al., 2002). Além disso, o Imatinibe inibe a proliferação celular e a formação de tumores, sem indução de apoptose (HOLTZ et al., 2002) (**Figura 5**).



**Figura 5:** Mecanismo de ação dos ITK. A droga inibe seletivamente o clone mutado, enquanto a ligação fisiológica de ATP permite fosforilar os resíduos de tirosina em seus substratos (representação à esquerda) a droga se liga ao sítio de ATP sem fornecer o grupamento fosfato essencial a ser transferido ao substrato (representação à direita) (Adaptado DEININGER et al., 2000).

Verifica-se que a maioria dos pacientes com LMC em fase crônica tem uma excelente resposta ao tratamento inicial com Imatinibe. Embora a maioria dos pacientes alcance a sua melhor resposta no primeiro ano de tratamento, alguns continuam a aprofundar a sua resposta durante cinco anos (HOCHHAUS et al., 2008). Entretanto, é criticamente importante seguir cuidadosamente o paciente, a rotina de análise citogenética de medula óssea é o padrão-ouro para avaliação da resposta em LMC. Como a maioria dos pacientes é capaz de alcançar uma resposta citogenética completa (ausência de metáfases com cromossomo Ph em exame citogenético), instrumentos mais sensíveis, como a hibridização fluorescente in situ (FISH) e reação em cadeia da polimerase (PCR), qualitativa e quantitativa, são usados com sangue periférico reduzindo a necessidade de biópsias de medula óssea (KANTARJIAN et al., 2008; SCHIFFER et al., 2007).

Existem três estratégias para avaliar a resposta dos pacientes ao tratamento:

- Resposta hematológica: avaliada pelo número diferencial de glóbulos brancos e contagem de plaquetas.
- Resposta citogenética: usada para avaliar o percentual de metáfases positivas para o cromossomo Ph em células presentes na medula óssea;
- Resposta molecular: avaliada por PCR quantitativo (Q-PCR) do sangue periférico. Esta técnica é usada para detectar a presença ou ausência de células malignas circulantes que abrigam o gene BCR-ABL. (TESTONI et al., 2009).

Quando da utilização deste tipo de medicamento, o insucesso do tratamento é definido pela perda de uma resposta hematológica completa; pela perda de uma resposta citogenética completa; pela presença de novas mutações no gene BCR-ABL, tornando as células Ph

positivas poucos sensíveis aos ITK; pela progressão clonal da doença, ou pela incapacidade de atingir os limiares após o início da terapêutica (BACCARANI et al., 2009).

A resistência ao tratamento com ITKs é dividida em duas categorias: primária e secundária (SHAH et al., 2007). A resistência primária dá-se quando um paciente não consegue atingir a resposta desejada para o tratamento e, no caso do Imatinibe, ocorre em até 25 % dos pacientes que o receberam como tratamento inicial para a LMC em fase crônica. A resistência secundária ocorre quando os pacientes com uma resposta inicial a este medicamento apresentam recaída (O'DWYER et al., 2004; KANTARJIAN et al., 2003b; KANTARJIAN et al., 2003c; SOVERINI et al., 2005).

As resistências primária e secundária podem se desenvolver por meio de mecanismos diferentes. Estudos em andamento estão investigando surgimento de novas mutações e o perfil de expressão gênica em ensaios *in vitro* da atividade *BCR-ABL* para tentar entender melhor os mecanismos de resistência (MIZUTANI et al., 2010; ZHANG et al., 2009). É importante observar a influência de mutações na proteína *BCR-ABL* no tratamento da doença. Sabe-se que pacientes em fase crônica tardia da LMC são mais susceptíveis ao surgimento de novas mutações em regiões da proteína *BCR-ABL*, conferindo assim, uma resistência a medicamentos (THOMAS et al., 2004; GUMIREDDY et al., 2005).

Desse modo, os pacientes que apresentam indícios de resistência à doença devem ser cuidadosamente acompanhados e orientados sobre a administração do medicamento nas doses e horários adequados, bem como, periodicamente questionados a respeito do uso de outros medicamentos ou suplementos de ervas com possíveis efeitos sobre a ação do ITK. (NOENS et al., 2009; MARIN et al., 2010). Em caso de dúvidas, pode ser analisado o nível de Imatinibe na corrente sanguínea para avaliação do uso correto do medicamento pelos pacientes (LARSON et al., 2008).

O principal mecanismo subjacente à resistência de doentes com LMC ao Imatinibe, por exemplo, reside em mutações do gene *BCR-ABL*, as quais afetam a região da proteína tirosina quinase que é o alvo na medicação e reduzem a capacidade do fármaco de se ligar à proteína e bloquear a sua atividade. Foram detectadas cerca de 90 mutações em áreas da quinase que provocam resistência ao fármaco. Um tipo de mutação altera a forma do local de ligação do fármaco, enquanto que, em outros casos, as mutações parecem impedir a quinase de se dobrar da maneira necessária para a ligação do ITK (SAWYERS et al., 2002; MELO et al., 2007). Com a realização de novas pesquisas, vários outros ITKs foram desenvolvidos e testados em pacientes com LMC, entre eles o Dasatinib (BMS-354825, Sprycel) e o



Nilotinib (AMN 107, Tasigna) e tornaram-se o tratamento inicial de escolha para a maioria dos pacientes com LMC (TAM et al., 2008).

Os ITKs de segunda geração inibem tanto *BCR-ABL* como outras vias de sinalização. O Dasatinib e Bosutinib inibem *BCR-ABL* e SRC quinases; o Nilotinib inibe o *BCR-ABL*, o c-kit e os receptores do fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGFR). Nilotinib e Dasatinib são, respectivamente, 20 e 325 vezes mais potente que o INFa *in vitro*. (O'HARE et al., 2005).

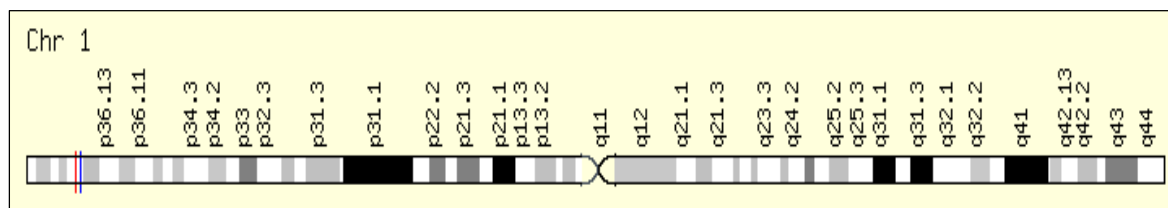
Outra opção de tratamento da LMC é o transplante de medula óssea alogênico (AloTMO), passível de ser utilizada em pacientes jovens, com doença estável, que possuem um doador adequado. Tem sido relatada sobrevida de 5 anos em 40 a 70% dos pacientes que receberam transplante durante a fase crônica da doença (SAWYERS, 1999; GOLDMAN, 1997; PASSWEG et al., 1998; HEHLMANN et al., 2000). Porém, o transplante de medula óssea está associado ao aumento da mortalidade e da morbidade, em virtude de intercorrências nos períodos pré e pós-transplante como: doença do enxerto contra o hospedeiro, imunossupressão e toxicidade de múltiplos órgãos (KANTARJIAN et al., 1998; FADERL et al., 1999).

Embora os aspectos clínicos e biológicos da leucemia sejam bem documentados, pouco se conhece a respeito da susceptibilidade individual à incidência da doença. Considera-se que as variantes polimórficas de diversos genes (frequência alélica superior à 1%), os efeitos da dieta, a exposição ambiental a substâncias cancerígenas e as características individuais do sistema imune são fatores possivelmente relacionados ao aumento da predisposição de um indivíduo ao desenvolvimento de algum tipo de leucemia (BOWEN et al., 2003). Estudos de associação entre polimorfismos genéticos e LMC foram realizados em diversas populações, abrangendo, dentre outros, os polimorfismos do gene da metilenotetrahidrofolato-redutase (MTHFR) (HUR et al., 2006; MOON et al., 2007; BARBOSA et al., 2008), da glutationa S-transferases (GST) (HISHIDA et al, 2005; SOUZA et al., 2008) e da haptoglobina (Hp) (NEVO e TATARSKY, 1986; CAMPREGHER et al., 2004).

## 1.2 Polimorfismo MTHFR

O ácido fólico funciona como múltiplas formas de co-enzimas em processos de oxidação e transferência de radical metila. Os processos metabólicos dependentes de ácido fólico são influenciados pela ingestão de folato e de outros nutrientes essenciais, como





**Figura 7:** Posição do gene MTHFR no cromossomo 1, indicado pelo traço vermelho (GeneCard: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTHFR&search=MTHFR>).

Indivíduos com MTHFR 677TT apresentaram, *in vitro*, 30% da atividade enzimática quando comparados com o tipo selvagem, enquanto aqueles com o genótipo heterozigoto CT têm 60% da atividade enzimática MTHFR do genótipo selvagem (FROSST et al., 1995). O alelo 677T está associado a níveis plasmáticos de homocisteína aumentados (KLUIJTMANS et al., 1997), a um aumento do risco de doença cardiovascular (KLUIJTMANS et al., 1997; GUDNASON et al., 1998) e a um aumento de defeitos congênitos, especialmente de defeitos no tubo neural (FINNEL et al., 1998; van der PUT et al., 1998).

O polimorfismo A1298C encontra-se no éxon 7, resultando na substituição de glutamina por alanina (van der PUT et al., 1998; WEISBERG et al., 1998). Esse polimorfismo reside no domínio regulatório da enzima SAM (MATTHEWS et al., 1984; WIEMELS et al., 2001). A ligação de SAM resulta na mudança conformacional da enzima MTHFR, que inibe a sua atividade enzimática (MATTHEWS et al., 1984). Linfócitos de indivíduos com genótipo 1298CC demonstraram, *in vitro*, aproximadamente 60% da atividade específica da MTHFR em relação ao genótipo selvagem (van der PUT et al., 1998). Ambos os indivíduos de genótipos 677CT e 1298AC mostraram 50-60% da atividade enzimática MTHFR do genótipo selvagem (van der PUT et al., 1998; WEISBERG et al., 1998).

O baixo nível de folato tem sido associado a diversos tipos de cânceres, especialmente coloretal (DUTHIE, 1999; CHOI et al., 2000; SELLERS et al., 2001; STOLZENBERG-SOLOMON et al., 2001). A deficiência de folato induz dano cromossômico, formação de sítio frágil e micronúcleo, frequentemente associado à tumorigênese (KIM et al., 2000; CHANG et al., 2007). Como a MTHFR é uma enzima chave no metabolismo do folato, mudanças na sua atividade, resultantes do polimorfismo do gene MTHFR, podem induzir a um aumento da susceptibilidade ao câncer.

Por outro lado, trabalhos na literatura têm sugerido que, em situações de atividade de MTHFR diminuída existe maior disponibilidade do seu substrato (5,10-metilenotetrahidrofolato) para síntese de purinas e pirimidinas, o que pode resultar em maior

estabilidade da síntese de DNA e diminuição de mutações genéticas (CHEN et al., 1996; MA et al., 1997; ULRICH et al., 1999).

SKIBOLA e colaboradores (1999) reportaram que indivíduos adultos com genótipos variantes MTHFR 677TT, 1298AC ou 1298CC tiveram susceptibilidade diminuída para a leucemia linfóide aguda (LLA), mas não para a leucemia mielóide aguda (LMA). WIEMELS e colaboradores (2001) demonstraram um modelo protetor das variantes 677TT e 1298CC em leucemias em crianças, enquanto FRANCO e colaboradores (2001) observaram efeito protetor apenas na variante 677TT.

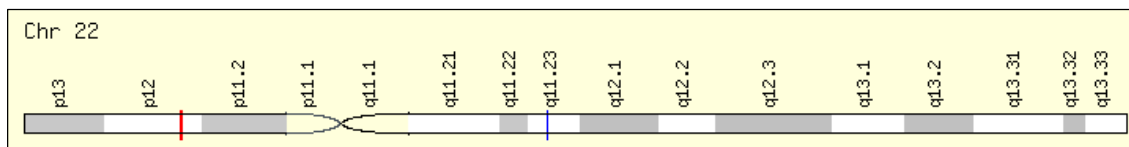
Um estudo de investigação de genótipos variantes da MTHFR e susceptibilidade da leucemia mielóide crônica (LMC) na população coreana, demonstrou que o genótipo AC do polimorfismo 1298 teve uma significativa diminuição do risco de incidência dessa leucemia (HUR et al., 2006). Esse mesmo genótipo (MTHFR 1298AC) também tem sido associado com a diminuição do risco de recaída pós transplante (ROBIEN et al., 2004).

### 1.3 Polimorfismo das Glutathion S-transferase

As glutathion S-transferases (GSTs) fazem parte de uma família de enzimas que catalisam a conjugação da glutathion (GSH) com uma variedade de xenobióticos e com compostos endógenos. As GSTs são, portanto, um grupo de enzimas multifuncionais que exercem importante função na biotransformação, com consequente detoxificação, ou em alguns casos, bioativação de muitos compostos endógenos (MIKELSAAR et al., 1994).

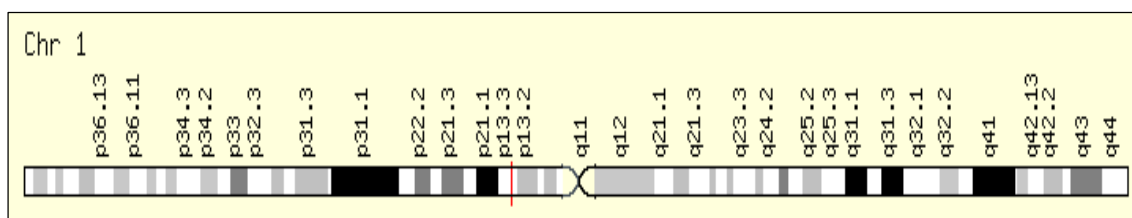
O sistema GST é composto, principalmente, de proteínas diméricas capazes de conjugar moléculas eletrofílicas com a glutathion reduzida (GSH), tornando-as geralmente menos tóxicas e de mais fácil excreção (ARRUDA et al., 1998). Essas proteínas diméricas correspondem a parte da família GST solúvel, composta por 16 genes divididos em 8 classes, das quais, em ao menos em 4, encontra-se o polimorfismo genético, que parece ter consequências funcionais para a enzima. Conseqüentemente, tais proteínas podem afetar a suscetibilidade individual aos xenobióticos (HAYES, 2000).

As GSTs da classe teta são consideradas as mais ancestrais do ponto de vista evolutivo, pois são detectadas em quase todos os organismos vivos. O gene da GST da classe Teta (GSTT1) está localizado na região 22q11.2 (LANDI, 2000) (**Figura 8**).



**Figura 8:** Posição do gene GST T1 no cromossomo 22, indicado pelo traço vermelho. (GeneCard: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTT1&search=GST>).

Codificadas por cinco genes diferentes, a classe mu das GSTs está localizada em tandem na região 1p13.3 (**Figura 9**). O gene da GSTM1 é polimórfico em humanos, causado pela deleção dessa região e conseqüente ausência da atividade dessa enzima, além dos alelos GST M1a M1b, que diferem em apenas um único par de bases no éxon 7 e codificam monômeros da enzima de atividade catalítica semelhante, já homozigoto GSTM1 nulo não expressa essa proteína (STRANGE et al., 2000).



**Figura 9:** Posição do gene GST M1 no cromossomo 1, indicado pelo traço vermelho. (GeneCard: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTM1&search=GST+M1>).

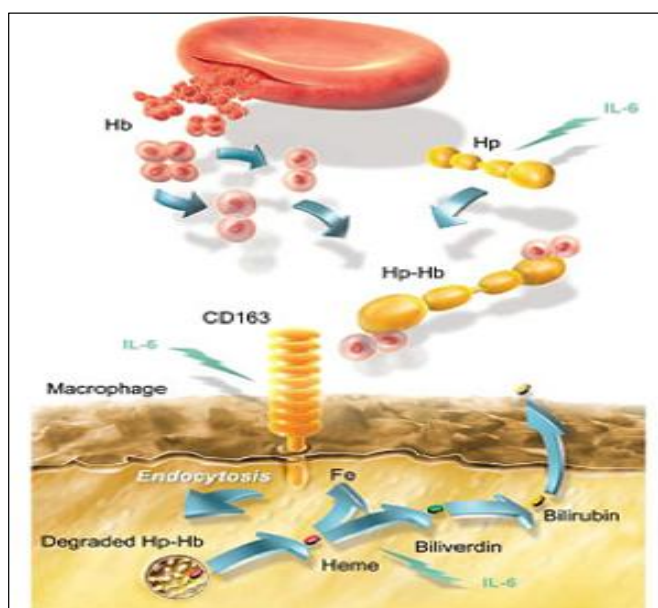
O gene para GST theta 1 (GSTT1) também pode estar deletado. Homozigotos nulos para GST M1 e T1 estão presentes em aproximadamente 50% e 20% dos indivíduos normais respectivamente, o que resulta na carência dessas proteínas ativas (BOARD 1981; HENGSTLER et al., 1998). Tal carência tem sido associada ao aumento da susceptibilidade a diversas doenças causadas por agentes ambientais, principalmente o câncer (ARRUDA et al., 1998). De forma mais específica, a deficiência das GSTs tem sido associada a um aumento de certos tipos de câncer epitelial, leucemia linfoblástica aguda em crianças negras, e mielodisplasias (MDS) (BELL et al., 1993; CHEN et al., 1996). Neste contexto, a exposição ambiental a agentes citotóxicos e genotóxicos, particularmente os derivados do benzeno, pode estar associada ao aumento do risco de LMC (BJORK et al., 2001). De fato, um aumento em homozigotos GSTT1 nulo foi observado em pacientes com LMC na Índia (MONDAL et al., 2005).

Tem sido reportado que o sexo também pode influenciar a susceptibilidade à leucemia aguda no polimorfismo GSTT1 nulo, verificando-se um maior risco de desenvolvimento desta leucemia em pessoas do sexo masculino (BOLUFER et al., 2007).

Em um estudo realizado com a população brasileira, no qual foram examinadas as frequências de polimorfismos em pacientes com LMC em relação à variabilidade clínica, verificou-se que a frequência dos genótipos nulos de GSTM1 estava diminuída em pacientes em fase acelerada ou com crise blástica, quando comparados com pacientes na fase crônica. Os resultados indicaram que a GSTM1 pode ser importante para a etiologia da LMC (LOURENÇO et al., 2005).

#### 1.4 Polimorfismo da Haptoglobina

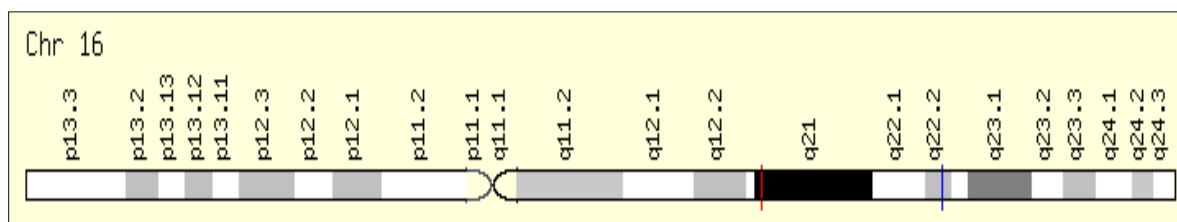
A haptoglobina (Hp) é uma  $\alpha_2$ -glicoproteína plasmática que se liga a hemoglobina (Hb) livre, prevenindo assim a ocorrência de dano oxidativo mediado pelo ferro contido no grupo heme. Sua síntese é estimulada por infecções ou inflamações (resposta de fase aguda). Após entrar na circulação, a Hp apresenta meia vida de 2-4 dias. O complexo é rapidamente removido da circulação por um receptor específico de macrófagos (CD163) (KRISTIANSEN et al., 2001) (**Figura 10**).



**Figura 10:** Mecanismo de ligação de Hp à Hb prevenindo estresse oxidativo (Adaptado KRISTIANSEN et al., 2001).

A proteína Hp consiste de quatro cadeias, duas alfa ( $\alpha$ ) com cerca de 9 kDa e duas cadeias beta ( $\beta$ ) de 33 kDa aproximadamente. Nos mamíferos, as cadeias  $\alpha$  e as cadeias  $\beta$  são ligadas por uma ligação dissulfeto. A ligação entre a Hp e a Hb está entre as mais fortes interações não-covalentes conhecidas em sistemas biológicos (KRZYSZTOF et al., 2010).

Dois locos gênicos foram inicialmente envolvidos na síntese de Hp, um para a síntese das cadeias  $\alpha$  e outro para a síntese das cadeias  $\beta$ . Evidências posteriores demonstraram o envolvimento de um único loco, no cromossomo 16 (16q22.1) (**Figura 11**), sendo que esse gene apresenta dois alelos codominantes, Hp1 e Hp2. O produto primário da tradução do RNAm da Hp é um polipeptídeo único que contém os elementos das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Presumivelmente, a Hp é sintetizada como uma proteína precursora única que é proteoliticamente processada após a tradução para formar as subunidades diferentes alfa e beta. Desta forma, a Hp humana expressa um polimorfismo genético como três fenótipos principais – Hp1-1, 2-1 e 2-2 – atribuídos a seus dois alelos comuns (LANGLOIS et al., 1996; MELAMED-FRANK et al., 2001; LEVI, 2004).



**Figura 11:** Posição do gene da haptoglobina no cromossomo 16, indicado pelo traço vermelho. (GeneCard: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HP&sarch=haptoglobin>).

O alelo Hp1 pode ser subdividido em Hp1F e Hp1S, os quais diferem em suas cadeias  $\alpha$ . Os polipeptídeos desses alelos diferem por dois aminoácidos nas posições 52 e 53, ácido aspártico e lisina em Hp1F e ácido glutâmico e asparagina em Hp1S. A diferença nas cadeias é visível na mobilidade eletroforética, onde Hp1F migra mais rápido que Hp1S. A cadeia  $\alpha$  do alelo Hp2 é quase o dobro da cadeia  $\alpha$  do alelo Hp1, visto que se originou da fusão de um alelo Hp1F com outro Hp1S, a partir de eventos de duplicação intragênica, presumivelmente por crossing-over desigual entre estes alelos estruturais. Assim, o polipeptídeo da cadeia  $\alpha$  do alelo Hp2 consiste de 142 aminoácidos, enquanto que Hp1 tem 83 aminoácidos (MAEDA, 1991 LANGLOIS et al., 1996; LEVY, 2004).

As diferenças funcionais entre as proteínas correspondentes aos diferentes fenótipos Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2, estão na velocidade de acesso aos espaços extravasculares (a Hp1-1 apresenta maior velocidade pelo menor tamanho); na remoção do complexo Hp-Hb pelo receptor do macrófago, situação em que a internalização do Hp1-1-Hb é mais rápida; e nas atividades de imunomodulação. Já foi demonstrado experimentalmente que a estequiometria de ligação da Hb com a Hp é independente do fenótipo (MELAMED-FRANK et al., 2001).

Tem sido relatado que várias diferenças funcionais entre os fenótipos Hp poderiam ter importantes consequências biológicas e clínicas. Autores correlacionam polimorfismos da Hp

com diferentes doenças como: neoplasias, patologias crônicas, doenças cardiovasculares, diabetes, hipercolesterolemia e prevalência de muitas doenças inflamatórias, incluindo infecções e desordens auto-imunes (LANGLOIS et al., 1996; AWADALLAH, 2003; LEVI, 2004). Estas diferenças funcionais entre os fenótipos da Hp são explicadas pela modulação do estresse oxidativo e pela síntese de prostaglandinas dependente do fenótipo. Verifica-se que os grandes polímeros Hp 2-2 proteínas apresentam elevada massa molecular, o que limita sua distribuição nos fluidos extravasculares. Por conseguinte, a capacidade antioxidante de fluidos do corpo é menos eficiente em indivíduos Hp 2-2. Os efeitos inibitórios dos genótipos Hp 2-2 e Hp 2-1 na síntese de prostaglandinas são menos acentuados do que o de Hp 1-1. Em virtude da Hp ser um dos inibidores endógenos da síntese das prostaglandinas, a ligação obrigatória Hb-Hp, promove a remoção dos compostos heme que catalisam a oxidação do ácido araquidônico em prostaglandina sintetase. Outras diferenças relatadas entre os fenótipos incluem atividades antigênica, bem como ligação para os macrófagos, incluindo receptores CD163 (LANGLOIS et al., 1996; NIELSEN et al., 2010).

A Hp, ao prevenir a ocorrência de danos no DNA por espécies reativas de oxigênio (EROs), influencia a susceptibilidade às leucemias (KRISTIANSEN et al., 2001). A produção de EROs em células progenitoras hematopoéticas é estimulada pela expressão de BCR-ABL (SATTTLER et al., 2000). Dessa forma, alguns estudos sugerem que as EROs podem contribuir para o aumento de danos no DNA em células BCR-ABL positivas (NOWICKI et al., 2004) e investigações referentes à importância desse polimorfismo em leucemias sugerem uma associação do fenótipo Hp1-1 com as leucemias LMA, LMC e LLA (NEVO et al., 1986; MITCHELL et al., 1988). Um estudo com pacientes com LMC, por meio da tecnologia de microarray para análise da expressão gênica das células leucêmicas, demonstrou que o gene Hp é um dos genes de regulação aumentada, porém os autores não verificaram a influencia dos diferentes genótipos da Hp (KANETA et al., 2003).



## 2 JUSTIFICATIVA

Os polimorfismos genéticos de enzimas que participam tanto na produção como nos processos de metilação do DNA (MTHFR), além das enzimas que metabolizam substâncias citotóxicas ou genotóxicas (GST), são descritos de forma constante na literatura científica, que ressalta sua relação com a fisiopatologia de diversas doenças (FRANCO et al., 2001; LOURENÇO et al., 2005).

Variantes da MTHFR foram relacionadas à redução da susceptibilidade à LMC e do risco de recaída pós transplante de medula óssea. (ROBIEN e ULRICH, 2003; ROBIEN et al., 2004; KIM et al., 2007; MOON et al., 2007; HUR et al., 2006; BARBOSA et al., 2008; ISMAIL et al., 2009). No entanto, para uma melhor compreensão da importância deste polimorfismo nas diversas etnias, é importante a realização de estudos em diferentes grupos étnicos (FRANCO et al., 1999; ROBIEN e ULRICH, 2003).

Em oposição ao aparente efeito protetor do polimorfismo MTHFR, variantes de genótipos nulos das GSTs podem ter um papel relevante no surgimento da doença (LOURENÇO et al., 2005; HUR et al., 2006), uma vez que os genótipos nulos podem ser importantes para etiologia da LMC e o acúmulo de substâncias mutagênicas pode estar relacionado com a incidência do cromossomo Ph (LANDI, 2000). Desse modo, tendo em vista que a frequência alélica das GST's apresenta diferenças intra-étnicas (COTTON et al. 2000; LANDI, 2000; CHO et al. 2005), novamente ressalta-se a importância de estudos de associação entre GST M1 e T1 e o risco de LMC em diferentes etnias para a uma maior compreensão da doença.

A atividade imunomodulatória da haptoglobina também tem sido investigada, demonstrando-se que diferentes fenótipos apresentam distintas atividades antioxidantes e que o genótipo Hp2-2 tem menor efeito protetor que o genótipo Hp1-1 (AWADALLAH, 2003), que corresponde a um pequeno dímero protéico, enquanto Hp2-1 é um polímero linear com dimensão intermediária e Hp2-2 é um grande polímero cíclico. Essas características são importantes determinantes da atividade de cada subtipo de Hp (MELAMED-FRANK et al., 2001). A influência da variação das frequências dos alelos da Hp no mecanismo de defesa ou na susceptibilidade à doença não estão bem esclarecidas na literatura, sendo relevante a realização novos estudos relacionando subtipos de Hp a alterações na susceptibilidade à leucemia. As frequências destes alelos variam mundialmente dependendo da origem étnica da população: a frequência do alelo Hp1 varia de 7% em regiões da Índia a mais de 70% na

África e América do Sul. Ambos os alelos (Hp1 e Hp2) tem sido associados à ocorrência de várias doenças (CARTER e WORWOOD, 2007).

Além disso, estudos realizados com diferentes populações, relacionando os polimorfismos MTHFR C677T, A1298C, GSTM1, GSTT1 e Hp à incidência da LMC, têm mostrado resultados inconsistentes (ROBIEN E ULRICH, 2003; ROBIEN et al., 2004; KIM et al., 2007; MOON et al., 2007; HUR et al., 2006; BARBOSA et al., 2008; ISMAIL et al., 2009). Tais resultados indicam a necessidade de uma avaliação do risco entre diversos grupos étnicos, de forma a possibilitar um melhor entendimento da significância biológica desses polimorfismos na LMC (FRANCO et al., 1999; ROBIEN e ULRICH, 2003).

Visto que a população brasileira é bastante heterogênea e miscigenada, formada com contribuições étnicas Européia, Africana e Ameríndia (ALVES-SILVA et al., 2000), e que tal miscigenação pode influenciar na distribuição dos polimorfismos, é importante que esta avaliação de risco seja verificada em nossa população, para evitar associações espúrias.

### **3 OBJETIVO**

O presente trabalho tem como objetivo principal o estudo dos polimorfismos dos genes MTHFR, GSTT1 e GSTM1 e Hp em indivíduos portadores da LMC, verificando, por meio de um estudo caso-controle, uma possível associação dos genótipos com a ocorrência da doença. Visando atingir esse objetivo geral, foram buscados:

- Verificar a distribuição da frequência dos polimorfismos nas populações estudadas;
- Verificar o risco da ocorrência de LMC para os genótipos estudados de acordo com o sexo, a faixa etária e a cor da pele das populações caso e controle.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os procedimentos laboratoriais deste estudo foram realizados no Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB).

Para a realização desta pesquisa foi elaborado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (Anexo 1). O TCLE foi lido e assinado pelos voluntários previamente à sua participação nesta pesquisa, na presença dos pesquisadores responsáveis. Os voluntários foram devidamente informados sobre o direito de solicitar qualquer informação durante a realização dos trabalhos, bem como, de abandonar a pesquisa a qualquer momento, mediante simples comunicação à coordenadora do projeto.

### **4.1 Seleção dos pacientes**

Para a realização da pesquisa foram selecionados 105 pacientes com diagnóstico de LMC, em tratamento no Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF).

#### **4.1.1 Critérios de Inclusão**

Foram incluídos na pesquisa pacientes maiores de 18 anos ( $47,96 \pm 14,35$  anos), portadores de LMC. A existência da doença foi determinada pela presença do cromossomo Ph e/ou pela ocorrência de PCR positivo para BCR-ABL.

#### **4.1.2 Critérios de Exclusão**

Pacientes em crise blástica de LMC, LLA Ph positivos ou incapazes de compreenderem os termos do TCLE foram excluídos da pesquisa.

#### **4.1.3 Seleção do grupo controle**

O grupo controle do estudo foi constituído de 273 amostras de voluntários saudáveis (indivíduos hígidos), de ambos os sexos, não relacionados (sem qualquer grau de parentesco), com idade variando entre 20 a 75 anos ( $35,74 \pm 15,01$ ), recrutados em faculdades, na UnB, no HBDF e em empresas de Brasília.

## 4.2 Coleta de amostra de sangue periférico

Após a devida anuência dos voluntários em participar desse estudo (Anexo 2), e seguindo os preceitos recomendados pela Comissão de Ética em Pesquisa, realizou-se a coleta de 4 mL de sangue periférico em todos os participantes do presente projeto de pesquisa, mediante punção venosa, utilizando-se de seringas e agulhas descartáveis estéreis.

As amostras coletadas foram submetidas ao processo de centrifugação a 1.500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. A fração leucocitária de cada amostra foi transferida para microtubos de 2 ml previamente identificados por códigos, mantendo a privacidade dos doadores. A esta alíquota, cuidadosamente removida com ajuda de uma pipeta Pasteur, foi acrescentado aproximadamente igual volume de solução tampão de estocagem de eritrócitos (0,0598 M citrato trisódico; 0,02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0197 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40% de glicerol, pH 7,1). Após homogeneização, as amostra foram armazenadas em freezer a -20°C.

## 4.3 Extração de DNA

A partir da fração leucocitária previamente armazenada a extração de DNA foi realizada por kit extração GFX™ da Amersham Biosciences, de acordo com as especificações do fabricante, e congelados a -20°C.

## 4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e visualização dos produtos de amplificação

Foram estudados cinco marcadores genéticos (**Tabela 1**). Na mistura da reação preparada para cada sistema foi adicionado o DNA correspondente de cada amostra, realizando-se uma ligeira homogeneização e acrescentando-se uma gota de óleo mineral para impedir a evaporação dos reagentes. Posteriormente os tubos foram colocados em um termociclador MJ PTC-100 (MJ. Research Inc., Waltham, MA 02451 USA).

Os iniciadores foram diluídos com água mili-Q esterelizada para uma concentração de 50 µM utilizando-se para base de calculo a quantidade de nanomoles obtidos na síntese destes (dados fornecidos pelo fabricante). Uma alíquota de 100 µM de iniciadores diluídos foi então

depositada em tubo e estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para o uso durante os preparos do procedimento de PCR utilizaram-se soluções de trabalho na concentração de  $10\ \mu\text{M}$  de cada iniciador. A cada conjunto de reações foi incluído controle negativo, ou seja, um tubo contendo água mili-Q na quantidade proporcional de DNA com os outros reagentes da PCR. A quantidade de DNA utilizada na PCR foi de 20 ng, para isso após a extração e quantificação das amostras de DNA o volume foi ajustado para a PCR.

**Tabela 1:** Condições da mistura para reação de PCR para os genes estudados.

Marcadores	Reagentes							Total
	Água Mili-Q <sup>1</sup> ( $\mu$ L)	Tampão <sup>2</sup> ( $\mu$ L)	MgCl	Iniciadores ( $\mu$ L)	dNTP <sup>3</sup>	Taq ( $\mu$ L)	DNA (25ng/ $\mu$ L)	Total ( $\mu$ L)
MTHFR C677T A1298C	18,69	3,67	0,6	C677T 0,15 A1298C 0,25	0,5	0,25	*	24,11
GSTM1	8,37	1,25	-	0,90	0,13	0,5	*	11,15
GSTT1	8,37	1,25	-	1,0	0,13	0,5	*	11,25
Haptoglobina	8,06	1,57	0,63	0,50	1,25	0,08	*	12,09

<sup>1</sup>água destilada, deionizada e autoclavada; <sup>2</sup>tampão com MgCl<sub>2</sub> 2 mM fornecido pelo fabricante da Taq DNA Polimerase; <sup>3</sup>10 mM; <sup>4</sup>0,2  $\mu$ M de cada iniciador; <sup>5</sup>5U/ $\mu$ l; \*variou de acordo com a quantificação do DNA.

#### 4.5 Genotipagem da MTHFR C677T A1298C:

A **Tabela 2** mostra a sequência dos iniciadores utilizados na PCR para a genotipagem da MTHFR.

**Tabela 2:** Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para amplificação da MTHFR.

MTHFR	Sequência do primer ou iniciador	Enzima de Restrição	Referência
C677T	Sense (5´ TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGGGA 3´)	Hinf I	YI et al., 2002
	Antisense (5´ AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3´)		
A1298C	Sense (5´-CAAGGAGGAGCTGCTGAAGA -3´)	MboII	YI et al., 2002
	Antisense (5´ CCACTCCAGCATCACTCACT-3´)		

As condições de PCR envolveram uma desnaturação inicial do DNA a 95°C por 8 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação a 95°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão) e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados, de 198 e 128 pb foram digeridos com as endonucleases Hinf I e MboII nas condições apresentadas nas **Tabelas 3 e 4**. Os produtos de PCR e os fragmentos de restrição foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante, a 150V, 20-30 mA, durante 2 horas e coloração com nitrato de prata (**Figura 12**).

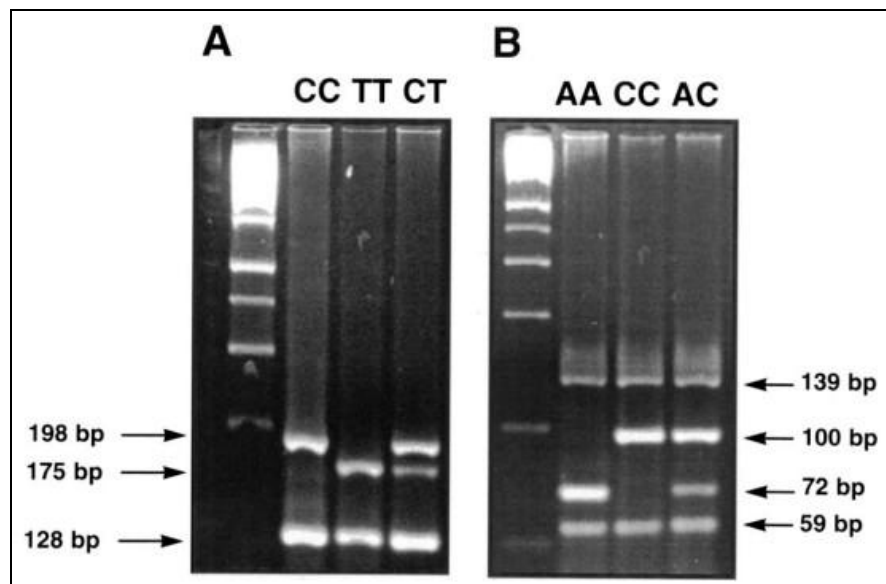
**Tabela 3:** Concentrações e quantidade dos reagentes empregados na digestão do produto da PCR da MTHFR C677T.

Reagente	Volume por tubo (µL)
Água mili-Q	13,4
Tampão	1,0
Hinf I	0,1
Total do Mix	14,5
Produto da PCR	4,0
Volume final	18,5



**Tabela 4:** Concentrações e quantidade dos reagentes empregados na digestão do produto da PCR da MTHFR A1298C.

Reagente	Volume por tubo (µL)
Água mili-Q	8,15
Tampão	1,0
BSA	0,1
Mbo II	0,1
Total do Mix	9,35
Produto da PCR	4,0
Volume final	13,35



**Figura 12:** Análise dos genótipos dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da MTHFR (Adaptado YI *et al.*, 2002).

A amplificação por PCR gerou dois fragmentos, de 198 pb e 128 pb, relativos aos locos 677 e 1298, respectivamente. (A) MTHFR C677T: o produto amplificado do genótipo 677CC permaneceu com 198 pb, visto que o alelo selvagem não apresenta o sítio de restrição para enzima Hinf I (YI *et al.*, 2002). A substituição, ao criar um sítio de restrição, gerou os fragmentos 175 pb e 23 pb (este último não retido no gel) (YI *et al.*, 2002). Assim, o genótipo 677CT foi determinado pela presença de duas bandas, de 198 e 175 pb, enquanto o genótipo 677CC, de uma banda de 175 pb. (B) MTHFR A1298C: o genótipo 1298AA foi definido pela presença de uma única banda de 72 pb; o genótipo 1298AC, pela presença de duas bandas, de 100 e 72 pb; e o genótipo 1298CC pela presença de uma única banda de 100 pb. O fragmento de 28 pb não foi

retido no gel. As bandas de 139 e 59 pb presentes em todos os genótipos foram decorrentes da digestão do fragmento de 198 pb (loco 677) pela enzima MboII.

#### 4.6 Genotipagem das GSTs (GSTM1 e GSTT1)

Os fragmentos de GSTM1 e GSTT1 foram amplificados simultaneamente, como proposto por CHEN et al. (1996), usando  $\beta$ -globina como controle positivo. A ausência de um produto de amplificação combinada com a presença de uma banda de controle positivo (268 pb do fragmento de DNA-globina  $\beta$ ) indicou a presença do genótipo variante nulo para ambos os polimorfismos (**Tabela 5**). Foram utilizados três iniciadores nas reações de PCR para GSTM1. O primeiro para o intron 6 (GSTM1/6) e dois iniciadores específicos para o exon 7, um para GSTM1 A (GSTM1E7A) e outro para GSTM1 B (GSTM1E7B). Isto devido ao polimorfismo presente no exon 7 do gene GSTM1.

**Tabela 5:** Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para amplificação de GSTM1, GSTT1 e  $\beta$ -globina.

Marcador	Sequência do primer ou iniciador	Referência
<b>GSTM1</b>		
GSTM1/6	5' GCTTACCGTGTTATGGAGG TTC 3'	
GSTM1E7A	5' TTGGGAAGGCGTCCAAGCGC3'	
GSTM1E7B	5' TTGGGAAGGCTGCCAAGCAG 3'	
<b>GSTT1</b>		
Sense	5' TTGGGAAGGCGTCCAAGCGC3'	Chen <i>et al.</i> 1996
Antisense	5' TTGGGAAGGCGTCCAAGCGC3'	
<b><math>\beta</math>-globin</b>	Controle positivo	
Beta 1	5' CAACTTCATCCACGTTACCC3'	
Beta 2	5' GAAGAGCCAAGGACAGTTAC3'	

As condições de PCR envolveram uma desnaturação inicial do DNA a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto e 60°C por 1 minuto (extensão) e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos gerados foram de 480 pb GSTT1, 268 pb do gene da  $\beta$ -globina (controle positivo) e 132 pb GSTM1, sendo visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante, a 150V, 20-30 mA, durante 2 horas e coloração com nitrato de prata 1% (**Figura 13**).



**Figura 13:** Genotipagem do polimorfismo da GST M1T1.

#### 4.7 Genotipagem da Haptoglobina

Para determinação dos genótipos da Hp foram necessárias três PCRs distintas, uma para cada alelo da cadeia  $\alpha$  da haptoglobina (Hp1S, Hp1F, Hp2) seguindo protocolo de YANO, et al. (1998)( **Tabelas 6 e 7**).

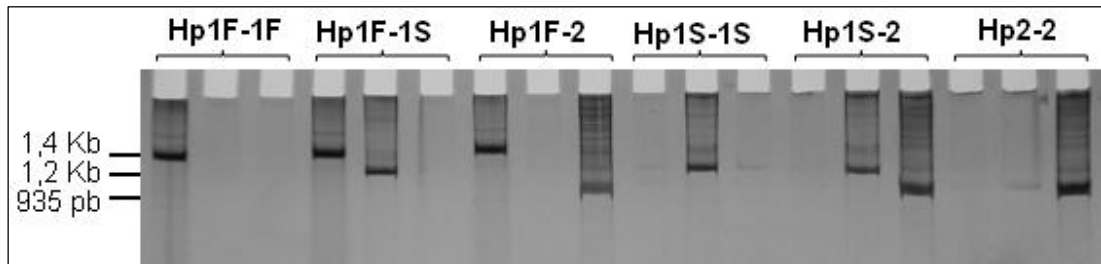
**Tabela 6:** Pares de iniciadores do polimorfismo da Haptoglobina.

Alelo	Par de Iniciadores
Hp <sup>1F</sup>	F3 e C72
Hp <sup>1S</sup>	C51 e S2
Hp <sup>2</sup>	F3 e C42

**Tabela 7:** Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para amplificação da Haptoglobina.

Marcador Haptoglobina	Sequência do primer ou iniciador	Referência
F3	CAG GAG TAT ACA CCT TAA ATG	YANO <i>et al.</i> 1998
C72	AAT TTA AAA TTG GCA TTT CGC C	
C51	GCA ATG ATG TCA CGG ATA TC	
S2	TTA TCC ACT GCT TCT CAT TG3	
C42	TTA CAC TGG TAG CGA ACC GA	

As condições de PCR envolveram uma desnaturação inicial do DNA a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 2 minutos. Os fragmentos gerados foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante, a 150V, 20-30 mA, durante 1 hora e 30 minutos e coloração com nitrato de prata 1 % (**Figura 14**).



**Figura 14:** Genotipagem do polimorfismo da cadeia  $\alpha$  da haptoglobina.

#### 4.8 Procedimentos para eletroforese – Análise do produto de PCR e de restrição

Para visualização do produto da PCR e das restrições foram utilizados géis de poliacrilamida em eletroforese vertical. Inicialmente preparou-se o tampão TBE 10X pH 8,0 (Tris/HCl 0,89 M, EDTA 0,08 M, Ácido Bórico 0,89 M) e a solução de acrilamida 29% e bis-acrilamida 1% para posterior preparo da solução do gel a 6%.

Após limpeza das placas de vidro com auxílio de grampos de aço fixou-se os espaçadores. A solução de acrilamida a 6% foi preparada em seguida, adicionando os catalisadores TEMED e persulfato de amônia para que o gel fosse colocado na placa (**Tabela 8**). O tempo médio para polimerização foi de 30 minutos. À cuba de eletroforese foi adicionada a solução de TBE 1X preparada pela diluição de estoque. Após a fixação das placas na cuba, a voltagem foi programada para 50 volts durante os primeiros minutos e posteriormente aumentada para 150 V. O tempo de corrida variou de 1 hora e 30 minutos a 2 horas conforme o marcador.

A coloração foi feita adicionando ao gel a solução fixadora (750 ml de H<sub>2</sub>O, 144 ml de álcool etílico e 6 ml de ácido acético), por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 1 mL de nitrato de prata 1% e manteve-se em agitação por 5 minutos. A solução fixadora foi então desprezada e o gel foi lavado rapidamente com água destilada e mergulhado em solução reveladora (22,5g de NaOH/L) previamente aquecida (70°C), com 500  $\mu$ l de formaldeído, homogeneizando até que as bandas fossem visualizadas.

**Tabela 8:** Preparo do gel de Poliacrilamida 6%.

Gel	Reagentes						
	Solução de acrilamida	Glicerol	Água	TBE 10X	TEMED	APS	Volume Final
6%	4 ml	1,4 ml	12,4 ml	2 ml	15 $\mu$ l	300 $\mu$ l	20 ml

## 4.9 Análise Estatística

### 4.9.1 Comparação das amostras dos grupos controle e LMC

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 15.0. As variáveis contínuas foram testadas para a distribuição normal com Shapiro-Wilk, e as diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney (dados não-normalizados). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4.9.1.1 ODDS Ratio

O teste de Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC) foi calculado para estimar o risco de associação entre os genótipos e LMC. Para tal, o teste do qui-quadrado de Pearson foi aplicado e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 4.9.2 Estatística de populações

#### 4.9.2.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A distribuição dos alelos de um dado loco segue, obedecidas certas premissas, a expansão de polinômios, de acordo com o número de alelos desse loco. A essa situação chamamos Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e espera-se que os alelos sejam assim distribuídos em situações normais. O EHW consiste em um modelo simples que representa o ponto de partida para se detectar a ocorrência de estruturação populacional, seleção natural, deriva genética, fluxo gênico e mutação.

As frequências alélicas e genóticas foram obtidas utilizando-se o programa GENEPOP versão 4.1 por meio do método da cadeia de Markov (<http://genepop.curtin.edu.au>). A hipótese nula  $H_0$  do equilíbrio foi baseada no pressuposto que a distribuição da frequência genotípica esperada é igual à observada.

Para os marcadores GSTM1 e GSTT1 foram considerados os genótipos nulo = -/- (ausência do gene) e não-nulo = +/+ e +/-, visto que o método de PCR não é apropriado para distinguir homozigotos (+/+, tipo selvagem) e heterozigotos (+/-).

Foram realizados testes para verificação de excesso e deficiência de heterozigotos, também pelo programa GENEPOP versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>). Esses testes verificam a hipótese alternativa  $H_A$  de excesso ou deficiência de heterozigotos em comparação com o esperado pelo EHW, também utilizando a cadeia de Markov.

#### **4.9.2.2 Dados da Estatística F (Fis, Fit e Fst)**

As estatísticas F de Wright (1921) quantificam o efeito do endocruzamento da estrutura populacional (subdivisão populacional), que tem sido denominado índice de fixação. Essa ferramenta estatística foi aplicada neste estudo por ser útil para entender o padrão de seleção associado a alelos polimórficos. O índice de fixação (FST) é um útil marcador de diferenciação genética; esse índice equaliza a redução de heterozigosidade esperada com o cruzamento aleatório em qualquer nível populacional. O FST quantifica o grau de diferenciação genética entre sub-populações pela comparação de  $h_t$  (heterozigose total esperada em toda população) e  $h_s$  (heterozigose média esperada dentro das sub-populações). Portanto avalia se existe deficiência de heterozigotos dentro da população total devido à diferenciação entre sub-populações. O coeficiente de endocruzamento (FIS) indica se existe endogamia dentro de cada sub-população pela comparação de  $h_s$  (heterozigose média esperada dentro das sub-populações) e  $h_o$  (heterozigose observada dentro das sub-populações) portanto, o FIS avalia, em média, a deficiência de heterozigoto dentro das sub-populações. O coeficiente global de endogamia (FIT) avalia se existe deficiência de heterozigotos dentro da população total em relação ao esperado de Hardy-Weinberg pela comparação de  $h_t$  (heterozigose total esperada em toda população) e  $h_o$  (heterozigose observada dentro das sub-populações).

As estatísticas  $F$  foram calculadas usando o programa GENEPOP versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>). Os parâmetros definidos como índices de fixação baseados na heterozigose média observada e esperada em cada amostra e na amostra como um todo, foram: 1)  $F_{is}$  (coeficiente de endogamia em uma população); 2)  $F_{it}$  (coeficiente global de endogamia, mede a existência de endogamia devida a sub-estruturação na amostra global) e 3)  $F_{ST}$  (índice de fixação) mede a diferenciação das amostras.

A análise desses parâmetros considerou os marcadores codominantes MTHFR e Hp para as populações caso e controle. Para GSTM1 e GSTT1, o índice de fixação ( $F_{ST}$ ) foi calculado usando o programa Alerquin 3.1.1. Os genótipos não nulos (homozigotos e heterozigotos) foram comparados em conjunto com o grupo variante nulo.

#### **4.9.2.3 Teste de Heterogeneidade**

O teste do Qui-quadrado de heterogeneidade foi utilizado para verificar se as frequências alélicas ou genotípicas de um loco nas populações são homogêneas. A  $H_0$  (hipótese nula) considerada foi de que as distribuições das frequências alélicas não diferem entre as amostras.

#### **4.9.2.4 Desequilíbrio de ligação**

O desequilíbrio de ligação, situação em que a herança de um loco não é independente da de outro loco, pode ser gerado por inúmeros fatores, entre eles a proximidade física dos locos, miscigenação e estruturação populacional. Para verificar a ocorrência de desequilíbrio de ligação (DL) para os dois polimorfismos da MTHFR C677T e A1298C, foram utilizados o programa GENEPOP versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>). Estabelecendo como  $H_0$  a ausência de DL, o programa realiza o teste exato de Fisher para tabelas de contingência construídas para os pares de locos utilizando a cadeia de Markov.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Comparação das amostras dos grupos controle e LMC

As frequências de distribuição dos genótipos de Hp e GSTT1 foram semelhantes nos grupos controle e LMC, o mesmo não sendo observado para GSTM1 e MTHFR A1298C. Para GSTM1, o genótipo nulo apresentou frequência significativamente maior no grupo controle do que no grupo de LMC ( $p=0,029$ ), enquanto o genótipo não-nulo prevaleceu no grupo LMC. Para MTHFR A1298C, a frequência do genótipo AA foi maior no grupo LMC do que no grupo controle, enquanto os genótipos contendo o alelo variante (AC e CC) predominaram no grupo controle ( $p=0,007$ ) (**Tabela 9**). Para ambos os polimorfismos, tais diferenças foram particularmente relacionadas ao sexo feminino ( $p=0,005$  para GSTM1 e  $p=0,029$  para MTHFR A1298C). Diferença na distribuição dos genótipos no sexo masculino foi observada apenas para o polimorfismo MTHFR C677T, onde o genótipo variante CC apresentou frequência superior no grupo LMC ( $p=0,015$ ) (**Tabela 10**).



**Tabela 9:** Frequência da distribuição dos genótipos Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos grupos Controle e LMC.

<b>Marcador Genético</b>	<b>Controle N(%)</b>	<b>LMC N(%)</b>
<b>Hp</b>		
1F-1F	16(5,9)	4(3,81)
1F-1S	18(6,6)	12(11,43)
1S-1S	28(10,3)	5(4,76)
1F-2	36(13,2)	13(12,38)
1S-2	93(34,1)	32(30,48)
2-2	82(30)	39(37,14)
P-valores		0,402
<b>GSTM1</b>		
M1-	176(64,5)	55(52,4)
M1+	97(35,5)	50(47,6)
P-valores		0,029
<b>GSTT1</b>		
T1-	65(23,8)	21(20)
T1+	208(76,2)	84(80)
P-valores		0,421
<b>MTHFR C677T</b>		
CC	140(51,3)	46(43,8)
CT	114(41,8)	47(44,8)
TT	19(7)	12(11,4)
P-valores		0,125
<b>MTHFR A1298C</b>		
AA	119(43,6)	61(58,1)
AC	143(52,4)	43(41)
CC	11(4)	1(1)
P-valores		0,007

Os p-valores foram gerados pelo teste de Mann-Whitney, usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 15.0.

**Tabela 10:** Frequência da distribuição por sexo dos genótipos Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos grupos Controle e LMC.

Marcador Genético	Feminino		Masculino	
	Controle N(%)	LMC N(%)	Controle N(%)	LMC N(%)
<b>Hp</b>				
1F-1F	12(4,4)	1(0,95)	4(1,5)	3(2,86)
1F-1S	9(3,3)	7(6,67)	9(3,3)	5(4,76)
1S-1S	13(4,8)	3(2,86)	15(5,5)	2(1,9)
1F-2	22(8,1)	6(5,71)	14(5,1)	7(6,67)
1S-2	46(16,8)	16(15,24)	47(17,2)	16(15,24)
2-2	43(15,8)	18(17,14)	39(14,3)	21(20)
P-valores	0,455		0,681	
<b>GSTM1</b>				
M1-	95(34,8)	22(21)	81(29,7)	33(31,4)
M1+	50(18,3)	29(27,6)	47(17,2)	21(20)
P-valores	0,005		0,738	
<b>GSTT1</b>				
T1-	32(11,7)	7(6,7)	33(12,1)	14(13,3)
T1+	113(41,4)	44(41,9)	95(34,8)	40(38,1)
P-valores	0,196		0,984	
<b>MTHFR C677T</b>				
CC	68(24,9)	25(23,8)	72(26,4)	21(20)
CT	65(23,8)	22(21,0)	49(18,0)	25(23,8)
TT	12(4,4)	4(3,8)	7(2,6)	8(7,6)
P-valores	0,797		0,015	
<b>MTHFR A1298C</b>				
AA	54(19,8)	28(26,7)	65(23,8)	33(31,4)
AC	86(31,5)	22(21,0)	57(20,9)	21(20)
CC	5(1,8)	1(1,0)	6(2,2)	0(0)
P-valores	0,029		0,139	

Os p-valores foram gerados pelo teste de Mann-Whitney, usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 15.0.

Na análise da distribuição dos genótipos por faixa etária (**Tabela 11**), GSTM1 apresentou diferença significativa entre os grupos controle e LMC para maiores de 60 anos ( $p=0,006$ ), enquanto MTHFR A1298C, para 20-40 anos ( $p=0,022$ ). Para GSTM1, a frequência de distribuição do genótipo não-nulo foi superior no grupo LMC, enquanto o genótipo nulo distribuiu-se semelhantemente nos dois grupos. Para MTHFR A1298C, as frequências dos genótipos contendo o alelo variante foram superiores no grupo controle. Nenhuma diferença significativa foi observada para os outros marcadores.

**Tabela 11:** Frequência da distribuição por faixa etária dos genótipos Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos grupos Controle e LMC.

Marcador Genético	20-40 anos		41-60 anos		> 60 anos	
	Controle N(%)	LMC N(%)	Controle N(%)	LMC N(%)	Controle N(%)	LMC N(%)
<b>Hp</b>						
1F-1F	14(5,1)	2(1,9)	2(0,7)	2(1,9)	0(0)	0(0)
1F-1S	9(3,3)	2(4,76)	8(2,9)	4(3,81)	0(0)	3(2,86)
1S-1S	22(8,1)	5(0,95)	4(1,5)	4(3,81)	1(0,4)	0(0)
1F-2	27(9,9)	5(4,76)	9(3,3)	6(5,71)	0(0)	2(1,9)
1S-2	55(20,1)	9(8,57)	27(9,9)	14(13,33)	2(0,7)	9(8,57)
2-2	51(18,7)	14(13,33)	24(8,8)	17(16,19)	7(2,6)	8(7,62)
P-valores	0,591		0,816		0,575	
<b>GSTM1</b>						
M1-	113(41,4)	22(21)	49(17,9)	27(25,7)	14(5,1)	6(5,7)
M1+	65(23,8)	14(13,3)	26(9,5)	20(19)	6(2,2)	16(15,2)
P-valores	0,788		0,342		0,006	
<b>GSTT1</b>						
T1-	45(16,5)	10(9,5)	15(5,5)	10(9,5)	5(1,8)	1(1)
T1+	133(48,7)	26(24,8)	60(22)	37(35,2)	15(5,5)	21(20)
P-valores	0,770		0,866		0,062	
<b>MTHFR C677T</b>						
CC	91(33,3)	15(14,3)	39(14,3)	23(21,9)	10(3,7)	8(7,6)
CT	73(26,7)	16(15,2)	32(11,7)	19(18,1)	9(3,3)	12(11,4)
TT	14(5,1)	5(4,8)	4(1,5)	5(4,8)	1(0,8)	2(1,9)
P-valores	0,219		0,571		0,352	
<b>MTHFR A1298C</b>						
AA	79(28,9)	23(21,9)	31(11,4)	25(23,8)	9(3,3)	13(12,4)
AC	90(33,0)	13(12,4)	42(15,4)	21(20)	11(4,0)	9(8,6)
CC	9(3,3)	0(0)	2(0,7)	1(1,0)	0(0)	0(0)
P-valores	0,022		0,209		0,367	

Os p-valores foram gerados pelo teste de Mann-Whitney, usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 15.0.

Diferenças significativas na distribuição por cor da pele foram observadas apenas para o polimorfismo MTHFR A1298C, onde os genótipos AC e CC predominaram no grupo controle dos indivíduos de cor branca ( $p=0,017$ ) (**Tabela 12**).

**Tabela 12:** Frequência da distribuição por cor da pele dos genótipos Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos grupos Controle e LMC .

Marcador Genético	Branca		Parda		Negra	
	Controle N(%)	LMC N(%)	Controle N(%)	LMC N(%)	Controle N(%)	LMC N(%)
<b>Hp</b>						
1F-1F	7(2,6)	2(1,9)	8(2,9)	1(0,95)	1(0,4)	1(0,95)
1F-1S	9(3,3)	2(1,9)	7(2,6)	7(6,67)	2(0,7)	3(2,86)
1S-1S	11(4)	2(1,9)	13(4,8)	3(2,86)	4(1,5)	0(0)
1F-2	24(8,8)	5(4,76)	11(4)	6(5,71)	1(0,4)	2(1,9)
1S-2	54(19,8)	13(12,38)	26(9,5)	19(18,1)	13(4,8)	0(0)
2-2	51(18,7)	17(16,19)	26(9,5)	20(19,05)	5(1,8)	2(1,9)
P-valores	0,342		0,209		0,067	
<b>GSTM1</b>						
M1-	101(37)	21(20)	61(22,3)	31(29,5)	14(5,1)	3(2,9)
M1+	54(19,8)	20(19)	30(11)	25(23,8)	13(4,8)	5(4,8)
P-valores	0,102		0,139		0,482	
<b>GSTT1</b>						
T1-	37(13,6)	5(4,8)	24(8,8)	16(15,2)	4(1,5)	0(0)
T1+	118(43,2)	36(34,3)	67(24,5)	40(38,1)	23(8,4)	8(7,6)
P-valores	0,106		0,804		0,254	
<b>MTHFR C677T</b>						
CC	74(27,1)	15(14,39)	46(16,9)	25(23,8)	20(7,3)	6(5,7)
CT	66(24,2)	21(20)	42(15,4)	24(22,9)	6(2,2)	2(1,9)
TT	15(5,5)	5(4,8)	3(1,1)	7(6,7)	1(0,4)	0(0)
P-valores	0,215		0,243		0,918	
<b>MTHFR A1298C</b>						
AA	68(24,9)	26(24,8)	36(13,2)	29(27,6)	15(5,5)	6(5,7)
AC	79(28,9)	15(14,3)	54(19,8)	26(24,8)	10(3,7)	2(1,9)
CC	8(2,9)	0(0)	1(0,4)	1(1,0)	2(0,7)	0(0)
P-valores	0,017		0,171		0,295	

Os p-valores foram gerados pelo teste de Mann-Whitney, usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 15.0.

## 5.2 Estatística de populações

Desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi observado para Hp no grupo controle ( $p=0,0022$ ), GSTM1 e GSTT1 em ambos os grupos ( $p=0,000$  para ambos) e MTHFR A1298C em ambos os grupos ( $p=0,0000$  para controle e  $p=0,0374$  para LMC). Para Hp, tal resultado foi compatível com deficiência de heterozigotos no grupo controle ( $p=0,0374$ ), devido principalmente a um maior número de indivíduos 1F-1F e a um menor número de indivíduos 1F-1S e 1F-2 em relação ao esperado. Para as GSTs, tal resultado foi decorrente do método de PCR não ser apropriado para distinguir homozigotos (+/+, tipo selvagem) e

heterozigotos (+/-), sendo considerados apenas os genótipos nulo e não-nulo. Para o loco da MTHFR A1298C, o desvio no EHW foi compatível com excesso de heterozigotos tanto no grupo controle ( $p=0,000$ ) quanto no grupo LMC ( $p=0,0217$ ) (**Tabela 13**). Em ambos os grupos foi observado um forte desequilíbrio de ligação genotípica para os locos da MTHFR ( $p<0,001$  para ambos os grupos) (**Tabelas 14 e 15**).

Os resultados das estatísticas F indicaram diferenciação genética leve para o loco da MTHFR A1298C ( $F_{ST}=0,0166$ ), e GSTM1 ( $F_{ST} =0,0238$ ) com resultados compatíveis com seleção a favor dos heterozigotos ( $F_{IS}=-0,2334$ ;  $F_{IT}=-0,2130$ ). Contudo não foi observada sub-estruturação populacional ( $F_{ST} =0.0088$ ). O teste de heterogeneidade mostrou distribuição homogênea dos genótipos de Hp, GSTT1 e MTHFR C677T nos grupos controle e LMC, e distribuição heterogênea dos mesmo para os locos GSTM1 ( $p=0,0308$ ) e MTHFR A1298C ( $p=0,0221$ ) (**Tabela 16**).

**Tabela 13:** Distribuição das frequências alélicas de Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C nos grupos Controle e LMC e dados para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Alelos	Frequências alélicas		Genótipos	Número de indivíduos observados		Número de indivíduos esperados		Coeficiente de Endogamia Intrapopulacional ( $F_{IS}$ )		Teste do EHW (p-valores)	
	Controle	LMC		Controle	LMC	Controle	LMC	Controle	LMC	Controle	LMC
<b>Hp</b>			<b>Hp</b>								
1F	0,16	0,16	1F-1F	16	4	6,72	2,53				
1S	0,30	0,26	1F-1S	18	12	26,35	8,53				
2	0,54	0,58	1S-1S	28	5	25,43	6,84	0,0948	0,0459	0,0022	0,1371
			1F-2	36	13	46,23	19,42				
			1S-2	93	32	89,78	30,78				
			2-2	82	39	78,49	35,90				
<b>GSTM1</b>			<b>GSTM1</b>								
M1-	0,64	0,52	Nulo	176	50	113,35	28,68	-	-	0,0000	0,0000
M1+	0,36	0,48	Não-nulo	97	55	159,65	76,31				
<b>GSTT1</b>			<b>GSTT1</b>								
T1-	0,24	0,20	Nulo	65	21	15,39	4,12	-	-	0,0000	0,0000
T1+	0,76	0,80	Não-nulo	208	84	257,61	100,88				
<b>MTHFR C677T</b>			<b>MTHFR C677T</b>								
C	0,72	0,66	CC	140	46	142,06	45,89	-0,0375	0,0047	0,6491	1,0000
T	0,28	0,34	CT	114	47	109,89	47,22				
			TT	19	12	21,06	11,89				
<b>MTHFR A1298C</b>			<b>MTHFR A1298C</b>								
A	0,70	0,79	AA	119	61	132,83	64,74	-0,2403	-0,2116	0,0000	0,0374
C	0,30	0,21	AC	143	43	115,35	35,53				
			CC	11	1	24,83	4,74				

$p < 0,05$  indica desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os dados foram gerados pelo programa estatístico Genepopweb versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>). Para os marcadores GSTM1 e GSTT1 foram considerados os genótipos nulo = -/- e não-nulo = +/+ e +/-, visto que o método de PCR não é apropriado para distinguir homozigotos (+/+, tipo selvagem) e heterozigotos (+/-).

**Tabela 14:** Tabela de contingência para o desequilíbrio genotípico entre os locos 677 e 1298 da MTHFR no grupo controle.

MTHFR A1298C	MTHFR C677T			Total
	CC	CT	TT	
AA	41	62	16	119
AC	88	52	3	143
CC	11	0	0	11
Total	140	114	19	273

Os dados foram gerados pelo programa Genepop, versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>)

**Tabela 15:** Tabela de contingência para o desequilíbrio genotípico entre os locos 677 e 1298 da MTHFR no grupo LMC.

MTHFR A1298C	MTHFR C677T			Total
	CC	CT	TT	
AA	<b>21</b>	<b>28</b>	<b>12</b>	<b>61</b>
AC	<b>24</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>43</b>
CC	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Total	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>12</b>	<b>105</b>

Os dados foram gerados pelo programa Genepop, versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>)

**Tabela 16:** Dados de diversidade genética nos grupos Controle e LMC, Estatísticas F e teste de heterogeneidade (qui-quadrado ( $\chi^2$ )) para os marcadores genéticos Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C.

Marcador Genético	Heterozigosidade observada ( $H_o$ )		Heterozigosidade Esperada ( $H_e$ )		$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$	Teste de heterogeneidade (p-valores)
	Controle	LMC	Controle	LMC				
<b>Hp</b>	0,5385	0,5429	0,5928	0,5704	0,0817	0,0005	0,0822	0,2215
<b>GSTM1</b>	–	–	–	–	–	0,0238	–	0,0308
<b>GSTT1</b>	–	–	–	–	–	-0,0024	–	0,4288
<b>MTHFR C677T</b>	0,4176	0,4476	0,4032	0,4488	-0,0249	0,0053	-0,0195	0,2384
<b>MTHFR A1298C</b>	0,5238	0,4095	0,4200	0,3318	-0,2334	0,0166	-0,2130	0,0221
			<b>Total</b>		-0,0396	0,0088	-0,0327	

Os dados das Estatísticas F foram gerados pelo programa estatístico Genepopweb versão 4.1 (<http://genepop.curtin.edu.au>) para os marcadores codominantes. Para os marcadores GSTM1 e GSTT1 foram considerados os genótipos nulo = -/- e não-nulo = +/+ e +/-, visto que o método de PCR não é apropriado para distinguir homocigotos (+/+, tipo selvagem) e heterocigotos (+/-). Sendo assim, as Estatísticas F para os marcadores dominantes foram gerados utilizando o programa Alerquin v.3.1.1.



### 5.3 Odds Ratio (OR)

O OR com intervalo de confiança de 95% mostrou um aumento significativo de risco para o genótipo não-nulo da GSTM1 ( $p=0,031$ ) e para o genótipo AA da MTHFR A1298C ( $p=0,011$ ), e redução significativa de risco para o genótipo nulo da GSTM1 ( $p=0,031$ ) e para o genótipo AC do loco 1298 da MTHFR ( $p=0,047$ ). Para os demais marcadores, os valores não foram significativos (**Tabela 17**).

**Tabela 17:** Distribuição dos genótipos dos polimorfismos da Hp, GSTM1, GSTT1, MTHFR C677T e MTHFR A1298C e Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Genótipos	Tamanho amostral (N)				OR (IC de 95%)	p-valor
	Presença		Ausência			
	Controle	LMC	Controle	LMC		
<b>Hp</b>						
1F-1F	16	4	257	101	0,636	0,425
1F-1S	18	12	255	93	1,828	0,119
1S-1S	28	5	245	100	0,438	0,090
1F-2	36	13	237	92	0,930	0,835
1S-2	93	32	180	73	0,848	0,506
2-2	82	39	191	66	1,376	0,185
<b>GSTM1</b>						
M1-	176	55	97	50	0,606	0,031
M1+	97	50	176	55	1,649	0,031
<b>GSTT1</b>						
T1-	65	21	209	84	0,816	0,473
T1+	208	84	64	21	1,225	0,473
<b>MTHFR C677T</b>						
CC	140	46	133	59	0,741	0,193
CT	114	47	159	58	1,130	0,597
TT	19	12	254	93	1,725	0,156
<b>MTHFR A1298C</b>						
AA	119	61	154	44	1,794	0,011
AC	143	43	130	62	0,630	0,047
CC	11	1	262	104	0,229	0,126

Os p-valores foram gerados pelo teste de correlação do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 15.0.

Verificou-se para o genótipo MTHFR 1298AA, um aumento do risco para o sexo feminino (OR=2,052; 95% CI=1,08-3,92;  $p=0,028$ ), como também para faixa etária de 20-40 anos (OR=1,980; 95% CI=1,06-4,65;  $p=0,047$ ) e para indivíduos de pele branca (OR=2,218;

95% CI=1,09-4,51;  $p=0,026$ ). Em relação a GSTM1, o aumento do risco foi também associado ao sexo feminino (OR=2,505; 95% CI=0,21-0,77;  $p=0,031$ ) e para indivíduos >60 anos (OR=6,222; 95% CI=1,63-23,76;  $p=0,006$ ). Indivíduos Hp1F-1S de pele negra também apresentaram aumento do risco (OR=7,200; 95% CI=0,94-54,94;  $p=0,037$ ).

A diminuição do risco anteriormente apresentada para MTHFR 1298AC e GSTM1 nulo foram também relacionados ao sexo feminino, para MTHFR (OR=0,520; 95% CI=0,27-0,99;  $p=0,046$ ) e para GSTM1 (OR=0,399; 95% CI=0,21-0,77;  $p=0,005$ ). Também se observou para GSTM1 nulo, a diminuição do risco para >60 anos (OR=0,161; 95% CI=0,04-0,61;  $p=0,006$ ). Uma diminuição do risco ocorreu no sexo masculino apenas para MTHFR 677CC (OR=0,495; 95% CI=0,26-0,95;  $p=0,032$ ). Observou-se ainda uma diminuição do risco para indivíduos de pele negra para o genótipo Hp1S-2 da haptoglobina (OR=0,619; 95% CI=0,44-0,87;  $p=0,011$ ).

## 6 DISCUSSÃO

A predisposição a doenças, bem como as frequências alélicas de genes farmacogeneticamente importantes, variam consideravelmente nas populações em todo o mundo, provavelmente como resultado de deriva genética ou adaptação a fatores locais seletivos, como o clima e a disponibilidade de nutrientes (SUAREZ-KURTZ, 2004), como o folato.

A disponibilidade de folato, por sua vez, interfere na cascata metabólica desencadeada pela enzima MTHFR. Esta enzima catalisa a conversão irreversível de 5,10-metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato (DUTHIE *et al.*, 2002; MOON *et al.*, 2007), que serve como doador do grupamento metil na remetilação de homocisteína em metionina, que, por conseguinte, é convertida em S-adenosilmetionina (SAM), responsável pela metilação de citocinas específicas no DNA, atuando na regulação da transcrição gênica (DUTHIE *et al.*, 2002).

Como o polimorfismo MTHFR A1298C reside no domínio da enzima S-adenosilmetionina e a carência de folato afeta a expressão desse gene na regulação dos níveis celulares SAM (DUTHIE *et al.*, 2002), os resultados obtidos neste trabalho indicam que, pelo menos para nossa população, o genótipo selvagem MTHFR 1298 (AA) foi associado a um aumento significativo do risco de desenvolvimento da LMC, principalmente para mulheres adultas jovens, enquanto A1298C diminuiu significativamente este risco. Não foi observada associação com o polimorfismo C677T, apesar de encontrarmos uma diminuição do risco para homens com o genótipo 677CC. Os resultados encontrados para os indivíduos heterozigotos MTHFR A1298C indicam a existência de uma provável vantagem adaptativa destes indivíduos em relação aos indivíduos do genótipo tipo selvagem (AA), possivelmente em virtude da redução da quantidade de folato necessária para a regulação da transcrição de seus genes.

Como a S-adenosilmetionina (SAM) está envolvida na metilação de citocinas específicas no DNA e na regulação da transcrição de genes, a deficiência de folato provoca o esgotamento da SAM celular, o que induz a hipometilação do DNA e a expressão do proto-oncogene, podendo resultar em câncer (DUTHIE *et al.*, 2002). Apesar de não terem sido avaliados os níveis de ácido fólico e de homocisteína para os genótipos 1298CC e 1298AC, verifica-se na literatura a existência de uma associação entre níveis mais elevados de homocisteína e menores concentrações de folato no plasma com o genótipo 677TT (van der PUT *et al.*, 1998).

A diminuição do risco de desenvolvimento de LMC (HUR *et al.*, 2006) e do risco de recaída após transplante de medula óssea (ROBIEN *et al.*, 2004) também tem sido observada para o genótipo 1298AC nos países asiáticos e caucasianos, respectivamente. Em ambos os estudos, as frequências alélicas e genótípicas foram semelhantes e não heterogêneas, tal como, o verificado nos resultados deste trabalho ( $p < 0,001$  no teste de heterogeneidade). Considerando que essas frequências variam entre os grupos étnicos (ROBIEN e ULRICH, 2003), e que a população brasileira como um todo é resultante da mistura interétnica entre europeus, africanos e ameríndios (ALVES-SILVA *et al.* 2000), estes resultados estão de acordo com o esperado. Além disso, a frequência do alelo C do polimorfismo MTHFR 1298 varia entre populações da Ásia (0,17-0,19) e da Europa Ocidental (0,27-0,36). Entretanto, apesar da disponibilidade de informações referentes a países asiáticos e europeus, pouco se sabe sobre as frequências alélicas entre A1298C nas populações sul-americanas e africanas (ROBIEN e ULRICH, 2003), o que ressalta a importância do presente estudo.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a frequência do alelo C do grupo controle (0,30) foi semelhante à frequência encontrada na Europa Ocidental, enquanto a frequência verificada no grupo de LMC (0,21) foi bastante semelhante à encontrada na África do Sul (GEBHARDT *et al.*, 2001; ROBIEN e ULRICH, 2003), apesar de ter sido verificado, no presente trabalho, um aumento do risco para os indivíduos de cor branca com genótipo 1298 AA.

Tais resultados indicam que a miscigenação da população brasileira pode ter influenciado a distribuição desse polimorfismo. Identificar os polimorfismos gênicos nesta população poderá ser um acréscimo para melhorar a compreensão de susceptibilidade a esta doença, bem como, a sua progressão, além, da possibilidade de se fazer um ajuste terapêutico. Nesse contexto, o fato da população do Distrito Federal ser formada por uma mistura ampla de migrantes de todas as regiões do Brasil (QUEIROZ, 2006), sua utilização representa de forma bastante efetiva a constituição da população brasileira.

É importante ressaltar que a variabilidade genética em populações humanas pode refletir, em parte, os processos distintos de seleção natural e adaptação às condições ambientais variáveis (BARREIRO *et al.*, 2008). Assim, os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser explicados pela seleção natural ou pela ocorrência de uma mistura étnica recente (BARREIRO *et al.*, 2008), o que não se aplica à população brasileira, embora a miscigenação continue a ocorrer. No presente trabalho, foi observado um desvio significativo do EHW para o loco MTHFR 1298 compatível com o excesso de heterozigotos, indicando, mais uma vez, que a heterozigose MTHFR 1298 pode conferir uma vantagem adaptativa aos

indivíduos. Um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos MTHFR C677T e MTHFR A1298C foi anteriormente descrito (ROBIEN e ULRICH, 2003), corroborando os resultados do presente estudo, porém nenhuma associação com a LMC foi encontrada para o loco MTHFR 677.

Sabe-se que a seleção positiva do crescimento populacional aumenta a proporção de alelos raros (alelos com baixa frequência), enquanto a sub-estruturação populacional aumenta a proporção de alelos intermediários (SERRE e HUDSON, 2006). Neste estudo, os grupos controle e LMC foram geneticamente homogêneos em relação à MTHFR C677T, GSTT1 e Haptoglobina. O índice de fixação (FST), que mede o grau de diferenciação genética de subpopulações (NEI 1977) indicou que não houve sub-estruturação da população brasileira estudada, apesar da ligeira diferenciação genética para os locos MTHFR 1298 e GSTM1, que estão em conformidade com as associações encontradas.

A seleção natural pode agir em nível de genes, particularmente, se estes genótipos permitirem uma melhor aptidão com vantagens adaptativas (BARREIRO *et al.*, 2008). Genes sob seleção positiva têm importante papel na sobrevivência humana e afetam fenótipos complexos de relevância médica (BARREIRO *et al.*, 2008). Neste estudo, uma associação com o risco de desenvolvimento de LMC foi encontrada para os genótipos MTHFR 1298AA e GSTM1 não nulo em todos os testes estatísticos realizados, sendo ambos os genótipos relacionados com o risco em mulheres, em conformidade com o descrito pela literatura. Como a MTHFR direciona o fluxo de folatos intracelulares para a conversão de homocisteína em metionina, em detrimento da síntese dos nucleotídeos (ROBIEN *et al.*, 2004), a deficiência de ácido fólico tem sido associada à incorporação de uracila no DNA e a quebras na dupla fita durante o reparo por excisão de uracila, aumentando, assim, o risco de aberrações cromossômicas (ROBIEN e ULRICK, 2003).

A deficiência de ácido fólico, como a provocada pelo consumo de álcool, afeta a atividade celular de SAM e os níveis de homocisteína (MA *et al.*, 1997; DUTHIE *et al.*, 2002; PARADISI *et al.*, 2004.), sugerindo a homocisteína como um marcador para o câncer (ÖZKAN *et al.*, 2007). Foi também atribuída à atividade enzimática de SAM a característica de antídoto contra a toxicidade do estrógeno fisiológico hepatobiliar em mulheres suscetíveis (FREZZA *et al.*, 1988). Sabe-se ainda que a hiperhomocisteinemia está associada com a diminuição dos níveis de folato e glutatona total (ÖZKAN *et al.*, 2007), um tripeptídeo essencial para a remoção de peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos das células através da glutatona peroxidase e por desintoxicar carcinogêneos ambientais, pela GST (JÚNIOR *et al.*, 2001).

Embora a metodologia empregada neste estudo não permita distinguir entre os tipos homozigotos selvagens (+/+) e heterozigotos (+ / -) na genotipagem do polimorfismo GST M1 e T1, este tipo de PCR é o método de genotipagem padrão, relatado com algumas variações relacionadas à utilização de uma PCR multiplex incluindo os controles positivos. O genótipo não-nulo GSTM1 já foi relatado com maior frequência em pacientes LMC do que em controles em um estudo realizado com japoneses (HISHIDA et al., 2005). Além disso, os estudos realizados anteriormente avaliaram o risco para LMC apenas para o genótipo GSTM1 nulo ou em combinação com GSTT1, deixando de investigar existência do risco para o genótipo GSTM1 não nulo (LÖFFLER et al., 2001; HISHIDA et al., 2005; LOURENÇO et al., 2005; MONDAL et al., 2005; BAJPAI et al., 2007; SOUZA et al., 2008; TASPINAR et al., 2008), talvez, porque seja curioso verificar que a presença de uma enzima que atua na detoxificação de carcinógenos possa aumentar o risco de se desenvolver o câncer, enquanto sua ausência possa ter um efeito protetor.

No entanto, para o estudo do polimorfismo GSTM1, além do alelo nulo, existem outros dois alelos para este loco, GSTM1A e GSTM1B, que diferem pela substituição de um par de bases (COTTON et al., 2000). Embora não exista evidência de diferença funcional entre esses alelos (COTTON et al., 2000), essa suposição pode não ser justificada, uma vez que estudos em pacientes com cirrose biliar primária apresentam as frequências dos fenótipos GSTM1A e GSTM1B significativamente diferentes em casos e controles. Também tem sido sugerido na literatura que os indivíduos com dois alelos positivos podem ter maior proteção que GSTM1 heterozigotos (+/-) (DAVIES et al, 1993; FRYER et al, 1993), entretanto, isso precisa ser melhor investigado, pois, além das diferenças interétnicas nas frequências alélicas GSTM1, há diferenças intra-étnicas.

Homozigotos GSTM1 nulos têm sido relatados na frequência entre 22-67% em indivíduos saudáveis em diferentes etnias no mundo, com frequências mais baixas em Afro-americanos e indianos, e maior frequência em caucasianos e asiáticos (REBBECK, 1997; MISHRA et al., 2004; MONDAL et al., 2005; COTTON et al., 2000; HIRAGI, 2011), apesar de uma frequência de 64-100% também ter sido relatada na Oceania (REBBECK, 1997). Em afrodescendentes brasileiros estas frequências ocorrem entre 47-58% (REBBECK, 1997; GATTÁS et al., 2004; KVITO et al., 2006; HIRAGI et al., 2011), em ameríndios, variando de 52-55% (HIRAGI et al., 2011), na população urbana brasileira 35-63% (SANTOVITO et al., 2008; MACIEL et al., 2009; MIRANDA-VILELA et al., 2010; HIRAGI et al., 2011) e, em atletas corredores brasilienses, numa frequência em torno de 64% (AKIMOTO et al., 2010; MIRANDA-VILELA et al., 2011). Embora o loco GSTM1 esteja localizado perto do loco

MTHFR, pelo menos em nosso estudo, não houve desequilíbrio de ligação entre o loco MTHFR (C677T e A1298C) e o loco GSTM1.

Apesar de nossos resultados indicarem uma vantagem adaptativa para os genótipos nulos GSTM1 e também um risco aumentado para a LMC no genótipo GSTM1 não nulo, a seleção em outra área do gene GSTM1 (como discutido acima) ou em outro gene localizado nas imediações do gene GSTM1 não pode ser descartada. O loco GSTM1 (1p13.3) está próximo do loco NRAS (1p13.2), um proto-oncogene que faz parte do p21 RAS, subfamília de pequenas proteínas GTPases que regula a proliferação celular da organização do citoesqueleto e de outras redes de sinalização, e é o alvo mais freqüente de mutações ativadoras de câncer (OLIVEIRA et al., 2007). O oncogene NRAS, quando ativado por mutações de ponto, está envolvido com uma variedade de tumores humanos, incluindo LMA e LMC (CHIN et al., 1992;. MIYAUCHI et al., 1994). Embora não tenha sido genotipado o gene NRAS, um possível desequilíbrio de ligação entre este gene e os locos GSTM1 não pode ser descartado, principalmente porque nosso estudo também mostrou aumento do risco da LMC para a faixa etária de > 60 anos, visto que a incidência de câncer aumenta com a idade, como consequência da duração da carcinogênese e devido a uma exposição mais prolongada a substâncias cancerígenas (ANISIMOV, 2007). Assim, a GSTM1 e as NRAS devem ser investigadas em conjunto no contexto do câncer, relativa a um possível desequilíbrio de ligação para evitar associações espúrias.

Como a expressão de BCR-ABL estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células progenitoras hematopoéticas (SATTLER et al., 2000.) e tais EROs estão envolvidas na incidência e na promoção da carcinogênese (BOREK, 2004; SENTHILKUMAR et al., 2008), o polimorfismo da Hp tem sido investigado em leucemias, sugerindo uma associação do gene Hp \* 1 e do fenótipo Hp1-1 com LMA, LMC e LLA. Entretanto, o significado deste polimorfismo em leucemias tem apresentado resultados controversos (NEVO e TATARSKY, 1986, MITCHELL et al., 1988; CAMPREGHER et al., 2004). Apesar do pequeno tamanho amostral e do intervalo de confiança consideravelmente grande, os resultados do presente trabalho indicaram um aumento de risco de LMC em indivíduos de pele negra com genótipo Hp1F-1S e uma diminuição do risco em indivíduos do genótipo Hp1S-2. O desvio observado do EHW foi devido principalmente a um maior número de indivíduos 1F-1F e a um menor número de indivíduos 1F-1S e 1F-2 do que o esperado, indicando a existência de diferenças nas respostas biológicas entre os alelos da Hp \* 1 e, portanto, a impossibilidade de tratá-lo como um único bloco nos estudos de associação.

Em conclusão, uma associação com o risco de desenvolvimento de LMC foi encontrada para os genótipos MTHFR 1298AA e GSTM1 não nulo, enquanto os genótipos MTHFR 1298AC e GST M1 nulos diminuíram esse risco em todos os testes estatísticos realizados. Os resultados indicaram também uma possível seleção a favor de heterozigotos para o loco MTHFR 1298. A variabilidade em populações humanas pode refletir, em parte, os processos distintos de seleção natural e adaptação às condições ambientais variáveis. Como a população brasileira é muito desigual e heterogênea, os resultados deste estudo indicaram que, ao menos para a população brasileira, esses dois locos são importantes no contexto da LMC e precisam ser mais profundamente investigados, relacionando-os com diferentes doses de folatos sérico e diferentes dados clínicos.



## 7 CONCLUSÕES

A análise dos polimorfismos MTHFR C677T, A1298C, GSTM1, GSTT1 e Haptoglobina em indivíduos com LMC, utilizando um estudo caso-controle, permitiu concluir que:

- Para os genótipos MTHFR 1298AA e GSTM1 não nulo observou-se um aumento do risco de desenvolvimento de LMC;
- Verifica-se um risco reduzido de desenvolvimento de LMC para os genótipos MTHFR 1298AC e GST M1 nulo em todos os testes estatísticos realizados. Além disso, os resultados indicaram também uma possível seleção a favor de heterozigotos para o loco MTHFR 1298,
- A análise do polimorfismo MTHFR C677T revelou uma diminuição do risco apenas para indivíduos do sexo masculino com o genótipo MTHFR 677CC,
  - Não foi observada associação para o polimorfismo GSTT1 nesta população;
  - Para o polimorfismo da Haptoglobina observou-se um aumento do risco de LMC para indivíduos de pele negra com genótipo Hp1<sup>F</sup>-Hp1<sup>S</sup> e uma diminuição do risco para os indivíduos do genótipo Hp1<sup>S</sup>-Hp<sup>2</sup>, apesar do pequeno tamanho amostral e do intervalo de confiança ser consideravelmente grande.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A Leucemia Mieloide Crônica foi o primeiro câncer a ser associado a um marcador citogenético específico e, com o advento de novas tecnologias aplicadas à medicina, pôde ser investigada a nível molecular. Assim, diversos estudos associaram o acompanhamento ambulatorial e o diagnóstico molecular com o objetivo de obter uma melhor compreensão da progressão da doença.

Atualmente, apesar das técnicas de sequenciamento genético serem aplicadas principalmente no meio acadêmico, investigadores clínicos da LMC em todo mundo utilizam-se de tais técnicas para identificar novas mutações no gene BCR-ABL. Tais mutações se constituem no principal mecanismo subjacente à resistência aos ITK e sua identificação é muito importante para a definição da terapêutica adotada no tratamento.

Uma parte considerável do recente esforço de pesquisa em genética humana concentrou-se no objetivo de responder qual o efeito das diferenças alélicas no risco de doenças, o quanto os alelos em diferentes SNPs interagem na determinação do risco e em que grau as interações genótipo-ambiente são importantes. O desafio não é apenas identificar os genes que podem estar envolvidos, mas o papel que eles têm na mediação do risco.

Nesse aspecto, a investigação da influência de polimorfismos genéticos, principalmente aqueles em que se conhece alguma relação de risco, quando associados aos dados clínicos podem contribuir enormemente para a obtenção de respostas às muitas questões ainda não esclarecidas relacionadas à LMC.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIMOTO, A.K.; MIRANDA-VILELA, A.L.; ALVES, P.C.Z.; PEREIRA, L.C.S.; LORDELO, G.S.; HIRAGI, C.O.; SILVA, I.C.R.; GRISOLIA, C.K.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N. Evaluation of gene polymorphisms in exercise-induced oxidative stress and damage. **Free Radical Research**, v. 44, p. 322-331, 2010.

ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M.S.; GUIMARÃES, P.E.M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H.J.; PENA, S.D.J. & PRADO, V.F. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, p. 444-461, 2000.

ANISIMOV, V.N. Biology of Aging and Cancer. **Cancer Control**, v. 14, p. 23-31, 2007.

ARRUDA, V.R.; GRINOLLI, C.E.; GONÇALVES, M.S.; SOARES, M.C.; MENEZES, R.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clin Gent**, v. 54, p. 210-214, 1998.

AWADALLAH, S.M. Haptoglobin 2-2 phenotype is associated with decreased ferroxidase activity in smokers. **Clin Chim Acta**, v. 334, p. 71-76, 2003.

BACCARANI, M.; CORTES, J.; PANE, F.; NIEDERWIESER, D.; SAGLIO, G.; APPERLEY, J.; CERVANTES, F.; DEININGER, M.; GRATWOHL, A.; GUILHOT, F.; HOCHHAUS, A.; HOROWITZ, M.; HUGHES, T.; KANTARJIAN, H.; LARSON, R.; RADICH, J.; SIMONSSON, B.; SILVER, R.T.; GOLDMAN, J.; HEHLMANN, R. European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. **J Clin Oncol**, v. 27, p. 6041, 2009.

BAJPAI, P.; TRIPATHI, A.K.; AGRAWAL, D. Increased frequencies of glutathione-S-transferase (GSTM1 and GSTT1) null genotypes in Indian patients with chronic myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 31, p. 1359-1363, 2007.

BARBOSA, C.G.; SOUZA, C.L.; MOURA NETO, J.P.; ARRUDA, M.G.B.; BARRETO, J.H.; REIS, M.G.; GONCALVES, M.S. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in myeloid leukemia patients from Northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 29-32, 2008.

BARREIRO, L.B.; LAVAL, G.; QUACH, H.; PATIN, E.; QUINTANA-MURCI L. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. **Nature Genetics**, v. 40, p. 340-345, 2008.

BARTRAM, C.R.; DE KLEIN, A.; HAGEMEIJER, A.; AGTHOVEN, T.V.; KESSEL, A.G.V.; BOOTSMA, D.; GROSVELD, G.; FERGUSON-SMITH, M.A.; DAVIES, T.; STONE, M.; HEISTERKAMP, N.; STEPHENSON, J.R.; ROFFENV, J. Translocation of *c-abl* oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. **Nature**, v. 306, p. 277, 1983.

BARTRAM, C.R. Rearrangement of *bcr* and *c-abl* sequences in Ph-positive acute leukemias and Ph-negative CML – na update. **Hematol Blood Transfus**, v. 31, p. 160, 1987.

BELL, D. A.; TAYLOR, J. A.; PAULSON, D. F.; ROBERTSON, C. N.; MOHLER, J. L.; LUCIER, G. W. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 85, p. 1159–1164, 1993.

BEN-NERIAH, Y.; DALEY, G.Q.; MES-MASSON, A.M.; WITTE, O.N.; BALTIMORE, D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the BCR-ABL hybrid gene. **Science**, v. 233, p. 212, 1985.

BJÖRK, J.; ALBIN, M.; WELINDER, H.; TINNERBERG, H.; MAURITZSON, N.; KAUPPINEN, T.; STRÖMBERG, U.; JOHANSSON, B.; BILLSTRÖM, R.; MIKOCZY, Z.; AHLGREN, T.; NILSSON, P.G.; MITELMAN, F.; HAGMAR, L. Are occupational, hobby, or lifestyle exposures associated with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia? **Occup Environ Med**; v. 58, n. 7, p. 722–772, 2001.

BOARD, P. G. Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man. **Am J Hum Genet**, v. 33, p. 36–43, 1981.

BOICE, J.D.Jr.; DAY, N.E.; ANDERSEN, A.; BRINTON, L.A.; BROWN, R.; CHOI, N.W.; CLARKE, E.A.; COLEMAN, M.P.; CURTIS, R.E.; FLANNERY, J.T.; et al. Second cancers following radiation treatment for cervical cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 74, p. 955, 1985.

BOLUFER, P.; COLLADO, M.; BARRAGÁN, E.; CERVERA, J.; CALASANZ, M.J.; COLOMER, D.; ROMAN-GÓMEZ, J.; SANZ, M.A. The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzyme on the risk of developing acute leukemia. **Haematologica**, v. 92, n. 3, p. 308-314, 2007.

BONIFAZI, F.; de VIVO, A.; ROSTI, G.; GUILHOT, F.; GUILHOT, J.; TRABACCHI, E.; HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; SHEPHERD, P.C.; STEEGMANN, J.L.; KLUIN-NELEMANS, H.C.; THALER, J.; SIMONSSON, B.; LOUWAGIE, A.; REIFFERS, J.; MAHON, F.X.; MONTEFUSCO, E.; ALIMENA, G.; HASFORD, J.; RICHARDS, S.; SAGLIO, G.; TESTONI, N.; MARTINELLI, G.; TURA, S.; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. **Blood**, v. 98, p. 3074, 2001.

BOREK, C. Dietary Antioxidants and Human Cancer. **Integrative Cancer Therapies**, v. 3, p. 333-341, 2004.

BOWEN, D.T.; FREW, M.E.; ROLLINSON, S.; RODDAM, P.L.; DRING, A.; SMITH, M.T.; LANGABEER, S.E.; MORGAN, G.J. CYP1A1\*2B (Val) allele is overrepresented in a subgroup of acute myeloid leukemia patients with poor-risk karyotype associated with NRAS mutation, but not associated with FLT3 internal tandem duplication. **Blood**, v. 101, p. 2770-2774, 2003.

CAMPREGHER, P.V.; LORAND-METZ, I.; GROTTTO, H.Z.W. & SONATI, M.F. Haptoglobin phenotypes in Brazilian patients with leukemia. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 40, p. 307-309, 2004.

CARTER, K.; WORWOOD, M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with disease. **Int Jnl Lab Hem**, v. 29, p. 92-110, 2007.

CHANG, S.C.; LIN, P.C.; LIN, J.K.; YANG, S.H.; WANG, .S.; LI, A.F. Role of MTHFR polymorphisms and folate levels in different phenotypes of sporadic colorectal cancers. **Int Jnl Colorectal Dis**, v. 22, n. 5, p. 483-489, 2007.

CHEN, H.; SANDLER, D. P.; TAYLOR, J. A.; SHORE, D. L.; LIU, E.; BLOOMFIELD, C. D.; BELL, D. A. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase t 1 (GSTT1) gene defect. **Lancet**, v. 347, p. 295-297, 1996.

CHEN, C.; LIU, Q.; RELLING, M.V. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase- chain reaction in American whites and blacks. **Pharmacogenetics**, v. 6, p. 187-191, 1996.

CHEN, J.; GIOVANNUCCI, E.; KELSEY, K.; RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W.C.; HUNTER, D.J. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 56, p. 4862-4864, 1996.

CHIN, Y.M.; BOSCO, J.J.; KOH, C.L. Analysis of ras gene mutations in acute myeloid leukemia by the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. **Singapore Medical Journal**, v. 33, p. 48-50, 1992.

CHOI, S.W.; MASON, J.B. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. **J Nutr**, v. 130, p. 129-132, 2000.

CHOMEL, J.C.; BRIZARD, F.; VEINSTEIN, A.; RIVET, J.; SADOON, A.; KITZIS, A.; GUILHOT, F.; BRIZARD, A. Persistence of BCR-ABL genomic rearrangement in chronic myeloid leukemia patients in complete and sustained cytogenetic remission after interferon-alpha therapy or allogeneic bone marrow transplantation. **Blood**, v. 95, p. 404, 2000.

CORTEZ, D.; REUTHER, G.; PENDERGAST, A.M. The BCR-ABL tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. **Oncogene**, v. 15, p. 2333, 1997.

COTTON, S.C.; SHARP, L.; LITTLE, J.; BRACKTON, N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE Review. **American Journal of Epidemiology**, v. 151, p. 7-32, 2000.

DAVIES, M.H.; ELIAS, E.; ACHARYA, S.; COTTON, W.; FAULDER, G.C.; FRYER, A.A.; STRANGE, R.C. GSTM1 null polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus: phenotype and genotype studies in patients with primary biliary cirrhosis. **Gut**, v. 34, p. 549-553, 1993.

DE KLEIN, A.; KESSEL, A.D.G.V.; GROSVELD, G.; BARTRAM, C.R.; HAGEMEIJER, A.; BOOTSMA, D.; SPURR, N.K.; HEISTERKAMP, N.; GROFFEN, J.; STEPHENSON, J.R. A cellular oncogene is translocated to the Filadélfia chromosome in chronic myelocytic leukemia. **Nature**, v. 300, p. 765, 1982.

DEININGER, M.W.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343-3356, 2000.

DUBÉ, I.; DIXON, J.; BECKETT, T.; GROSSMAN, A.; WEINSTEIN, M.; BENN, P.; MCKEITHAN, T.; NORMAN, C.; PINKERTON, P. Location of breakpoints within the major breakpoint cluster region (*bcr*) in 33 patients with *bcr* rearrangement-positive chronic myeloid leukemia with complex or absent Philadelphia chromosomes. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 1, p. 106, 1989.

DUTHIE, S.J. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. **Br Med Bull**, v. 55, p. 578–592, 1999.

DUTHIE, S.J.; NARAYANAN, S.; BRAND, G.M.; PIRIE, L.; GRANT, G. Impact of folate deficiency on DNA stability. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 2444S-2449S, 2002.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; O'BRIEN, S.; KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H.M. The Biology of chronic myeloid leukemia. **N Engl Med**, v. 341, p. 164-172, 1999.

FINNELL, R.H.; GREER, K. A.; BARBER, R. C.; PIEDRAHITA, J. A.; SHAW, G. M.; LAMMER, J. Neural tube and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes. **Crit Rev Oral Biol Med**; v. 9, p. 38-53, 1998.

FRANCO, R.F.; MORELLI, V.; LOURENÇO, D.; MAFFEI, F.H.; TAVELLA, M.H.; PICCINATO, C.E.; THOMAZINI, I.A.; ZAGO, M.A. A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thrombotic disease. **Br J Haematol**, v. 105, p. 556-559, 1999.

FRANCO, R.F.; SIMOES, B.P.; TONE, L.G.; GABELLINI, S.M.; ZAGO, M.A.; FALCAO R.P. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 115, p. 616-618, 2001.

FREZZA, M.; TRITAPEPE, R.; POZZATO, G.; DI PADOVA, C. Prevention of Sadenosylmethionine of estrogen-induced hepatobiliary toxicity in susceptible women. **American Journal of Gastroenterology**, v. 83, p. 1098-1102, 1998.

FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G.; BOERS, G.J.H.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L.A.J.; VAN DEN HEUVE, L.P.; ROZEN, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat Genet**, v. 10, p. 111–113, 1995.

FRYER, A.A.; ZHAO, L.; ALLDERSEA, J.; PEARSON, W.R.; STRANGE, R.C. Use of site-directed mutagenesis of allele-specific PCR primers to identify the GSTM1 A, GSTM1 B, GSTM1 A,B and GSTM1 null polymorphisms at the glutathione S-transferase, GSTM1 locus. **Biochemical Journal**, v. 295, p. 313–315, 1993.

GATTÁS, G.J.; KATO, M.; SOARES-VIEIRA, J.A.; SIRAQUE, M.S.; KOHLER, P.; GOMES, L.; REGO, M.A.V.; BYDŁOWSKI, S.P. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 451-458, 2004.

GEBHARDT, G.S.; SCHOLTZ, C.L.; HILLERMANN, R.; ODENDAAL, H.J. Combined heterozygosity for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations C677T and A1298C is associated with abruptio placentae but not with intrauterine growth restriction. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 97, p. 174-177, 2001.

GOLDMAN, J.M. Chronic myeloid leukemia. **Curr Opin Hematol**, v. 22, p. 380, 1997.

GOYETTE, P.; SUMNER, J.S.; MILOS, R.; DUNCAN, A.M.; ROSENBLATT, D.S.; MATTHEWS, R.G.; ROZEN, R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. **Nat Genet**, v. 7, p. 551, 1994.

GOYETTE, P.; PAI, A.; MILOS, R.; et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Mamm Genome**, v. 9, p. 652-656, 1998.

GREER, J.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N.; RODGERS, G. M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B. **Wintrobe's Clinical Hematology**, Filadélfia, USA : Lippicott Williams&Wilkins, 11<sup>a</sup> ed., Vol. 2, 2004.

GUDNASON, V., STANSBIE, D.; SCOTT, J.; BOWRON, A.; NICAUD, V.; HUMPHRIES, S. C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group. **Atherosclerosis**, v. 136, p. 347-354, 1998.

GUENTHER, B.D.; SHEPPARD, C.A.; TRAN, P.; ROZEN, R.; MATTHEWS, R.G.; LUDWIG, M.L. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. **Nat Struct Biol**, v. 6, p. 359-365, 1999.

GUMIREDDY, K.; BAKER, S.J.; COSENZA, S.C.; JOHN, P.; KANG, A.D.; ROBELL, K.A.; REDDY, M.V.; REDDY, E.P. A non-ATP-competitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinib resistance. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 6, p. 1992-1997, 2005.

HANTSCHHEL, O.; SUPERTI-FURGA, G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. **Nat Re Mol Cell Biol**, v. 5, n. 1, p. 33-44, 2004.

HAYES, D.J.; STRANGE, R.C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology**, v. 61, p. 154-166, 2000.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BERGER, U.; REITER, A. Current trends in the management of chronic myelogenous leukemia. **Ann Hematol**, v. 79, p. 345, 2000.

HEISTERKAMP, N.; STEPHENSON, J.R.; GROFFEN, J.; HANSEN, P.F.; DE KLEIN, A.; BARTRAM, C.R.; GROSVELD, G. Localization of the *c-abl* oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelocytic leukemia. **Nature**, v. 306, p. 239, 1983.

HENGSTLER, J.G.; ARAND, M.; HERRERO, M.E.; OESCH, F. Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferase, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. **Recent Results Cancer Res**, v. 154, p. 47-85, 1998.

HIRAGI, C.O.; MIRANDA-VILELA, A.L.; ROCHA, D.M.S.; OLIVEIRA, S.F.; HATAGIMA, A.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 11-18, 2011.

HISHIDA, A.; TERAOKURA, S.; EMI, N.; YAMAMOTO, K.; MURATA, M.; NISHIO, K.; SEKIDO, Y.; NIWA, T.; HAMAJIMA, N.; NAOE, T. GSTT1 and GSTM1 deletions, NQO1 C609T polymorphism and risk of chronic myelogenous leukemia in Japanese. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 6, p. 251, 2005

HOCHHAUS, A.; DRUKER, B.; SAWYERS, C.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C.A.; CORTES, J.; NIEDERWIESER, D.W.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; GAMBACORTI, C.; STONE, R.M.; GOLDMAN, J.; FISCHER, T.; O'BRIEN, S.G.; REIFFERS, J.J.; MONE, M.; KRAHNKE, T.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H.M. Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha treatment. **Blood**, v. 111, p. 1039, 2008.

HOLTZ, M.S.; SLOVAK, M.L.; ZHANG, F.; SAWYERS, C.L.; FORMAN, S.J.; BHATIA, R. Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. **Blood**, v. 99, p. 3792, 2002.

HUR, M.; PARK, J.Y.; CHO, H.C.; LEE, K.M.; SHIN, H.Y.; CHO, H.I. Methylenetetrahydrofolate reductase A1298C genotypes are associated with the risks of acute lymphoblastic leukemia and myelogenous leukemia in the Korean population. **Clin Lab Haem**, v. 28, p. 154-159, 2006.

ICHIMARU, M.; ICHIMARU, T.; BELSKY, J.L. Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950-1971. **J Radiat Res**, v. 19, p. 262, 1978.

ISMAIL, S.I.; ABABNEH, N.A.; AWIDI, A. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotype association with the risk of chronic myelogenous leukemia. **Jordan Medical Journal**, v. 43, p. 8-14, 2009.

JOHANSSON, B.; FIORETOS, T.; MITELMAN, F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. **Acta Haematol**, v. 107, p. 76-94, 2002.

JONULEIT, T.; PESCHEL, C.; SCHWAB, R.; VAN DER KUIP, H.; BUCHDUNGER, E.; FISCHER, T.; HUBER, C.; AULITZKY, W.E. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quimica Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

KADAM, P.R.; NANJANGUD, G.J.; ADVANI, S.H.; NAIR, C.; BANAVALI, S.; GOPAL, R.; SAIKIA, T. Chromosomal characteristics of chronic and blastic phase of chronic myeloid leukemia. A study of 100 patients in India. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 51, n. 2, p. 167-181, 1991.



KANETA, Y.; KAGAMI, Y.; TSUNODA, T.; OHNO, R.; NAKAMURA, Y.; KATAGIRI, T. Genome-wide analysis of gene-expression profiles in chronic myeloid leukemia cells using a cDNA microarray. **Int J Oncol**, v. 23, p. 681-691, 2003.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J.; GILES, F.J.; RIOS, M.B.; SHAN, J.; FADERL, S.; GARCIA-MANERO, G.; FERRAJOLI, A.; VERSTOVSEK, S.; WIERDA, W.; KEATING, M.; TALPAZ, M. Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and chemotherapy. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 12, p. 31, 1998.

KANTARJIAN, H.M.; GILES, F.J.; O'BRIEN, S.M.; TALPAZ, M. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. **Cancer**, v. 97, p. 1033, 2003a.

KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S.; GILES, F.; RIOS, M.B.; WHITE, K.; GARCIA-MANERO, G.; FERRAJOLI, A.; VERSTOVSEK, S.; WIERDA, W.; KORNBLAU, S.; CORTES, J. Prediction of initial cytogenetic response for subsequent major and complete cytogenetic response to imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. **Cancer**, v. 97, p. 2225, 2003b.

KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S.; GILES, F.; GARCIA-MANERO, G.; FADERL, S.; THOMAS, D.; SHAN, J.; RIOS, M.B.; CORTES, J. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 101, p. 473, 2003c.

KANTARJIAN, H.; SCHIFFER, C.; JONES, D.; CORTES, J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. **Blood**, v. 111, p. 1774, 2008.

KENNEDY, B.J. The evolution of hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia. **Semin Oncol**, v. 19, suppl. 9, p. 21, 1992.

KIM, Y.I. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. **Nutr Rev**, v. 58, p. 205-209, 2000.

KIM, I.; LEE, K.H.; KIM, J.H.; RA, E.K.; YOON, S.S.; HONG, Y.C.; PARK, S.S.; KIM, C.S.; PARK, S.; KIM, B.K. Polymorphisms of the methylene tetrahydrofolate reductase gene and clinical outcomes in HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Annals of Hematology**, v. 86, p. 41-48, 2007.

KLUIJTMANS, L.A.J. ; KASTELEIN, J.J.P. ; LINDEMANS, J.; BOERS, G.H.J.; HELL, S.G.; BRUSCHKE, A.V.G. ; JUKEMA, J.W.; VAN DEN HEUVEL, L.P.W.J. ; TRIJBELS, F.J.M. ; BOERMA, G.J.M.; VERHEUGT, F.W.A.; WILLEMS, F.; BLOM, H.J. Thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. **Circulation**, v. 96, p. 2573-2577, 1997.

KONOPKA, J.B.; WITTE, O.N. Activation of the *abl* oncogene in murine and human leukemias. **Biochem Biophys Acta**, v. 823, p. 1, 1985.

KRZYSZTOF, B.; WICHER, E.F. Evolutionary aspects of hemoglobin scavengers. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 2, p. 249-259, January 15, 2010, doi:10.1089/ars.2009.2760.

KRISTIANSEN, M.; GRAVERSEN, J.H.; JACOBSEN, C.; SONNE, O.; HOFFMAN, H.; LAW, S.K.A.; MOESTRUP, S.K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v. 409, p. 198-201, 2001.

KURZROCK, R.; BLICK, M.B.; TALPAZ, M.; VELASQUEZ, W.S.; TRUJILLO, J.M.; KOUTTAB, N.M.; KLOETZER, W.S.; ARLINGHAUS, R.B.; GUTTERMAN, J.U. Rearrangement in the breakpoint cluster region and the clinical course in Filadélfia-negative chronic myelogenous leukemia. **Ann Intern Med**, v. 105, p. 673, 1986.

KVITKO, K.; GASPAR, P.A.; TORRES, M.R.; HUTZ, M.H. CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphism in a Afro-brazilian population. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 613-616, 2006.

LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogenesis: a review. **Mutat Res**, v. 463, p. 247-283, 2000.

LANGLOIS, M.R.; DELANGHE, J.R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1589-1600, 1996.

LARSON, R.A.; DRUKER, B.J.; GUILHOT, F.; O'BRIEN, S.G.; RIVIERE, G.J.; KRAHNKE, T.; GATHMANN, I.; WANG, Y; IRIS (International Randomized Interferon vs STI571) Study Group. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. **Blood**, v. 111, p. 4022, 2008.

LAURENT, E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H.; KURZROCK, R. The *BCR* Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis. **Cancer Res**. V. 61. P. 2343-2355, 2001.

LEVI, A.P. Genetics of diabetic cardiovascular disease: identification of a major susceptibility gene. **Acta Diabetol**, v. 40, suppl. 2, p. S330-333, 2003.

LEE, M.S.; KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M.; FREIREICH, E.J.; DEISSEROTH, A.; TRUJILLO, J.M.; STASS, S.A. Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia following interferon therapy. **Blood**, v. 79, p. 1920, 1992.

LEE, S.J.; ANASETTI, C.; HOROWITZ, M.M.; ANTIN, J.H. Initial therapy for chronic myelogenous leukemia: playing the odds. **J Clin Oncol**, v.16, n. 9, p. 2897-2903, sep 1998.

LÖFFLER, H.; BERGMANN, J.; HOCHHAUS, A.; HEHLMANN, R.; KRÄMER, A.; The German CML Study Group. Reduced risk for chronic myelogenous leukemia in individuals with the cytochrome P-450 gene polymorphism CYP1A1\*2A. **Blood**, v. 98, p. 3874-3875, 2001.

LOURENÇO, G. J.; ORTEGA, M. M.; NASCIMENTO, H.; TEORI, M. T.; SOUZA, C. A.; COSTA, F. F.; LIMA, C. S. P. Polymorphisms of glutathione S-transferase mu1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) genes in chronic myeloid leukaemia. **Eur J Haematol**, v. 75, p. 530–531, 2005.

MA, J.; STAMPFER, M.J.; GIOVANNUCCI, E.; ARTIGAS, C.; HUNTER, D.J.; FUCHS, C.; WILLETT, W.C.; SELHUB, J.; HENNEKENS, C.H.; ROZEN, R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 57, p. 1098–1102, 1997.

MACIEL, M.E.; OLIVEIRA, F.K.; PROPST, G.B.; BICALHO, M.G.; CAVALLI, I.J.; RIBEIRO, E.M.S.F. Population analysis of xenobiotic metabolizing genes in South Brazilian Euro and Afro-descendants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 723–728, 2009.

MAEDA, N. DNA polymorphisms in the controlling region of the human haptoglobin genes: a molecular explanation for the haptoglobin 2-1 modified phenotype. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, p. 158–166, 1991.

MARU, Y.; WITTE, O.N. The *BCR* gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. **Cell**, v. 67, p. 459, 1991.

MARU, Y.; KOBAYASHI, T.; TANAKA, K.; SHIBUYA, M. Bcr binds to the xeroderma pigmentosum group B protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 260. P. 309–312, 1999.

MATTHEWS, R.G.; VANONI, M.A.; HAINFELD, J.F.; WALL, J. Methylenetetrahydrofolate reductase. Evidence for spatially distinct subunit domains obtained by scanning transmission electron microscopy and limited proteolysis. **J Biol Chem**, v. 259, p. 11647–11650, 1984.

MARIN, D.; BAZEOS, A.; MAHON, F.X.; et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. **J Clin Oncol**, v. 28, p. 2381, 2010.

MAURO, M.J.; DRUKER, B.J. STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. **Oncologist**, v. 6, p. 233, 2001.

MELAMED-FRANK, M. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blood**, v. 98, p. 3693–3698, 2001.

MELO, J.V.; CHUAH, C. Resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **Cancer Lett**, v. 249, p. 121–132, 2007.

MIKELSAAR, A.V.; TASA, G.; PALIST, P.; UUSKULA, M. Human glutathione S-transferase GSTM1 genetic polymorphism in Estonia. **Hum Hered**, v. 44, p. 248–251, 1994.

MIRANDA-VILELA, A.L.; ALVES, P.C.Z.; AKIMOTO, A.K.; LORDELO, G.S.; GONÇALVES, C.A.; GRISOLIA, C.K.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N. Gene polymorphisms against DNA damage induced by hydrogen peroxide in leukocytes of healthy humans through comet assay: a quasi-experimental study. **Environmental Health**, v. 9, p. 21, 2010.

MIRANDA-VILELA, A.L.; LORDELO, G.S.; AKIMOTO, A.K.; ALVES, P.C.Z.; PEREIRA, L.C.S.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N.; GRISOLIA, C.K. Genetic polymorphisms influence runners' responses to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.): a before-after study. **Genes Nutrition** Epub ahead of print, DOI 10.1007/s12263-011-0217-y, 2011.

MISHRA, D.K.; KUMAR, A.; SRIVASTAVA, D.S.; MITTAL, R.D. Allelic variation of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genes in North Indian population. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 5, p. 362-365, 2004.

MITCHELL, R.J. Associations between the two serum proteins haptoglobin and transferrin and leukemia. **Hum Hered**, v. 38, p. 144-150, 1988.

MIYAUCHI, J.; ASADA, M.; SASAKI, M.; TSUNEMATSU, Y.; KOJIMA, S.; MIZUTANI, S. Mutations of the N-ras gene in juvenile chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 83, p. 2248-2254, 1994.

MIZUTANI, T.; KONDO, T.; DARMANIN, S.; TSUDA, M.; TANAKA, S.; TOBIUME, M.; ASAKA, M.; OHBA, Y. A novel FRET-based biosensor for the measurement of BCR-ABL activity and its response to drugs in living cells. **Clin Cancer Res**, v. 16, p. 3964, 2010.

MOON, H.W.; KIM, T.Y.; OH, B.R.; MIN, H.C.; CHO, H.I.; BANG, S.M.; LEE, J.H.; YOON, S.S.; LEE, D.S. MTHFR 677CC/1298CC genotypes are highly associated with chronic myelogenous leukemia: a case-control study in Korea. **Leukemia Research**, v. 31, p. 1213-1217, 2007.

MONDAL, B.C.; PARIJA, N.; MAJUNDAR, S.; CHANDRA, S.; MUKHOPADHYAY, A.; CHAUDHURI, U.; DASGUPTA, U.B. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotype frequency in chronic myeloid leukaemia. **Eur J Cancer Prev**, v.14, p. 281-284, 2005.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, v. 41, p. 225-233, 1977.

NEVO, S.; TATARSKY, I. Serum haptoglobin types and leukemia. **Hum Hered**, v. 73, p. 240-244, 1986.

NIELSEN, M.J.; MØLLER, H.J.; MOESTRUP, S.K. Hemoglobin and Heme Scavenger Receptors. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 2, p. 261-273, January 15, 2010. doi:10.1089/ars.2009.2792.

NOENS, L.; VAN LIERDE, M.A.; DE BOCK, R.; VERHOEF, G.; ZACHÉE, P.; BERNEMAN, Z.; MARTIAT, P.; MINEUR, P.; VAN EYGEN, K.; MACDONALD, K.; DE GEEST, S.; ALBRECHT, T.; ABRAHAM, I. Prevalence, determinants, and outcomes of nonadherence to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: the ADAGIO study. **Blood**, v. 113, p. 5401, 2009.

NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **J Natl Cancer Inst**, v. 25, p. 85, 1960.

NOWICKI, M.O.; FALINSKI, R.; KOPTYRA, M.; SLUPIANEK, A.; STOKLOSA, T.; GLOC, E.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; BLASIAK, J.; SKORSKI, T. BCR-ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. **Blood**, v. 104, p. 3746-3753, 2004.

O'DWYER, M.E.; MAURO, M.J.; BLASDEL, C.; FARNSWORTH, M.; KURILIK, G.; HSIEH, Y.C.; MORI, M.; DRUKER, B.J. Clonal evolution and lack of cytogenetic response are adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with imatinib mesylate. **Blood**, v. 103, p. 451, 2004.

O'HARE, T.; WALTERS, D.K.; STOFFREGEN, E.P.; JIA, T.; MANLEY, P.W.; MESTAN, J.; COWAN-JACOB, S.J.; LEE, F.Y.; HEINRICH, M.C.; DEININGER, M.W.N.; DRUKER, B.J. In vitro activity of BCR-ABL inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. **Cancer Res**, v. 65, p. 4500-4505, 2005.

OLIVEIRA, J.B.; BIDÈRE, N.; NIEMELA, J.E.; ZHENG, L.; SAKAI, K.; NIX, C.P.; DANNER, R.L.; BARB, J.; MUNSON, P.J.; PUCK, J.M.; DALE, J.; STRAUS, S.E.; FLEISHER, T.A. & LENARDO, M.J. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 8953-8958, 2007

OZKAN, Y.; YARDIM-AKAYDIN, S.; FIRAT, H.; CALISKAN-CAN, E.; ARDIÇ, S.; SIMSEK B. Usefulness of homocysteine as a cancer marker: total thiol compounds and folate levels in untreated lung cancer patients. **Anticancer Research**, v. 27, p. 1185-1190, 2007.

PARADISI, G.; CUCINELLI, F.; MELE, M.C.; BARINI, A.; LANZONE, A.; CARUSO, A. Endothelial function in post-menopausal women: effect of folic acid supplementation. **Human Reproduction**, v. 19, p. 1031-1035, 2004

PASSWEG, J.R.; ROWLINGS, P.A.; HOROWITZ, M.M. Related donor bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 12, p. 81, 1998.

PENDERGAST, A.M.; MULLER, A.J.; HAVLIK, M.H.; MARU, Y.; WITTE, O.N. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. **Cell**, v. 66, n. 1, p. 161-171, 1991.

PENDERGAST, A.M. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. **Adv Cancer Res**, v. 85, p. 51-100, 2002.

PRESTON, D.L.; KUSUMI, S.; TOMONAGA, M.; IZUMI, S.; RON, E.; KURAMOTO, A.; KAMADA, N.; DOHY, H.; MATSUO, T. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma. **Radiat Res**, v. 137, suppl. 2, p. S68-97, 1994.

QUEIROZ, E.P. A migração intrametropolitana no Distrito Federal e Entorno: o conseqüente fluxo pendular e o uso dos equipamentos urbanos de saúde e educação, 2006. Disponível em:

<[http://www.abep.nepo.unicamp.br/encontro2006/docspdf/ABEP2006\\_724.pdf](http://www.abep.nepo.unicamp.br/encontro2006/docspdf/ABEP2006_724.pdf)>. Acesso em: 06 mai. 2011.

QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J. Molecular biology of BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 113, p. 1619-1630, 2009.

REBBECK, T.R. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 6, p. 733-743, 1997.

ROBIEN, K.; ULRICH, C.M. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk: A HuGE Minireview. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, p. 571-582, 2003.

ROBIEN, K.; ULRICH, C.M.; BIGLER, J.; YASUI, Y.; GOOLEY, T.; BRUEMMER, B.; POTTER, J.D.; RADICH, J.P. Methylenetetrahydrofolate reductase genotype affects risk of relapse after hematopoietic cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 7592-7598, 2004.

ROWLEY, J.D. A new consistent abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, p. 290, 1973.

SAGLIO, G.; MOROTTI, A.; MATTIOLI, G.; MESSA, E.; GIUGLIANO, E.; VOLPE, G.; REGE-CAMBRIN, G.; CILLONI, D. Rational approaches to the design of therapeutics targeting molecular markers: the case of chronic myelogenous leukemia. **Ann NY Acad Sci**, v.1028, p. 423-431, 2004.

SANTOVITO, A.; CERVELLA, P.; BURGARELLO, C.; BIGATTI, M.P.; SELLA, G.; DELPERO, M. Analysis of glutathione S-transferase M1 and glutathione S-transferase T1 gene polymorphisms suggests age-related relationships in a northern Italian population. **Archives of Toxicology**, v. 82, p. 903-907, 2008.

SATTLER, M.; VERMA, S.; SHRIKHANDE, G.; BYRNE, C.H.; PRIDE, Y.B.; WINKLER, T.; GREENFIELD, E.A.; SALGIA, R.; GRIFFIN, J. D. The BCR-ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 24273-24278, 2000.

SAWYERS, C.L.; MCLAUGHLIN, J.; WITTE, O.N. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the BCR-ABL oncogene. **J Exp Med**, v. 181, p. 307, 1995.

SAWYERS, C.L. Chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 340, p. 1330, 1999.

SAWYERS, C.L.; HOCHHAUS, A.; FELDMAN, E.; GOLDMAN, J.M.; MILLER, C.B.; OTTMANN, O.G.; SCHIFFER, C.A.; TALPAZ, M.; GUILHOT, F.; DEININGER, M.W.; FISCHER, T.; O'BRIEN, S.G.; STONE, R.M.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.B.; RUSSELL, N.H.; REIFFERS, J.J.; SHEA, T.C.; CHAPUIS, B.; COUTRE, S.; TURA, S.; MORRA, E.; LARSON, R.A.; SAVEN, A.; PESCHEL, C.; GRATWOHL, A.; MANDELLI, F.; BEN-AM, M.; GATHMANN, I.; CAPDEVILLE, R.; PAQUETTE, R.L.; DRUKER, B.J. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic

myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. **Blood**, v. 99, p. 3530, 2002.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annu Ver Nutr**, v. 19, p. 217-246, 1999.

SELLERS, T.A.; KUSHI, L.H.; CERHAN, J.R.; VIERKANT, R.A.; GAPSTUR, S.M.; VACHON, C.M.; OLSON, J.E.; THERNEAU, T.M.; FOLSOM, A.R. Dietary folate intake, alcohol, and risk of breast cancer in a prospective study of postmenopausal women. **Epidemiology**, v. 12, p. 420-428, 2001.

SENTHILKUMAR, N.; BADAMI, S.; DONGRE, S.H.; BHOJRAJ, S. Antioxidant and hepatoprotective activity of the methanol extract of *Careya arborea* bark in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 336-339, 2008.

SERRE, D.; HUDSON, T.J. Resources for Genetic Variation Studies. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 7, p. 443-457, 2006.

SIRVENT, A.; BENISTANT, C.; ROCHE, S. Cytoplasmic signaling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. **Biol Cell**, v. 100, n. 11, p. 617-631, 2008.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M.T.; KANE, E.; ROMAN, E.; ROLLINSON, S.; CARTWRIGHT, R.A.; MORGAN, G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, p. 12810-12815, 1999.

SOKAL, J.E.; COX, E.B.; BACCARANI, M.; TURA, S.; GOMEZ, G.A.; ROBERTSON, J.E.; TSO, C.Y.; BRAUN, T.J.; CLARKSON, B.D.; CERVANTES, F. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood**, v.63, n. 4, p. 789-799, 1984.

SOKAL, J.E.; BACCARANI, M.; RUSSO, D.; TURA, S. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. **Semin Hematol**, v. 25, p. 49, 1988.

SCHIFFER, C.A. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. **N Engl J Med**, v. 357, p. 258, 2007.

SCHUSTER, C.; FORSTER, K.; DIERKS, H.; ELSÄSSER, A.; BEHRE, G.; SIMON, N.; DANHAUSER-RIEDL, S.; HALLEK, M.; WARMUTH, M. The effects of BCR-ABL on C/EBP transcription-factor regulation and neutrophilic differentiation are reversed by the Abl kinase inhibitor imatinib mesylate. **Blood**, v. 101, p. 655, 2003.

SHAH, N.P. Medical management of CML. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 371, 2007.

SKORSKI, T.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; SZCZYLIK, C.; KANAKARAJ, P.; PERROTTI, D.; ZON, G.; GEWIRTZ, A.; PERUSSIA, B.; CALABRETTA, B. C-RAF-1 serine/threonine kinase is required in BCR-ABL-dependent and normal hematopoiesis. **Cancer Res**, v. 55, p. 2275, 1995.

SOUZA, C.L.; BARBOSA, C.G.; NETO, J.P.M.; BARRETO, J.H.; REIS, M.G.; GONÇALVES, M.S. Polymorphisms in the glutathione S-transferase theta and mu genes and susceptibility to myeloid leukemia in Brazilian patients. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 39-41, 2008.

SOVERINI, S.; MARTINELLI, G.; ROSTI, G.; BASSI, S.; AMABILE, M.; POERIO, A.; GIANNINI, B.; TRABACCHI, E.; CASTAGNETTI, F.; TESTONI, N.; LUATTI, S.; DE VIVO, A.; CILLONI, D.; IZZO, B.; FAVA, M.; ABRUZZESE, E.; ALBERTI, D.; PANE, F.; SAGLIO, G.; BACCARANI, M. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. **J Clin Oncol**, v. 23, p. 4100, 2005.

STAM, K.; HEISTERKAMP, N.; GROSVELD, G.; DE KLEIN, A.; VERMA, R.S.; COLEMAN, M.; DOSIK, H.; GROFFEN, J. Evidence of a new chimeric *bcr/c-abl* mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Filadélfia chromosome. **N Engl J Med**, v. 313, p. 1429, 1985.

STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z.; PIETINEN, P.; BARRETT, M. J.; TAYLOR, P. R.; VIRTAMO, J.; ALBANES, D. Dietary and other methyl-group availability factors and pancre pancreatic cancer risk in a cohort of male smokers. **Am J Epidemiol**, v. 153, p. 680–687, 2001.

SUAREZ-KURTZ, G. Pharmacogenomics in admixed populations: the Brazilian pharmacogenetics/pharmacogenomics network-REFARGEN. **Pharmacogenomics Journal**, v. 4, p. 347-348, 2004.

TAKEDA, N.; SHIBUYA, M.; MARU Y. The Bcr-Abl oncoprotein potentially interacts with the xeroderma pigmentosum group B protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 96. p.203-207, 1999.

TAM, C.S.; KANTARJIAN, H.; GARCIA-MANERO, G.; BORTHAKUR, G.; O'BRIEN, S.; RAVANDI, F.; SHAN, J.; CORTES, J. Failure to achieve a major cytogenetic response by 12 months defines inadequate response in patients receiving nilotinib or dasatinib as second or subsequent line therapy for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 112, p. 516, 2008.

TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H.M.; MCCREDIE, K.B.; KEATING, M.J.; TRUJILLO, J.; GUTTERMAN, J. Clinical investigations of human alpha interferon In chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 69, p. 1280, 1987.

TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H.; KURZROCK, R.; TRUJILLO, J.M.; GUTTERMAN, J.U. Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. Philadelphia chromosome-positive patients. **Ann Intern Med**, v. 114, p. 532, 1991.

TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; KANTARJIAN, H.; KU, S.; FOTEH, A.; KURZROCK, R.; Persistence of dormant leukemic progenitors during interferon-induced remission in chronic myelogenous leukemia. Analysis by polymerase chain reaction of individual colonies. **J Clin Invest**, v. 94, p. 1383, 1994.



TASPINAR, M.; AYDOS, S.E, COMEZ, O.; ELHAN, A.H.; KARABULUT, H.G.; SUNGUROGLU, A. CYP1A1, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukaemia. **Swiss Medical Weekly**, v. 138, p. 12-17, 2008.

TESTONI, N.; MARZOCCHI, G.; LUATTI, S.; AMABILE, M.; BALDAZZI, C.; STACCHINI, M.; NANNI, M.; REGE-CAMBRIN, G.; GIUGLIANO, E.; GIUSSANI, U.; ABRUZZESE, E.; KERIM, S.; GRIMOLDI, M.G.; GOZZETTI, A.; CRESCENZI, B.; CARCASSI, C.; BERNASCONI, P.; CUNEO, A.; ALBANO, F.; FUGAZZA, G.; ZACCARIA, A.; MARTINELLI, G.; PANE, F.; ROSTI, G.; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukemia: a prospective comparison of interphase fluorescence in situ hybridization and chromosome banding analysis for the definition of complete cytogenetic response: a study of the GIMEMA CML WP. **Blood**, v. 114, p. 4939, 2009.

THOMAS, J.; WANG, L.; CLARK, R.E.; PIRMOHAMED, M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. **Blood**, v. 104, n. 12, p. 3739-3745, 2004.

TSAO, A.S.; KANTARIJIAN, H.; TALPAZ, M. STI-571 in chronic myelogenous leukaemia. **Br J Haematol**, v. 119, p. 15, 2002.

ULRICH, C.M.; KAMPMAN, E.; BIGLER, J.; SCHWARTZ, S.M.; CHEN, C.; BOSTICK, R.; FOSDICK, L.; BERESFORD, S.A.; YASUI, Y.; POTTER, J.D. Colorectal adenomas and the C677T *MTHFR* polymorphism: evidence for gene-environment interaction? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 8, p. 659-68, 1999.

van der PUT, N.M.; GABREËLS, F.; STEVENS, E.M.; SMEITINK, J.A.; TRIJBELS, F.J.; ESKES, T.K.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; BLOM, H.J. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **Am J Hum Genet**, v. 62, p. 1044-1051, 1998.

VAN DER KUIP, H.; MOEHRING, A.; WOHLBOLD, L.; MIETHING, C.; DUYSER, J.; AULITZKY, W.E. Imatinib mesylate (STI571) prevents the mutator phenotype of BCR-ABL in hematopoietic cell lines. **Leuk Res**, v. 28, n. 4, p. 405-408, april, 2004.

WIEDMANN, L.M.; KARHI, K.; CHAN, L.C. Similar molecular alterations occur in related leukemias with and without the Philadelphia chromosome. **Hematol Blood Transfus**, v. 31, p. 149, 1987.

WEISBERG I, TRAN P, CHRISTENSEN B, SIBANI S, ROZEN R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Mol Genet Metab**, v. 64, p. 169-172, 1998.

WETZLER, M.; TALPAZ, M.; VAN ETTEN, R. A.; HIRSH-GINSBERG, C.; BERAN, M.; KURZROCK, R. Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. **J. Clin. Investig.**, v. 92, p. 1925-1939, 1993.

WIEMELS, J.L.; SMITH, R.N.; TAYLOR, G.M.; EDEN, O.B.; ALEXANDER, F.E.; GREAVES, M.F.; Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphisms and risk of

molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 4004–4009, 2001.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001.

ZHANG, W.W.; CORTES, J.E.; YAO, H.; ZHANG, L.; REDDY, N.G.; JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H.M.; JONES, D. Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance. **J Clin Oncol**, v. 27, p. 3642, 2009.

YANO, A.; YAMAMOTO, Y.; MIYAISHI, S.; ISHIZU, H. Haptoglobin Genotyping by Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification. **Acta Med Okayama**, v. 52, n. 4, p. 173-181, 1998.

YI, P.; POGRIBNY, I.P.; JAMES, S.J. Multiplex PCR for simultaneous detection of 677 C →T and 1298 A → C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of cancer risk. **Cancer Letter**, v. 181, p. 209–213, 2002.

## **ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Secretaria de Estado de Saúde- SES/Núcleo de Hematologia e Hemoterapia-HBDF  
Universidade de Brasília- UNB /Instituto de Biologia- IB/ Laboratório de Genética.

Projeto de Pesquisa: Polimorfismo nos genes MTHFR, Glutathione S-transferase e Haptoglobina e sua relação na incidência e resposta ao tratamento da Leucemia Mielóide Crônica (LMC).

Responsável: Graciana S. Lordelo de Carvalho

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Resolução 196/96)**

Eu, \_\_\_\_\_ abaixo assinado, declaro ter ouvido e compreendido o presente termo de consentimento, que informa o seguinte:

Estou participando de minha livre e espontânea vontade, de uma pesquisa que visa verificar a presença do polimorfismo dos genes MTHFR e GST por meio de PCR RFLP.

1. A pesquisa será realizada a partir de amostra de sangue, previamente colhido no HBDF pelo serviço responsável pelo meu tratamento. A realização desta pesquisa não compromete o meu estado de saúde e não traz riscos em sua realização.
2. A pesquisa requer a coleta de 5mL de sangue periférico com seringa e agulha descartáveis. Será utilizada a amostra de sangue do hemograma periódico previsto no tratamento. A coleta está prevista para uma única vez.
3. Tenho garantido antes e durante o curso da pesquisa, esclarecimentos sobre o procedimento e metodologia. Caso seja do meu interesse, posso solicitar acompanhamento psicológico por profissionais da Rede Pública Hospitalar.
4. Tenho assegurado o direito de abandonar a participação na pesquisa a qualquer momento, se assim desejar, bastando para isso comunicar a minha decisão ao líder do projeto.
5. Fui informada também que a coleta de dados para a pesquisa constará de entrevista e questionário individual, realizada pela responsável do projeto, sendo assegurado sigilo e privacidade através da preservação da identidade e de todos os dados confidenciais envolvidos na pesquisa. E ainda, posso me recusar a responder qualquer pergunta em caso de constrangimento.

6. Está prevista a publicação dos resultados dessa pesquisa em relatórios parcial e final às instituições envolvidas (Universidade de Brasília e Hospital de Base da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal) e publicação em congressos e revistas científicas. Além disso, tenho garantido a não-utilização desses dados por qualquer outro projeto de pesquisa.
7. Não há previsão de ressarcimento para os participantes desse projeto, pois a coleta do material e seus devidos esclarecimentos, serão realizados durante as consultas periódicas do meu tratamento.
8. O presente termo de consentimento foi elaborado em duas vias, sendo que uma cópia ficará comigo e a outra com a responsável da pesquisa.

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007.

---

Responsável

---

Pesquisador

---

Testemunha

**ANEXO 2 – PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO**

Secretaria de Estado de Saúde- SES/Núcleo de Hematologia e Hemoterapia-HBDF  
 Universidade de Brasília-UnB /Instituto de Biologia- IB/ Laboratório de Genética

Responsáveis: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Klautau  
 Dr Alexandre Nonino  
 Graciana S. Lordelo de Carvalho

Reg. nº .....

**Data da coleta:** ...../...../.....

**Nome:** .....

**Data de nascimento:** ...../...../.....

**Idade:**.....anos **Telefones para**

**contato:**.....

**Profissão:**.....

**Início da doença há:** .....

**Quimioterapia:** [ ] não [ ] sim: [ ] recaída [ ] 2<sup>a</sup> neoplasia

**HMA:**.....

.....

.....

.....

Exames Recentes:

Hemograma Completo (...../...../.....)

Hb	Ht	Plaq	Leuc	Baso	Eq	Mielo	Meta	Bast	Seg	Linf	Mono

Blastos: ..... Outros: .....

Mielograma: (...../...../.....):

.....

.....

.....

Citogenética: (...../...../.....):

.....

.....

.....

## ANEXO 3 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA SES-DF



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Carta  
Nº 228/07- CEP/SES.

Brasília, 10 de dezembro de 2007.

Ilmº.(a) Senhor(a)  
Diretor(a) HOSPITAL DE BASE DO DISTRITO FEDERAL

Assunto: Aprovação do projeto de pesquisa **238/07** – CEP/SES/DF

Senhor(a) Diretor(a),

Participamos a V. Sa. a **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa: POLIMORFISMO NOS GENES MTHFR GLUTATIONA S-TRANSFERASE E HAPTOGLOBINA E SUA RELAÇÃO NA INCIDÊNCIA E RESPOSTA AO TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Pesquisador responsável: GRACIANA SOUZA LORDELO DE CARVALHO

Os dados serão coletados no (a): HBDF/SES-DF o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, incisos IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto.

Ressaltamos que a conduta do pesquisador, assim como o seu acesso à Unidade de Saúde devem seguir as normas e os procedimentos preconizados pela Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. O pesquisador deve se apresentar ao Diretor da Unidade de Saúde para os procedimentos administrativos necessários.

Atenciosamente.

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes  
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF  
Coordenadora

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesedf@saude.df.gov.br  
SMF/N - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP.: 70.710-904

"Brasília - Patrimônio Cultural da Humanidade".