



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

**O PAPEL DE POLIMORFISMOS NOS GENES *TP53*, *GSTT1*, *GSTM1* E DA
METILAÇÃO NO GENE *BRCA1* NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DO
ADULTO**

Aluno: Matheus Filgueira Bezerra
Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Co-orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

RECIFE, 2014

MATHEUS FILGUEIRA BEZERRA

O PAPEL DE POLIMORFISMOS NOS GENES *TP53*, *GSTT1*, *GSTM1* E DA METILAÇÃO NO GENE *BRCA1* NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DO ADULTO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientadora:

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Departamento de Biofísica, CCB/UFPE;

Laboratório Central, CCB/UFPE.

RECIFE, 2014

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Bezerra, Matheus Filgueira

O papel de polimorfismos nos genes *TP53*, *GSTT1*, *GSTM1* e da metilação no gene *BRCA1* na Leucemia Mielóide Aguda do adulto/ Matheus Filgueira Bezerra– Recife: O Autor, 2015.

71 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Coorientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Biologia Aplicada à Saúde, 2015

Inclui bibliografia

- 1. Leucemia 2. Polimorfismo (genética) 3. DNA I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orientador) II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (coorientador) III. Título**

616.99419

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-32

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Parecer da comissão examinadora da defesa da dissertação de mestrado de

MATHEUS FILGUEIRA BEZERRA

**O PAPEL DE POLIMORFISMOS NOS GENES *TP53*, *GSTT1*, *GSTM1* E DA
METILAÇÃO NO GENE *BRCA1* NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA DO
ADULTO**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera o candidato **MATHEUS FILGUEIRA BEZERRA** como:

APROVADO

Recife, 19 de novembro de 2014.

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Orientador – Membro interno

Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo
Membro externo

Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães
Membro externo

AGRADECIMENTOS

Apesar de na capa dessa dissertação constar meu nome como autor, o presente trabalho é fruto, direta ou indiretamente, da colaboração de várias pessoas, que tive a sorte de ter por perto.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Eduardo Beltrão, pela confiança em me permitir escolher o foco do meu trabalho, mesmo que este fuja um pouco da linha de pesquisa principal realizada pelo grupo, por todo o aprendizado e vivência que adquiri nos últimos dois anos.

Ao meu co-orientador, Marcos André Cavalcanti, a quem devo muito do que sei sobre a fascinante área da Hematologia, agradeço por toda a ajuda e disponibilidade oferecidas durante esses dois anos.

À Aleide Melo, agradeço pela imensa ajuda na coleta de amostras e dados dos pacientes. Sem ela, o presente trabalho seria, sem dúvidas, bastante limitado.

Aos professores Antonio Roberto Lucena e Cíntia Rocha por todo o aprendizado e colaboração.

Aos meus pais, Carlos e Selma e meu irmão, Daniel agradeço por todo o apoio e companheirismo dados nas horas de aperreio.

À minha tia e madrinha, Norma, agradeço pelas incontáveis vezes que me ajudou nas horas de sufoco, por toda a atenção e entusiasmo nas minhas conquistas.

Aos meus avós, Iara, Dionísio e Helena, agradeço por toda torcida e vibração nesse momento de conclusão de mais uma etapa.

À minha namorada, Daniella, por toda a disponibilidade em ajudar, pela compreensão nos momentos de estresse e pelo companheirismo.

Aos meus queridos amigos/colegas do BmC, LIKA e LabCen: Luiza Amorim, Jéssica Catarine, Eduardo Ramalho, Arthur Clark, Aline Virgulina, Diego Albuquerque Dog, Bruno Trajano, Lúcia, Sinara Vitalino, Stê, Moacyr Barreto, Juliana Brandão, Igor Texeira, Juliana Vasconcelos, Gabriela Ayres, Mariana Cabrera, Nara Barbosa, Juan Luiz, Diego Martins, Igor Domingos, Betania Lucena, Luana Laranjeira, Mayara Mathias, Bia, Manuela Andrade, Raissa Tico, Diego Severo, Pedro França, Mariana Barros, Gabriela Guedes e Adryanna Andrade, agradeço pelo companheirismo.

RESUMO

Leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença de caráter multifatorial e heterogênea. Alterações somáticas no código genético recorrentes na LMA são causadas principalmente por agentes químicos e físicos nocivos ao DNA, associados a falhas nos sistemas de reparo. Pesquisas realizadas na última década sugerem que metilação aberrante e polimorfismos genéticos em genes supressores tumorais e genes do metabolismo de radicais livres podem estar envolvidos na leucemogênese. O presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre polimorfismos nos genes *TP53* codon 72, *GSTT1*, *GSTM1* e hipermetilação da região promotora do gene *BRCA1* com a leucemia mieloide aguda. Duzentos e vinte e três pacientes adultos diagnosticados com LMA e 202 indivíduos adultos são (controles) foram genotipados para polimorfismos no *TP53*, *GSTT1* e *GSTM1* e 55 pacientes com AML *de novo* foram avaliados para metilação no *BRCA1*. As frequências observadas para o *TP53* foram: 33,6% ARG/ARG, 44,4% ARG/PRO e 22% PRO/PRO nos pacientes e 38,3% ARG/ARG, 48,5 ARG/PRO e 12,8% PRO/PRO nos controles. O alelo PRO foi associado à susceptibilidade ao desenvolvimento de LMA no modelo genético recessivo ($p=0.0198$), no co-dominante ($p=0.0291$) e no alélico ($p=0.0438$). O polimorfismo do *GSTT1* foi observado em 23% dos pacientes e em 27% dos controles ($p=0,297$). O polimorfismo do *GSTM1* foi observado em 45% dos pacientes e em 43% dos controles ($p=0,573$) e a co-ocorrência dos dois polimorfismos foi observada em 12% dos casos e 8,5% dos controles ($p=0.286$). Nenhuma associação foi encontrada entre os polimorfismos nos genes GSTs e LMA. O gene *BRCA1* não foi encontrado hipermetilado em nenhum dos 55 pacientes analisados. Os resultados do presente estudo apontam que o polimorfismo do *TP53* parece favorecer a leucemogênese. Em contrapartida, os polimorfismos no *GSTT1*, *GSTM1* e metilação do *BRCA1* parecem não ter relevância na leucemia mieloide aguda.

Palavras-chave: *TP53*, *GSTT1*, *GSTM1*, *BRCA1*, polimorfismos genéticos, metilação do DNA.

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a multifactorial heterogeneous disease. Genetic *de novo* abnormalities commonly found in AML are caused mainly by DNA damaging agents and failure in DNA repair systems. Data from last decade suggest that aberrant DNA methylation and genetic polymorphisms on tumor suppressor and antioxidative metabolism genes may be involved in leukemogenesis. Thus, this study investigated the association between *TP53* codon 72, *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms and *BRCA1* promoter hypermethylation with AML. Two hundred twenty three adult AML patients and 202 health adult individuals (controls) were genotyped for *TP53*, *GSTT1*, *GSTM1* polymorphisms and 55 *de novo* AML patients were evaluated for *BRCA1* hypermethylation. For *TP53*, patients genotype frequencies were 33.6% (75) ARG/ARG, 44.4% (99) ARG/PRO and 22% (49) PRO/PRO. In controls, were 38.3% (78) ARG/ARG, 48.5 (98) ARG/PRO and 12.8% (26) PRO/PRO. Proline allele (PRO) was associated with AML occurrence in recessive ($p=0.0198$), co-dominant ($p=0.0291$) and allelic ($p=0.0438$) genetic models. *GSTT1* polymorphism was observed in 23.3% (52) of patients and in 27.7% (56) of controls ($p=0,297$). *GSTM1* was observed in 45.5% (101) of patients and in 42.6% (86) of controls ($p=0,573$). The co-occurrence of *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms were observed in 11.7% (26) of patients and in 8.4% (17) of controls ($p=0.286$). No association between GSTs polymorphisms and AML was observed. No *BRCA1* methylation was observed the 55 AML patients. In conclusion, while our results suggest that *TP53* polymorphism is involved with leukemogenesis, *GSTs* polymorphisms and *BRCA1* methylation are not.

Keywords: *TP53*, *GSTT1*, *GSTM1*, *BRCA1*, genetic polymorphisms, DNA methylation.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

Figura 1. A presença de blastos no sangue periférico. Quadro frequentemente observado em pacientes com leucemia mielóide aguda. Fonte: autoria própria. Imagem obtida no Laboratório Central, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

Figura 2. Estrutura tridimensional da proteína p53. Fonte: www.p53.iarc.fr

Figura 3. Ativação e função do p53. O p53 sofre alterações pós-translacionais que o ativam e promovem sua interação com proteínas de ciclo celular, com o DNA e a membrana mitocondrial, para desempenhar suas diversas funções. Fonte: OLIVIER, 2010.

Figura 4. Localização do polimorfismo R72P no gene e na proteína *TP53*. Fonte: adaptado de WHIBLEY, 2009.

Figura 5. Conjugação da glutathione a moléculas tóxicas, reação catalisada pela glutathione-S-transferase. Fonte: adaptado de SIMIC, 2009.

Figura 6. Os pontos brancos representam dinucleotídeos CpG não-metilados enquanto os pretos, dinucleotídeos CpG metilados. Na primeira situação a transcrição do gene ocorre normalmente; na segunda, mostra o silenciamento gênico provocado pela metilação do DNA. Fonte: ESTELLER (2005).

Figura 7. O *BRCA1* é ativado por fosforilação de vários resíduos de serina para efetuar sua função de reparo homólogo em conjunto com o *BRCA2* e *RAD51*. Fonte: adaptado de YOSHIDA, 2004.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS (ARTIGOS)

Figure 1. a) Overall survival and b) disease-free survival of *TP53* genotypes.

Figure 2. Overall survival and disease-free survival from AML grouped by *GSTT1* (a,b) *GSTM1* (c,d) and *GSTT1/GSTM1* genotypes.

Table 1. Primers sequences and PCR conditions for polymorphisms analysis.

Table2. *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms frequencies in AML and healthy controls.

Table 3. *TP53* R72P association with AML incidence

Table 4. *TP53*, *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms versus clinical-laboratorial features.

Figure 1. a) Unmethylated *BRCA1* from a AML patient. Unmethylated cytosines after bisulfite treatment are converted into uracile, which is replaced by thymine in PCR (CG>TG). b) four negative patients for *BRCA1* MS-PCR, 50bp ladder, positive control and blank.

Table 1. AML patients clinical-laboratorial features.

LISTA DE ABREVIACÕES/ SIGLAS

LMA: leucemia mielóide aguda

FAB: grupo Franco-Americano-Britânico de hematologia

OMS: Organização Mundial de Saúde

GST: glutathione-S-transferase

ROS: espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

CN: cariótipo normal

PRD: domínio rico em prolina (*proline rich domain*)

DBD: domínio de ligação ao DNA (*DNA binding domain*)

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*)

Ara-c: arabinosídeo citosina

DNMT: DNA metiltransferase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	14
2.1.2 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO	15
2.1.3 FATORES PROGNÓSTICOS NA LMA.....	16
2.2 O GENE <i>TP53</i>	19
2.2.2 ESTRUTURA DO GENE <i>TP53</i> E DA PROTEÍNA p53	20
2.2.3 MUTAÇÕES SOMÁTICAS.....	22
2.2.4 MUTAÇÕES HERDADAS	22
2.2.5 POLIMORFISMOS NO <i>TP53</i>	23
2.2.6 R72P.....	24
2.3 GLUTATIONA-S-TRANSFERASES.....	25
2.3.2 GENES DA CLASSE <i>Mu</i>	26
2.3.3 GENES DA CLASSE THETA.....	27
2.3.4 CONSEQUÊNCIAS DAS DELEÇÕES DE M1 E T1	27
2.3.5 RELAÇÃO DOS GENÓTIPOS COM A RESPOSTA TERAPÊUTICA NA LMA.....	28
2.4 EPIGENÉTICA E METILAÇÃO DO DNA	29
2.4.2 METILAÇÃO NO CÂNCER.....	30
2.4.3 METILAÇÃO NO GENE <i>BRCA1</i>	32
3 BIBLIOGRAFIA	34
4 OBJETIVOS	48
4.1 GERAL	48
4.2 ESPECÍFICOS.....	48
5 ARTIGO 1.....	49
INTRODUCTION	50
METHODS.....	51
RESULTS	53
DISCUSSION.....	57
6 ARTIGO 2.....	65
7 CONCLUSÕES.....	71
8 PERSPECTIVAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide aguda (LMA) constitui um grupo heterogêneo de neoplasias malignas do tecido hematopoiético e se caracteriza pela proliferação descontrolada de células blásticas na medula óssea. Os blastos leucêmicos não conseguem passar pelo processo normal de maturação, sendo liberados no sangue periférico ainda indiferenciados e, portanto, disfuncionais. Os principais sintomas derivam da anemia, neutropenia e trombocitopenia resultantes da carência de células efetivas e da invasão de órgãos como o baço, fígado, pele e cérebro pelas células malignas.

Sua subclassificação é de grande importância para estabelecimento do prognóstico e escolha terapêutica. Os critérios clássicos para essa subclassificação foram criados e revisados pelo FAB, grupo Franco-Americano-Britânico, baseando-se principalmente nas características morfológicas e citoquímicas dos blastos. Em 2001, com atualização em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) criou um novo sistema de subclassificação que ressalta a importância de características biológicas dos blastos, tais como *status* mutacional de alguns genes, citogenética e imunofenotipagem.

A LMA tem etiopatogenia multifatorial, englobando fatores ambientais (como exposição a genotóxicos), genéticos (como mutações, polimorfismos e aberrações cromossômicas) e epigenéticos (como metilação de DNA e acetilação de histonas).

O gene *TP53* é talvez o gene supressor tumoral mais conhecido no ser humano. Sua disfunção é descrita nos mais diversos tipos tumorais. Portadores de mutações germinativas no *TP53* desenvolvem a síndrome de Li-Fraumeni, que tem como principal característica o surgimento de múltiplos tumores antes de o paciente atingir a idade adulta. Além das clássicas mutações no *TP53*, outro tipo de alteração, de impacto menos evidente, vem sendo estudada na susceptibilidade ao câncer: polimorfismos genéticos.

Dentre os vários polimorfismos descritos no *TP53*, o R72P parece ter maior impacto no desenvolvimento do câncer. A troca de arginina por prolina no códon 72 compromete parcialmente algumas funções da proteína resultante, principalmente a indução da apoptose. Portadores homozigotos para o R72P parecem ter maior probabilidade de desenvolver câncer colorretal, de mama, pulmão, entre outros. Entretanto, seu papel na susceptibilidade à LMA ainda não está bem estabelecido.

As glutathiona-S-transferases (GSTs) são uma superfamília de proteínas que desempenham papel central na detoxificação celular. São as principais enzimas de fase II e catalisam a conjugação da glutathiona a substâncias tóxicas, formando um derivado menos tóxico e mais hidrossolúvel. Existem sete tipos de GSTs, sendo todos eles altamente polimórficos. Dentre os polimorfismos conhecidos, os mais impactantes parecem ser as deleções no *GSTT1* e *GSTM1*. Quando o indivíduo é portador homozigoto do alelo nulo (deletado), há perda completa de expressão da GST.

A ausência de expressão das enzimas T1 e M1 devido às deleções tem como principal consequência o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), radicais livres e substâncias tóxicas. Desta maneira, deleções nos genes *GSTT1* e *GSTM1* vêm sendo alvo de investigações a fim de esclarecer sua relação com diversos tipos de doenças de caráter inflamatório, autoimune ou maligno. No que tange o câncer, deleções nas GSTs parecem aumentar a susceptibilidade à doença. Entretanto, estando o câncer já estabelecido, pacientes sem expressão das GSTs parecem responder melhor ao tratamento quimioterápico, por haver uma menor metabolização da droga.

A alteração da sequência de bases do DNA. Seja por mutações pontuais, translocações, inserções ou deleções é vastamente descrita nas leucemias e tem relevante papel em sua patogênese. Porém, cada vez mais, outros tipos de anomalias, conhecidas como alterações epigenéticas vêm sendo foco de estudos.

São definidos como epigenéticos, fenômenos que regulam a transcrição gênica sem alterar a estrutura do gene propriamente dita. Os mecanismos que atualmente parecem ser os mais relevantes são a metilação de citosinas encontradas em regiões conhecidas como ilhas CpG.

Além de seu papel no funcionamento normal do organismo, a hipermetilação em genes supressores de tumor é frequentemente observada na maioria das doenças malignas humanas. No que tange anomalias epigenéticas, pode-se dizer que a LMA se destaca dentre as demais doenças malignas: um grande número de genes encontram-se silenciados por hipermetilação, tais como: *p15*, *p16*, *MDR1*, *ER*, *H1C1*.

Sccardoci e colaboradores relataram expressão reduzida do *BRCA1* devido a sua hipermetilação em 32% dos casos de leucemia mieloide aguda primária e em 75% das secundárias. O fato de esse achado estar associado à ocorrência de anomalias citogenéticas nos pacientes sugere que a hipermetilação do *BRCA1* é um evento chave na instabilidade cromossômica frequentemente observada nos portadores da doença.

Além de levantar dados sobre questões como a correlação com susceptibilidade, prognóstico e subtipos da doença, o estudo da epigenética em hemopatias malignas se faz importante devido ao fato de ser uma condição reversível do DNA, para a qual já existe abordagem terapêutica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

A leucemia mielóide aguda (LMA) constitui um grupo heterogêneo de neoplasias malignas do tecido hematopoiético e se caracteriza pela proliferação descontrolada de células blásticas de linhagem mielóide na medula óssea. Os blastos leucêmicos não conseguem passar pelo processo normal de maturação, sendo liberados no sangue periférico sem sofrer maturação e, portanto, disfuncionais (Figura 1). Os principais sintomas derivam de anemia, neutropenia e trombocitopenia resultantes da carência de células efetivas e da invasão de órgãos como o baço, fígado, linfonodo e cérebro pelas células malignas (STEFFEN B, 2005). É o tipo de leucemia aguda mais frequente no adulto, correspondendo a cerca de 90% dos casos relatados.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para 2014, 9.370 novos casos de leucemias agudas no Brasil (incluindo as mielóides e linfóides), e 380 para o estado de Pernambuco, com uma taxa de aproximadamente 4,4 casos para cada 100 mil habitantes (INCA, 2014). Nos Estados Unidos, a incidência é estimada em 3,5 casos para cada 100 mil habitantes, aumentando para 17,5 na faixa etária acima dos 65 anos (BURNETT *et al.*, 2011).

Apesar de rara, quando comparada a outros cânceres, a LMA tem uma evolução rápida, silenciosa e apresenta uma alta taxa de letalidade, constituindo um problema de saúde pública. Os poucos dados disponíveis sobre a LMA no Brasil têm demonstrado uma realidade alarmante. A sobrevida global se encontra abaixo do observado em países desenvolvidos. No Brasil, a sobrevida global estimada em cinco anos está em torno de 20% (PAGNANO *et al.*, 2000; REGO *et al.*, 2002; CAPRA *et al.*, 2007), enquanto que em países desenvolvidos, oscila em torno de 40% (MOORE *et al.*, 2005; PETERSDORF *et al.*, 2007; BURNETT *et al.*, 2011).

A gênese da LMA tem um caráter extremamente multifatorial, englobando fatores ambientais, tais como exposição a genotóxicos, genéticos, tais como mutações, polimorfismos e aberrações cromossômicas, e epigenéticos, tais como metilação de DNA e acetilação de histonas (HOFFBRAND *et al.*, 2008).

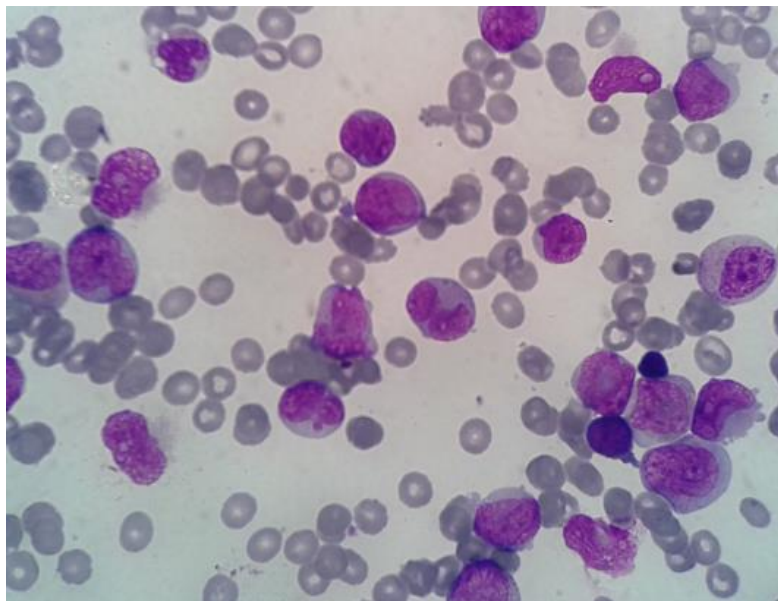


Figura 1. Presença de blastos no sangue periférico. Quadro frequentemente observado em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA). Fonte: autoria própria. Imagem obtida no Laboratório Central, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

2.1.2 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO

O diagnóstico clínico da LMA é feito a partir da observação do quadro agudo, caracterizado por anemia, púrpuras e febre, às vezes sem foco infeccioso. Pode haver infiltração leucêmica em órgãos diversos, causando hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia gengival, dor óssea, infiltração cutânea e comprometimento do sistema nervoso central (ZAGO, 2013).

O principal critério diagnóstico é o percentual mínimo de 20% de blastos na medula óssea e/ou no sangue periférico. Ao hemograma, apresenta-se mais comumente como uma anemia normocítica/normocrômica, sendo comum a presença de policromasia e até de eritroblastos circulantes, acompanhada de plaquetopenia e neutropenia. A contagem de leucócitos pode variar entre baixa, normal ou elevada e o percentual de blastos frequentemente está acima de 20%, mas também podem estar ausentes no sangue periférico (HOFFBRAND, 2008). No mielograma, observa-se infiltração medular por blastos leucêmicos, com redução na quantidade de células de outras linhagens, podendo ainda haver displasia. Também é comum haver alterações hemostáticas; o consumo de fatores de coagulação causa o alargamento do tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada, redução do fibrinogênio e aumento do D-

dímero. Outro achado frequente é o aumento sérico da enzima lactato desidrogenase (ZAGO, 2013).

Devido à grande heterogeneidade clínica e biológica da LMA, fez-se necessária a criação de um sistema de subclassificação da doença. O primeiro a ser amplamente aceito foi o proposto pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) em 1976. A FAB levou em consideração principalmente critérios citomorfológicos, imunofenotípicos e citoquímicos e subdividiu a LMA em oito subtipos: MO a M7. Com os avanços nos campos da citogenética e biologia molecular, observou-se que estes novos parâmetros eram de grande importância clínica e biológica para a doença, tornando a classificação da FAB obsoleta. Baseando-se nestes novos conhecimentos, a OMS criou em 2001, com revisão em 2008, uma nova classificação, contemplando as características citogenéticas e moleculares da LMA, Quadro 1 (VARDIMAN, 2009).

2.1.3 FATORES PROGNÓSTICOS NA LMA

Os fatores prognósticos podem ser subdivididos entre aqueles relacionados à condição de saúde geral do paciente e aqueles relacionados às características da leucemia. Os fatores do primeiro grupo são particularmente relevantes na predição da mortalidade relacionada ao tratamento e torna-se mais importante com o aumento da idade do paciente, enquanto que os do segundo grupo são preditivos da resistência à terapia convencional (DOHNER *et al.*, 2010).

Quadro 1. Classificação para a LMA pela OMS em 2008. Adaptado de Vardiman, 2009.

LMA com anormalidades genéticas repetitivas

LMA com t(8;21)(q22;q22); (RUNX1-RUNX1T1)

LMA com inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16) (p13.1;q22); (CBFB-MYH11)

Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); (PML-RARA)

LMA com t(6;9)(p23;q34); (DEK-NUP214)

LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2); (RPN1-EVI1)

LMA com t(1;22)(p13;q13); (RBM15-MKL1)

Subtipo provisório: LMA com mutação *NPM1*

Subtipo provisório: LMA com mutação *CEBPA*

LMA relacionada com mudanças mielodisplásicas

Neoplasma mielóide relacionado à terapia

LMA não categorizado nos itens anteriores

LMA com diferenciação mínima

LMA sem maturação

LMA com maturação

Leucemia mielomonocítica aguda

Leucemia monoblástica e monocítica aguda

Leucemias eritróides agudas

Leucemia eritróide pura

Eritroleucemia, mielóide/eritróide

Leucemia megacarioblástica aguda

Leucemia basofílica aguda

Pan-mielose aguda com mielofibrose

Sarcoma mielóide

Proliferações mielóides relacionadas à Síndrome de Down

Mielopoesse anormal transiente

LMA relacionada com a Síndrome de Down

A idade tem sido descrita como o fator preditor mais importante. O prognóstico tende a piorar com a idade, muitas vezes a despeito de outros fatores importantes, como

citogenética, genética molecular ou subtipo de LMA. Além disso, pacientes idosos apresentam uma incidência maior de outros fatores de pior prognóstico, tais como a ocorrência simultânea de comorbidades, maior frequência de alterações citogenéticas de alto risco e leucemia secundária (APPELBAUM *et al.*, 2006; JULIUSSON *et al.*, 2009).

Os fatores prognósticos relacionados à LMA incluem a leucometria, origem da leucemia (*de novo* ou secundária). A hiperleucocitose (contagem de leucócitos superior a $100 \times 10^9/L$ no sangue periférico) tem sido associada a um prognóstico desfavorável devido a elevada morte precoce e ao alto risco de recaída (GREENWOOD *et al.*, 2006).

Alterações citogenéticas estruturais ou numéricas foram identificadas onde de acordo com os achados citogenéticos, três grupos prognósticos foram definidos: 1. prognóstico favorável, que inclui a $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13;q22)$, $t(16;16)(p13;q22)$ ou $t(15;17)(q22;q21)$; 2. prognóstico adverso, que inclui $inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26)$, translocações balanceadas envolvendo 11q23, $t(6;9)(p23;q34)$, $t(1;22)(p13;q13)$ e cariótipo complexo; 3. prognóstico intermediário, inclui pacientes com cariótipo normal (LMA-CN) e portadores de alguma anormalidade citogenética não enquadrada nas demais categorias (VARDIMAN *et al.*, 2009).

O grupo de LMA-CN corresponde a 40 a 50% dos casos de LMA e apresenta um prognóstico consideravelmente variável, visto que as alterações que causam a clonalidade não são grandes alterações cromossômicas, não podendo, portanto, serem esclarecidas através da citogenética (GRIMWADE *et al.*, 2010). De fato, várias mutações foram descritas nesse grupo e apresentam impacto no prognóstico desses pacientes, dentre elas, as mais bem estudadas são as mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA* (ANDERSSON *et al.*, 2004; MROZEC *et al.*, 2007; ROCKOVA *et al.*, 2011; VELLOSO *et al.*, 2011).

Diante da importância das mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA* para o prognóstico dos pacientes LMA-CN, o grupo *European Leukemia Net*, em 2010 (Quadro 2), propôs uma estratificação que levava em consideração o prognóstico conferido por seus cariótipos e, nos casos de LMA-CN, pela associação destes aos marcadores moleculares. O refinamento da estratificação do prognóstico dos pacientes de cariótipo normal é particularmente importante devido ao fato de representarem cerca de 40-50% dos casos, e de sua responsividade à terapia ser caracteristicamente heterogênea (SEHGAL *et al.*, 2014).

Quadro 2. Estratificação de risco sugerida pelo grupo LeukemiaNet. *Definido como três ou mais alterações cromossômicas na ausência de uma das translocações ou inversões recorrentes designados pela OMS, isto é, t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) ou t(3;3). Fonte: Adaptado de DOHNER *et al.*, 2010.

Grupo genético	Subtipo
Favorável	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sem <i>FLT3</i> -ITD (cariótipo normal) <i>CEBPA</i> mutado (cariótipo normal)
Intermediário I	Outros cariótipos normais não especificados no grupo favorável
Intermediário II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> Anormalidades citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas
Adverso	inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearranjado -5 ou del(5q); -7; abnl(17p); cariótipo complexo*

Apesar de já haver uma grande quantidade de dados sobre alterações moleculares na LMA, as investigações continuam em ritmo acelerado, em busca de inovações no diagnóstico, estabelecimento do prognóstico e terapêutica (ABDEL-WAHAB, 2011).

2.2 O GENE *TP53*

O gene *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17 e recebe esse nome por codificar uma proteína de 53 kilodaltons, que atua principalmente como um fator de transcrição, regulando a expressão de proteínas que participam de diversos processos celulares, tais como reparo do DNA, indução da apoptose, controle do ciclo celular, entre outros (OLIVIER, 2010).

O *TP53* foi descrito pela primeira vez em 1979, por seis grupos de pesquisa independentes. Inicialmente acreditava-se ser um oncogene, por se encontrar superexpresso em células tumorais. Porém, posteriormente, percebeu-se que a região onde o *TP53* está localizado possui uma forte atividade supressora tumoral. Sua constatação foi confirmada através do modelo “two-hits”, que se baseia no fato que para um proto-oncogene desencadear uma transformação maligna, só é necessário haver mutação em um alelo, enquanto que para um gene supressor tumoral perder sua função protetora, deve haver mutação nos dois alelos (KNUDSON, 1971).

2.2.2 ESTRUTURA DO GENE *TP53* E DA PROTEÍNA p53

O gene *TP53* possui aproximadamente 20 kilobases distribuídas em 11 éxons e 10 introns. Pertence a uma família altamente conservada entre espécies, da qual também participam o p63 e o p73. A proteína *TP53* é constituída por 393 aminoácidos que se distribuem em: domínio transativador N-terminal; domínio rico em prolina (PRD), domínio ligador de DNA (DBD), domínio de oligomerização(OD), sequências de localização nuclear e de exportação nuclear (Figura 2) (BODE *et al.*, 2004).

O domínio transativador N-terminal tem a atividade efetora de fator de transcrição. O PRD confere uma maior resistência à degradação pelo *MDM2*. O DBD interage com o DNA, permitindo *TP53* estar na localização correta para executar sua função de fator de transcrição. O domínio de oligomerização permite a ligação entre mais de uma molécula de *TP53*, que precisam estar dimerizadas para serem funcionais (BAI *et al.*, 2006).

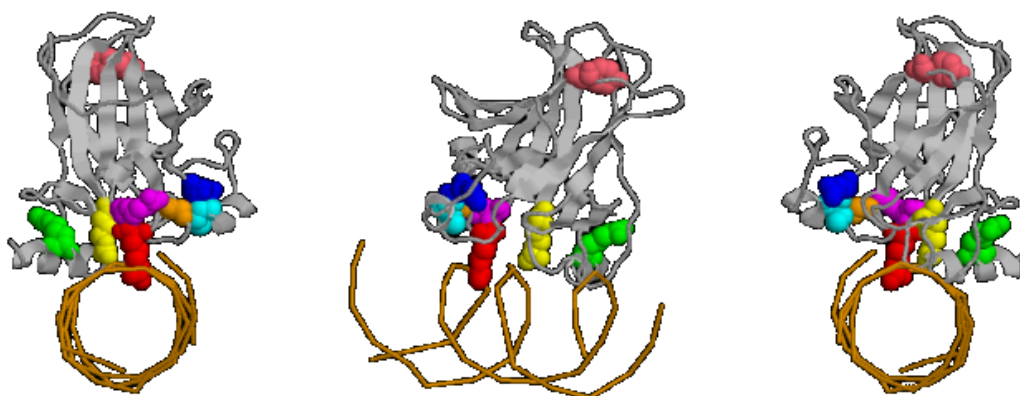


Figura 2. Estrutura tridimensional da proteína p53. Fonte: www.p53.iarc.fr. Acesos no dia 11/11/2014

O *TP53* é ativado por uma série de sinais originados de situações de estresse, tais como dano ao DNA, hipóxia, ativação de oncogene ou desregulação metabólica. Estes sinais promovem modificações pós-transcricionais no *TP53*, podendo ser elas: fosforilação, ubiquitinização e metilação. Uma vez alterado, o *TP53* irá desencadear a cascata *downstream* (Figura 3) culminando nas suas funções efetoras, tais como apoptose, reparo do genoma, entre outras (KRUSE, *et al*, 2008).

O *TP53* desempenha suas múltiplas funções celulares através da indução ou repressão de genes que apresentem os chamados “elementos responsivos ao *TP53*” em sua região promotora. Esses elementos já foram encontrados em mais de 100 genes humanos. Dentre esses, estão incluídos genes envolvidos no ciclo celular, como o *CDKN1A* (p21), genes envolvidos na apoptose, como os *BBC3*, *BAX* e *PER*, genes envolvidos na inibição da angiogênese, como o *THBS1*, e os envolvidos na senescência celular, como o *PML* (RILEY, 2008). O próprio regulador negativo do *TP53*, o *MDM2*, que ubiquitina o domínio transativador, induzindo sua degradação, possui na região do seu gene um elemento responsivo ao *TP53*. Deste modo, a expressão de *TP53* e *MDM2* funciona como um *loop* (BOND, 2005).

Além de atuar como fator de transcrição, o *TP53* também interage diretamente com proteínas do ciclo celular, regulando-as e com a Bcl-2, aumentando a permeabilidade mitocondrial e por consequência, desencadeando os primeiros eventos da apoptose (LEU *et al.*, 2004).

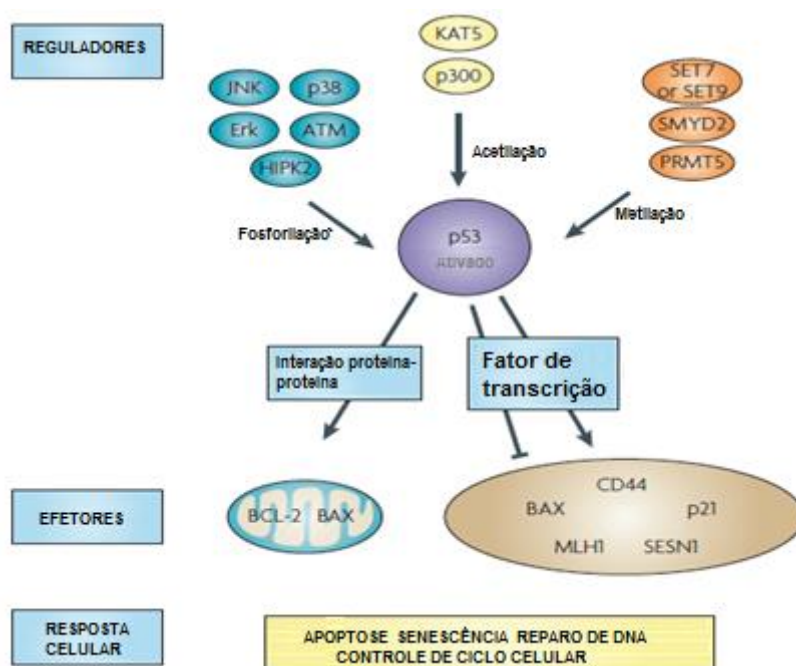


Figura 3. Ativação e função do p53. O p53 sofre alterações pós-translacionais que o ativam e promovem sua interação com proteínas de ciclo celular, com o DNA e a membrana mitocondrial, para desempenhar suas diversas funções. Fonte: OLIVIER, 2010.

Alterações no gene *TP53* ou em sua via é provavelmente o achado genético mais recorrente nos tumores malignos humanos, sendo encontradas em aproximadamente metade dos casos de alguns tipos tumorais. No câncer de ovário e colorretal, o *TP53* se encontra mutado em mais de 40% dos casos, enquanto que em tumores hematológicos e cervicais, a frequência cai para 12% e 6%, respectivamente (VOUSDEN *et al.*, 2007).

As alterações no *TP53* podem ser classificadas em três tipos: mutações somáticas, mutações herdadas e polimorfismos.

2.2.3 MUTAÇÕES SOMÁTICAS

As mutações somáticas, ou seja, aquelas que são adquiridas e ocorrem somente no clone maligno, são as mais comuns. Em sua maioria, são do tipo “missense”, onde há a troca pontual de um aminoácido. Em torno de 85% das mutações somáticas no *TP53* estão localizadas entre os códons 125 e 300, que correspondem principalmente ao DBD, domínio de ligação ao DNA (do inglês, *DNA binding domain*). Dentro do DBD, existem três principais *hotspots*, os códons 175, 248 e 273, que correspondem a 60% das mutações no DBD.

O tipo de mutação no *TP53* pode ser relacionado a uma situação prévia. Por exemplo, 25% dessas mutações são C>T nas chamadas ilhas CpG. As citosinas das ilhas CpG se encontram frequentemente metiladas e a adição metil confere instabilidade à citosina, que por sua vez sofre deaminação para timina quando exposta a situações de estresse oxidativo e inflamação, tais como na mucosa de Barret ou na colite ulcerativa. (VANINETTI *et al.* 2008).

2.2.4 MUTAÇÕES HERDADAS

As mutações herdadas no *TP53* (germline) são mais raras que as somáticas e estão relacionadas a uma alta prevalência de tumores malignos. São, também, a principal causa da síndrome de Li-Fraumeni. Essa doença tem como principal

característica clínica o desenvolvimento de múltiplos tumores em diversos tecidos ao longo da vida, inclusive na infância (OLIVIER, 2010).

As mutações herdadas parecem favorecer principalmente o câncer de mama. Em uma triagem, foi observado que 3% das pacientes com câncer de mama precoce e com histórico familiar possuíam mutações herdadas no *TP53*. Um estudo brasileiro identificou uma frequência relativamente elevada da mutação R337H na população geral, ocorrendo em um em cada 5.000 indivíduos e constatou que essa mutação está relacionada a um maior risco de desenvolvimento de câncer de mama (PROLLA *et al.*, 2010). Do ponto de vista molecular, as mutações herdadas se distribuem de maneira similar às somáticas, nos mesmos *hotspots* do DBD (BOUGEARD *et al.*, 2003).

2.2.5 POLIMORFISMOS NO *TP53*

Polimorfismos genéticos são alterações muito semelhantes a mutações. As principais características que os distinguem são a frequência com que ocorrem na população geral (polimorfismo é maior que 1% e mutação, menor que 1%) e o impacto que provocam na proteína resultante. Geralmente os polimorfismos são alterações mais amenas, que alteram sem comprometer completamente a função da proteína, enquanto que as mutações tendem a ter efeitos mais perceptíveis na proteína e no fenótipo. Essa diferença de impacto explica a maior proporção de polimorfismos na população, visto que muitas mutações são evolutivamente desfavoráveis. Os polimorfismos podem consistir em deleções, inserções, ou SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphism*), onde há troca de apenas um único nucleotídeo (WHIBLEY *et al.*, 2009).

A grande maioria dos polimorfismos no gene *TP53* é intrônica e está situada fora dos sítios de *splicing*, de maneira a parecer não ter grande relevância. Excluindo os polimorfismos intrônicos e os sinônimos (não alteram a sequência de aminoácidos), restam 11 polimorfismos. Estes, mesmo originando uma proteína variante, tendem a ser relativamente silenciosos, influenciando de maneira discreta a propensão a ter a doença ou a idade em que o indivíduo a desenvolverá (WHIBLEY *et al.*, 2009). Dentre os 11 polimorfismos não sinônimos, dois já foram bem caracterizados do ponto de vista funcional: o P47S e o R72P. Ambos influenciam diretamente a eficiência do *TP53* para realizar determinadas funções.

2.2.6 R72P

O polimorfismo R72P é um SNP que consiste na troca de uma guanina na posição 2 do códon 72, éxon 4, por uma citosina, resultando na troca do resíduo de arginina por prolina. As variantes foram denominadas R72 ou ARG (arginina) e P72 ou PRO (prolina). O códon 72 está localizado no chamado domínio rico em prolina (PRD), o qual se situa entre o domínio transativador N-terminal e o DBD (Figura 4). A função exata do PRD não está completamente elucidada, entretanto, experimentos em linhagens celulares e em camundongo sugerem que o PRD é essencial para desencadear a apoptose frente a uma situação de estresse celular e tumorigênese (HRSTKA *et al.*, 2009).



Figura 4. Localização do polimorfismo R72P no gene e na proteína TP53. Fonte: adaptado de WHIBLEY *et al.*, 2009.

Em 1999, Banks e colaboradores realizaram a primeira comparação entre a atividade biológica das duas variantes para o códon 72, através de técnicas de transfecção transiente. Não foi observada diferença significativa na capacidade de ligação ao DNA, tampouco na sua função de fator de transcrição. Porém, foi visto que a forma R72 é um melhor supressor da transformação maligna da célula, uma vez que é mais eficaz em induzir a morte celular programada, chegando a induzir a apoptose cinco vezes mais rápido que a forma P72 (THOMAS *et al.*, 1999).

A primeira comparação da atividade biológica em humanos das variantes P72 e R72 foi realizada em leucócitos. As células de pacientes homozigotos para R72, quando expostas a Ara-c, desencadearam a apoptose em uma taxa muito maior que a da P72 (BONAFE M *et al.*, 2002). A maior capacidade de iniciar a apoptose da forma R72 não

pôde ser explicada pelo seu papel como fator de transcrição, uma vez que as duas variantes não apresentam diferença na afinidade pelo DNA (DUMONT *et al.*, 2003).

Esse fenômeno foi esclarecido ao se demonstrar que a variante R72 é transportada em maior quantidade para o interior da mitocôndria, onde o *TP53* age diretamente sobre o citocromo C, causando a sua liberação no citoplasma e consequentemente, dando início à apoptose (DUMONT *et al.*, 2003). O transporte em maior quantidade da forma R72 acontece porque o MDM2, molécula que realiza a exportação do *TP53* nuclear, apresenta maior afinidade pela R72 (MARCHENKO *et al.*, 2000; WHIBLEY *et al.*, 2009).

Há aproximadamente 15 anos, após uma publicação associando o polimorfismo P72 ao câncer cervical (STOREY, 1998), deu-se início a uma busca intensiva de associação do R72P com tumores malignos, que continua até a atualidade. Foi encontrada associação com diversos tumores, entre eles, mamário (BUYRU *et al.*, 2003; OHAYON *et al.*, 2005; NOMA *et al.*, 2004; SIDDIQUE *et al.*, 2005), gástrico (PAOREZ, 2005), hepático (ZHU *et al.*, 2005), pulmonar (SAKIYAMA *et al.*, 2004), entre outros.

Contudo, a literatura acerca dos tumores hematológicos, principalmente as leucemias agudas ainda é insuficiente e contraditória, se fazendo necessária a realização de estudos com maior número de casos e controles e em diferentes etnias, visto que o polimorfismo R72P tem uma frequência de alelos bastante diversificada (WHIBLEY *et al.*, 2009).

2.3 GLUTATIONA-S-TRANSFERASES

As glutathiona-S-transferases (GSTs) são uma superfamília de proteínas que desempenham papel central na detoxificação celular, estando amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais, plantas e bactérias. São as principais enzimas de fase II e catalisam a conjugação da glutathiona, um tripeptídeo composto por ácido glutâmico, cisteína e glicina, a substâncias tóxicas via grupo sulfidríla (Figura 5), formando um derivado menos tóxico e mais hidrossolúvel, facilitando assim, sua excreção em urina e fezes (ROTUNNO *et al.*, 2012).

Apesar de as GSTs serem expressas em praticamente todos os tecidos humanos, são encontradas em maior abundância no fígado (ROTUNNO *et al.*, 2012). São exemplos de alvos da GST: drogas, pesticidas, herbicidas, metabólitos formados durante

o estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS). A grande maioria dos quimioterápicos, tais como o bussulfan, clorambucil, cisplatina, melphalan e ciclofosfamida são detoxificados pelas GSTs. Além de seu papel na detoxificação celular, descobertas mais recentes demonstram que as GSTs também estão envolvidas na síntese de leucotrienos, prostaglandinas, testosterona, progesterona e ainda, na degradação da tirosina. (HAYES, 2005).

No ser humano, as GSTs se classificam em três famílias: as de localização citosólica, as mitocondriais e as microsossomais, sendo que 95% delas são citosólicas.

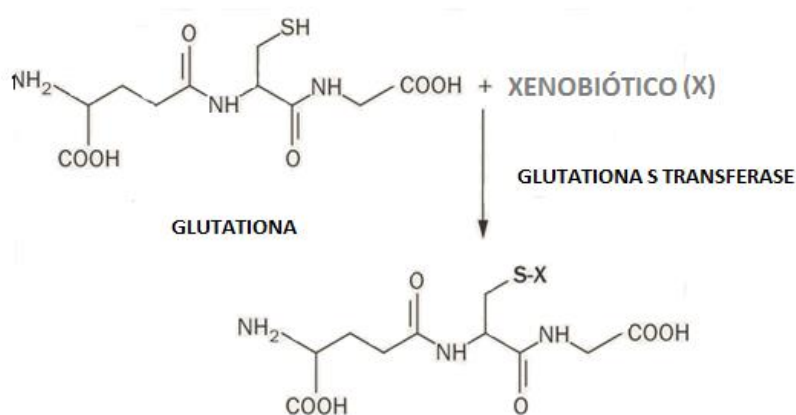


Figura 5. Conjugação da glutathione a moléculas tóxicas, reação catalisada pela glutathione-S-transferase. Fonte: adaptado de SIMIC, 2009.

As GSTs citosólicas ocorrem em forma dimérica, com cada subunidade cada variando entre 200 e 244 aminoácidos. Existem, no ser humano, sete diferentes tipos de GSTs citosólicas, denominados alpha (A), mu (M), pi (P), sigma (S), theta (T), ômega (O) e zeta (Z). Compartilham os substratos para o qual transferem o grupo sulfidríla, havendo apenas discreta diferença de afinidade entre as variantes (SHEEHAN *et al.*, 2001).

2.3.2 GENES DA CLASSE Mu

Existem cinco GSTs da classe Mu (*GSTM1-5*) e seus genes estão situados em um cluster no cromossomo um (PEARSON *et al.*, 1993). O gene *GSTM1* codifica uma transferase com importante papel na desativação de compostos policíclicos e aromáticos

de caráter carcinogênico, derivados do benzeno e aflatoxina (BOLT, 2006). Dentre os genes da classe Mu, o M1 é o mais polimórfico e sua deleção é um achado frequente na população geral, chegando a 67% na Austrália, 50% na Europa ocidental e 22% em nigerianos. A frequência da deleção no Brasil foi de 50%, para descendentes de europeus no Rio Grande do Sul (GASPAR *et al.*, 2004) e 34% em afrodescendentes residentes no estado do Rio de Janeiro (ROSSINI *et al.*, 2002). Acredita-se que a causa dessa deleção tão frequente seja um erro no *crossing over* entre os genes *GSTM1* e *GSTM2*, ocorrido em decorrência à proximidade física entre ambos.

A deleção de apenas um alelo da *GSTM1* mostrou não ser impactante na expressão da enzima, entretanto, no caso de dupla deleção (alelo nulo), há perda completa da atividade enzimática (ROTUNNO *et al.*, 2012).

2.3.3 GENES DA CLASSE THETA

A classe theta das GSTs se subdivide em T1 e T2. Os genes de ambas as variantes estão localizados no cromossomo 22q11.23, a uma distância de 50 kb (TAN *et al.*, 1995). O gene T1 codifica a glutathione-S-transferase T1 e apresenta uma sequência altamente conservada do ponto de vista evolutivo. Assim como a maioria das GSTs citosólicas, a *GSTT1* é mais expressa no tecido hepático, onde desempenha um importante papel na detoxificação de drogas citostáticas, hidrocarbonetos e hidrocarbonetos halogenados (BOLT, 2006).

Assim como a *GSTM1*, a *GSTT1* também possui um alelo nulo, que quando em homozigose, resulta em ausência de atividade enzimática. O genótipo nulo é frequente na Ásia, porém mais raro em populações ocidentais, sendo encontrado em 21% de brasileiros de ascendência europeia e 26% de brasileiros de ascendência africana. A co-ocorrência de deleções nos alelos M1 e T1 em população saudável brasileira foi de 8% (KVITKO, 2006).

2.3.4 CONSEQUÊNCIAS DAS DELEÇÕES DE M1 E T1

A ausência de expressão das enzimas T1 e M1 devido às deleções tem levado a uma investigação de suas possíveis relações com diversos tipos de doenças. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio e radicais livres pode estar relacionado ao surgimento de doenças de caráter inflamatório, autoimune ou maligno, sendo a relação entre

deleções na *GSTT1* e M1 e o risco de desenvolvimento de diversas doenças, alvo de intensivas investigações. Em casos como a aterosclerose, as glutathionas protegem os lipídios da oxidação através da eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS), de maneira que a ausência das mesmas poderia favorecer a oxidação com consequente formação de placa aterosclerótica. Já no caso dos tumores malignos, o acúmulo de radicais livres e substâncias xenotóxicas não metabolizadas poderia, a longo prazo, causar o surgimento de múltiplas mutações, aumentando assim o risco de desenvolvimento de tumores (ZHONG *et al.*, 2006).

Dentre as doenças que parecem estar relacionadas ao polimorfismo destacam-se: diabetes tipo 2 (YALIN *et al.*, 2007), doença de Parkinson (KELADA, 2003), artrite reumatoide, aterosclerose e hipertensão (KENTARO *et al.*, 2008).

Dentre os tumores malignos, está associado ao cervical (STOSIC, 2014), pulmão (PAN *et al.*, 2014), bexiga (SAFARINEJAD *et al.*, 2013), próstata (SAFARINEJAD *et al.*, 2014), colorretal (ECONOMOPOULOS *et al.*, 2010) e mama (SERGENTANIS *et al.*, 2010).

No âmbito dos tumores hematológicos ainda existem controvérsias. Como o efeito dos polimorfismos na susceptibilidade ao câncer é considerado de baixa penetrância, ou seja, exerce uma influência menor que outros fatores, tais como idade e exposição a carcinógenos, variações na frequência populacional e vieses na seleção de indivíduos para o estudo são o suficiente para mascarar esse possível efeito. Apesar disso, o surgimento de linfomas não-Hodgkin parece estar associado a deleções nos genes *GSTT1* e *GSTM1* (YANG *et al.*, 2014). Em relação à leucemia mieloide aguda, foco do presente estudo, alguns autores descrevem a dupla deleção M1/T1 como evento favorável à leucemogênese (ARRUDA *et al.*, 2001; DAS *et al.*, 2009), enquanto outros observaram que a deleção em apenas um dos gene incrementa, de maneira independente, o risco de desenvolver leucemia (ZIL *et al.*, 2014).

2.3.5 RELAÇÃO DOS GENÓTIPOS COM A RESPOSTA TERAPÊUTICA NA LMA

Além de seu impacto na incidência de doenças malignas, deleções nas GSTs também parecem estar associadas à resposta terapêutica de pacientes em quimioterapia. Contudo, neste caso, o efeito do polimorfismo se inverte, de maneira que o alelo nulo se

torna protetor. Apesar de parecer contraditório, os genótipos nulos das GSTs têm se mostrado importantes em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. Esse fenômeno se dá porque a ausência das GSTs evita a metabolização da droga, aumentando assim, seu tempo de meia vida, biodisponibilidade e seu efeito citotóxico sobre as células malignas.

O alelo nulo da *GSTM1* foi associado a uma maior sobrevida livre de doença e maior sucesso do tratamento quimioterápico em leucemia linfóide aguda pediátrica e em câncer de ovário (JONES *et al.*, 2001). Já no caso da *GSTT1*, os mesmos parâmetros foram favoráveis para pacientes portadores de LMA (ZHANG *et al.*, 2006). Em suma, existem evidências que polimorfismos nas GSTs podem influenciar a susceptibilidade à LMA e seu curso prognóstico, entretanto, se faz necessário mais investigações em torno do tema.

2.4 EPIGENÉTICA E METILAÇÃO DO DNA

A alteração da sequência de bases do DNA seja por mutações pontuais, translocações, inserções ou deleções é vastamente descrita nas leucemias e tem relevante papel em sua patogênese. Porém, cada vez mais, outros tipos de anomalias, conhecidas como alterações epigenéticas vêm sendo foco de estudos. São definidos como epigenéticos, fenômenos que regulam a transcrição gênica sem alterar a estrutura do gene propriamente dita. Os mecanismos que atualmente parecem ser os mais relevantes são a metilação de citosinas encontradas em regiões conhecidas como ilhas CpG e a acetilação das histonas (GALM *et al.*, 2006).

A adição do grupamento metil ao carbono cinco da citosina precedente a uma guanina é catalisada por uma família de enzimas chamadas DNA metil transferases (DNMT), sendo conhecidos atualmente cinco membros: DNMT1, DNMT2, DNMT 3A, DNMT3B e DNMT3L, que diferem em suas funções no sentido de metilar de novo, ou metilar fitas recém criadas na duplicação do DNA (ABDEL-WAHAB, 2011).

Acredita-se que a metilação das citosinas atrai as proteínas ligadoras do radical metil (MBP), proteínas capazes de formar um cluster ao redor da região hipermetilada do DNA, criando uma barreira física ao acesso de fatores de transcrição. O processo funciona como talvez o mais influente mecanismo de regulação gênica em eucariotos e ocorre preferencialmente nas chamadas ilhas CpG, regiões ricas em citosinas seguidas

de guanina, mais frequentemente encontradas nas regiões promotoras de diversos genes (SCHOOFS, 2011).

A metilação das ilhas CpG em regiões promotoras é um mecanismo fisiológico de regulação gênica observado na inativação do cromossomo X na mulher, diferenciação celular e no *imprinting* genômico, além de ser um processo essencial na embriogênese. Pacientes com deficiência de algum regulador da metilação geralmente são portadores de doenças genéticas raras, que comprometem tecidos com alto grau de diferenciação, tais como muscular e nervoso. Pode, ainda, funcionar como mecanismo de defesa no silenciamento de DNA viral (EVERMAN, 2000).

2.4.2 METILAÇÃO NO CÂNCER

Além de seu papel no funcionamento normal do organismo, a hipermetilação em genes supressores de tumor é frequentemente observada na maioria das doenças malignas humanas. Praticamente em todos os tumores malignos já foram descritos genes hipermetilados em suas regiões promotoras (SCHOOFS, 2014). Esses achados têm sido fortemente atrelados ao surgimento da doença. Por motivos ainda não completamente compreendidos, há, previamente ao surgimento do tumor, uma desregulação nos mecanismos de controle epigenético que tem como consequência a hipermetilação de diversos genes. Quando em genes supressores tumorais, o fenômeno tem efeito semelhante a mutações clássicas na função do gene, podendo inclusive ser considerado um evento (hit) no modelo de dois eventos (hits) de Knudson (DAS *et al.*, 2004).

A metilação de DNA também exerce a função de estabilidade da fita de DNA. Em condições normais, um gene encontra-se hipermetilado em todo o seu comprimento, exceto na região promotora. Curiosamente, em doenças malignas de maneira geral, o DNA se encontra globalmente hipometilado, exceto nas ilhas CpG de regiões promotoras, onde é mais comum encontrar a hipermetilação, havendo assim, uma inversão do perfil de metilação (GAIM, 2006). A literatura descreve metilação de regiões promotoras em diversos genes supressores de tumor, podendo eles estar envolvidos no controle do ciclo celular (*p15*, *p16*, *Rb*, *TP73*), no sistema de reparo do DNA (*BRCA1*, *MGMT*) e na apoptose (*DAPK*) (WONG, 2000).

No que tange anomalias epigenéticas, pode-se dizer que a LMA se destaca dentre as demais doenças malignas: um grande número de genes encontra-se silenciado por

hipermetilação, tais como o *p15*, *p16*, *MDR1*, *ER*, *H1C1* (BOULTWOOD *et al.*, 2007), *DAPK1*, *TSP1*, *CDH1* (GRECO *et al.*, 2010). A alta prevalência de genes hipermetilados na LMA pode ser explicada pelo fato de que entre 30% e 40% dos casos de LMA têm mutações em pelo um regulador epigenético, tais como *DNMT3a*, *TET2*, *IDH1* e *IDH2* (ABDEL-WAHAB, 2011).

Visto a grande relevância do silenciamento de genes supressores tumorais por metilação do DNA, iniciou-se uma busca por tratamentos que pudessem reverter o quadro. A resposta foi o surgimento de análogos de citosina capazes de se ligar irreversivelmente no sítio da DNA metiltransferase capaz de capturar a citosina e adicionar o radical metil. Existem duas drogas mais conhecidas: decitabina e 5'-aza-deoxicitidina. Essas drogas, ao inibirem a enzima, alteram o perfil de metilação das células alvo, reativando genes antes silenciados e promovendo a diferenciação/maturação celular. Ambas as drogas já são utilizadas no tratamento de pacientes com síndrome mielodisplásica e estão em ensaios clínicos de fase três para LMA (MALIK *et al.*, 2014).

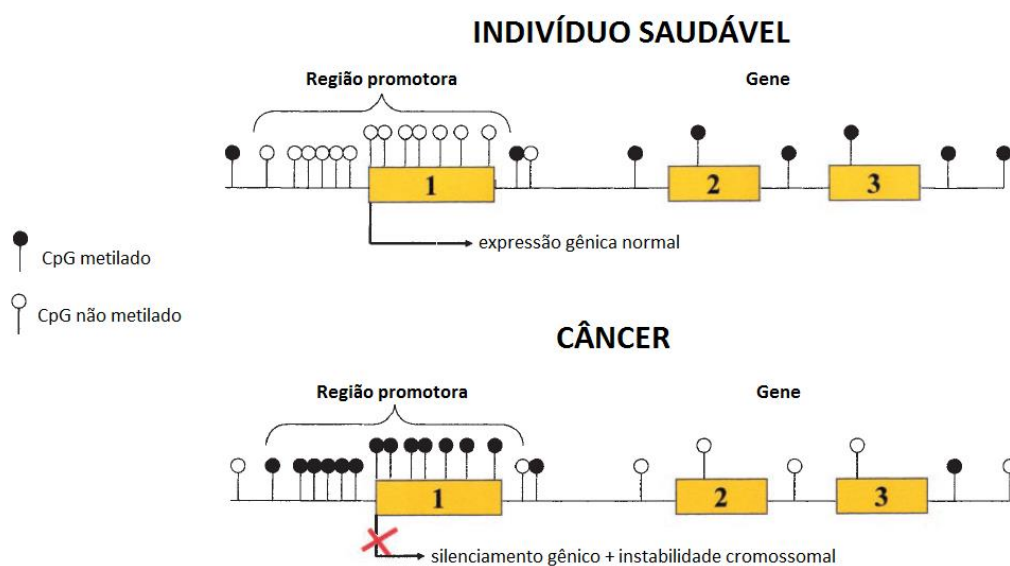


Figura 6. Os pontos brancos representam dinucleotídeos CpG não-metilados enquanto os pretos, dinucleotídeos CpG metilados. Na primeira situação a transcrição do gene ocorre normalmente; na segunda, mostra o silenciamento gênico provocado pela metilação do DNA. Fonte: ESTELLER (2005).

2.4.3 METILAÇÃO NO GENE BRCA1

O gene *BRCA1* tem uma estrutura grande e complexa, de aproximadamente 100kb. O *BRCA1* se localiza no braço longo do cromossomo 17, sendo composto de 24 éxons e codifica uma proteína com 1.863 aminoácidos. Codifica proteína de mesmo nome, que interage com CHEK2, ATM e Nbs1, constituindo a via de reparo homólogo do DNA. (FRIEDESON, 2007).

Frente a situações danosas ao DNA, o *BRCA1* é fosforilado e se complexa com as proteínas *BRCA2* e *RAD51*. O complexo age quando há quebras em ambas as fitas do DNA (DSB, do inglês *double strand break*), dividindo o cromossomo em dois. Para realizar o reparo, o complexo baseia-se na sequência correspondente, localizada no cromossomo homólogo (Figura 7) (YOSHIDA *et al.*, 2004).

Quando há perda qualitativa ou quantitativa do *BRCA1*, o sistema de reparo torna-se falho, expondo o material genético ao efeito de carcinógenos químicos e físicos, tendo como consequência o surgimento de mutações e translocações somáticas. Caso as mesmas ocorram em um proto-oncogene ou em genes supressores tumorais, dar-se-á início assim, ao processo de malignização (FRIEDESON, 2007).

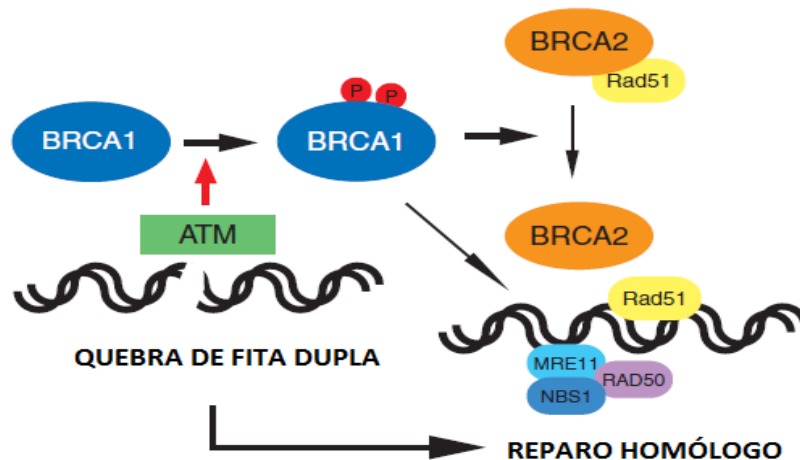


Figura 7. O *BRCA1* é ativado por fosforilação de vários resíduos de serina para efetuar sua função de reparo homólogo em conjunto com o *BRCA2* e *RAD51*. Fonte: adaptado de YOSHIDA, 2004.

Mutações nos genes *BRCA* foram primeiramente associadas ao câncer de mama na década de 90 (ESTELLER, 2002). Todavia, na atualidade também estão relacionadas ao câncer de ovário e à anemia de Fanconi, tipo anemia aplástica cuja principal característica clínica é a alta probabilidade de evolução para LMA (FRIEDESON,

2007). A estreita relação entre disfunções no *BRCA1* e em outros genes do sistema de reparo homólogo com a anemia de Fanconi deu origem a indagações sobre uma possível participação direta desse sistema na origem da LMA (SCCARDOCI, 2006).

Em 2000, Esteller e colaboradores observaram que a hipermetilação da região promotora do *BRCA1* também pode ter um efeito semelhante às mutações: diminuição na capacidade de reparo homólogo do DNA, acúmulo de mutações e malignização do tecido mamário (ESTELLER, 2000). Sccardoci e colaboradores relataram expressão reduzida do *BRCA1* devido a sua hipermetilação em 32% dos casos de leucemia mielóide aguda primária e em 75% das secundárias. O fato de esse achado estar associado à ocorrência de anomalias citogenéticas nos pacientes sugere que a hipermetilação do *BRCA1* é um evento chave na instabilidade cromossômica frequentemente observada nos portadores da doença.

Além de levantar dados sobre questões como a correlação com susceptibilidade, prognóstico e subtipos da doença, o estudo da epigenética em hemopatias malignas se faz importante devido ao fato de ser uma condição reversível do DNA, para a qual já existe abordagem terapêutica (SCHOOFS, 2011).

3 BIBLIOGRAFIA

ANDERSSON A, JOHANSSON B, LASSEN C, MITELMAN F, BILLSTRÖM R E FIORETOS T. Clinical impact of internal tandem duplications and activating point mutations in FLT3 in acute myeloid leukemia in elderly patients. **European Journal of Haematology**. v.72 p.307–313, 2004.

APPELBAUM F.R, GUNDACKER H, HEAD D.R, SLOVAK M.L, WILLMAN C.L, GODWIN J.E, ANDERSON J.E E PETERSDORF S.H. Age and acute myeloid leukemia. **Blood** v.107, p.3481-3485, 2006.

ARRUDA VR, LIMA CSP, GRIGNOLI CRE, DE MELO MB, LORAND-METZE I, ALBERTO FL, SAAD STO, COSTA FF. Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S-transferase mu 1 (*GSTM1*) and theta 1 (*GSTT1*) gene defects. **European Journal of Haematology** v.66, p383-388, 2001.

BAI L, ZHU W, P53: Structure, Function and Therapeutic Applications. **Journal of Cancer Molecules**. v.4, p.141-153, 2006.

BAYLIN, S, MULLER-TIDOW C, SCHWABLE J, BERDEL WE, SERVE H. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. **Critical Reviews Oncology/Hematology** v. 56 p.195-221, 2005.

BENICIO M.T.L, REGO E.M. Leucemias Mielóide Aguda no Adulto in: ZAGO M.A, FALCÃO R.P, PASQUINI, **Tratado de Hematologia**, Atheneu, 2013, p.343-350.

BODE AM, DONG Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. **Nature Reviews Cancer** v.4, p.793-805, 2004.

BOLT HM¹, THIER R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases *GSTT1* and *GSTM1* in pharmacology and toxicology. **Current Drugs Metabolism**. V.7, p.613-28, 2006.

BONAF M, SALVIOLI S, BARB C, MISHTO M, TRAPASSI C, GEMELLI C, STORCI G, OLIVIERI F, MONTI D, FRANCESCHI C. p53 codon 72 genotype affects apoptosis by cytosine arabinoside in blood leukocytes. **Biochemistry. Biophysics. Research Community**. v299, p.539–541, 2002.

BOND, G. L., HU, W. & LEVINE, A. J. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. **Current Cancer Drugs Targets**, v5, p3–8, 2005.

BOUGEARD G, BAERT-DESURMONT S, TOURNIER I, VASSEUR S, MARTIN C, BRUGIERES L, CHOMPRET A, BRESSAC-DE PAILLERETS B, STOPPALYONNET D, BONAÏTI-PELLIE C, et al. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. **Journal of Medical Genetics** v43, p531–533, 2006.

BOULTWOOD, J.; WAINSCOAT, J.S. Gene Silencing By DNA Methylation In Haematological Malignancies. **British Journal of Haematology**, v.138, p.3–11, 2007.

BURNETT AK, HILLS RK, MILLIGAN D, KJELDSEN L, KELL J, RUSSELL NH, YIN JA, HUNTER A, GOLDSTONE AH, WHEATLEY K. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. **Journal of Clinical Oncology** v.29, p.369-377, 2011.

BUYRU N, TIGLI H, DALAY N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. **Oncology Reports**, v.10, p.711-714, 2003.

CAPRA M, VILELLA L, PEREIRA WV, COSER VM, FERNANDES MS, SCHILLING MA, ALMEIDA D, GROSS M, LEITE M, HELLWIG T *et al.* Estimated number of cases, regional distribution and survival of patients diagnosed with acute myeloid leukemia between 1996 and 2000 in Rio Grande do Sul, Brazil. **Leukemia Lymphoma** v.48, p.2381-2386, 2007.

CATTELANI S, FERRARI-AMOROTTI G, CALABRETTA B. The p53 Codon 72 Pro/Pro Genotype Identifies Poor-Prognosis Neuroblastoma Patients: Correlation with Reduced Apoptosis and Enhanced Senescence by the p53-72P Isoform. **Neoplasia**. v.14, p.634-43, 2012.

DAS P, PASHA A, SHAIK, BAMMIDI V. Meta-analysis study of glutathione-s-transferases (GSTM1, GSTP1, and GSTT1) gene polymorphisms and risk of acute myeloid leukemia. **Leukemia Lymphoma**. V.50, p,1345-51, 2009.

DAS P.M, SINGAL R. DNA Methylation and Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, V.22, p.4632-4642, 2004.

DÖHNER H, ESTEY EH, AMADORI S, APPELBAUM FR, BÜCHNER T, BURNETT AK, DOMBRET H, FENAUX P, GRIMWADE D, LARSON RA *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood** v.115, p.453-474, 2010.

DUMONT P, LEU J, PIETRA ACD, GEORGE DL, MURPHY M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nature Genetics** v.33,p.357–365,2003.

ECONOMOPOULOS KP¹, SERGENTANIS TN. GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis. **European Journal of Cancer**. v.46, p.1617-31, 2010.

ESTELLER, M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. **Annual Reviews Pharmacology. Toxicology.**, v.45, p.629-656, 2005.

ESTELLER, M. CpG Island Hypermethylation and Tumor Suppressor Genes: a Booming Present, a Brighter Future. **Oncogene**, 21, 5427 – 5440, 2002.

EVERMAN, D.B, CASSIDY, S.B. Genetics of Childhood Disorders: XII. Genomic Imprinting: Breaking the Rules. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. **Development and Neurobiology**, 2000.

FRIEDENSON B. The BRCA1/2 Pathway Prevents Haematologic Cancers in Addition to Breast and Ovarian Cancers. **BMC Cancer** v. 7, n. 152, ago 2007.

GALM, O.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. The Fundamental Role of Epigenetics in hematopoietic malignancies. **Blood**, v. 20, p. 1-13, 2006.

GARCIA-MANERO, G.; BUESO-RAMOS, C.; DANIEL, J.; WILLIAMSON, J.; KANTARJIAN, H.M.; ISSA, J.P.J. DNA Methylation Patterns at Relapse in Adult Acute Lymphocytic Leukemia. **Clinical Cancer Research**. v.8, p.1897-1903, 2002.

GASPAR, PA, HUTZ MH, SALZANO FM, HILL K, HURTADO AM, PETZ-ERLER ML. Polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, *GSTM1*, *GSTT1* and p53 genes in ameridians **American Journal Of Anthropology**. V.199, p.249-256, 2002.

GIACOMAZZI J, GRAUDENZ MS, OSORIO CABT, KOEHLER-SANTOS P, PALMERO EI, et al. Prevalence of the *TP53* p.R337H Mutation in Breast Cancer Patients in Brazil. **PLoS ONE** v.9, 2014.

GREENWOOD MJ, SEFTTEL MD, RICHARDSON C, BARBARIC D, BARNETT MJ, BRUYERE H, FORREST DL, HORSMAN DE, SMITH C, SONG K *et al.* Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia. **Leukemia Lymphoma** v47, p.1245-1252, 2006.

GRIMWADE D, HILLS R.K, MOORMAN A.V, WALKER H, CHATTERS S, GOLDSTONE A.H, WHEATLEY K, HARRISON C.J E BURNETT A.K. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. **Blood** v.116, p.354-365, 2010.

HALL A.G, AUTZEN P, CATTAN A.R, MALCOLM A.J, COLE M, KERNAHAN J, REID M.M. Expression of mu class glutathione S-transferase correlates with event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Research**, v.54, p.5251-5254, 1994.

HAYES JD, PULFORD DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug

resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. V.30, p.445–600, 1995.

HOFFBRAND A.V; MOSS P.A.H; PETTIT J.E. Leucemias Agudas. In: Hoffbrand, Moss, Petit. **Fundamentos em Hematologia**, 5ª ed., Porto Alegre: ARTMED, 2008, p. 167-183.

HOWELLS R.E, HOLLAND T, DHAR K.K, REDMAN C.W, HAND P, HOBAN P.R, HRSTKA R, COATES F.J, VOJTESEK B. Polymorphisms in p53 and the p53 pathway:roles in cancer susceptibility and response to treatment. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. V.13, p.440-53, 2009.

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/mapa.asp?ID=8> Acessado no dia 08/09/2014

.

IM, A.P.; SEHGAL, A.R.; CARROLL, M.P.; SMITH, B.D.; TEFFERI, A.; JOHNSON, D.E. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. **Leukemia**, v. 28, p. 1774-1783, 2014.

JONES P.W, FRYER A.A, STRANGE R.C. Glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* genotypes in ovarian cancer: association with p53 expression and survival. **International Journal of Gynecologic Cancer**. v.11, p.107-112, 2001.

JULIUSSON G, ANTUNOVIC P, DEROLF A, LEHMANN S, MÖLLGÅRD L, STOCKELBERG D, TIDEFELT U, WAHLIN A E HÖGLUND M. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. **Blood**, v.113, p.4179-4187, 2009.

KATKOORI V.R, JIA X, SHANMUGAM C, *et al.* Prognostic Significance of p53 Codon 72 Polymorphism Differs with Race in Colorectal Adenocarcinoma **Clinical Cancer Research**; v.15, p.2406-2416, 2009.

KELADAA SN, STAPLETONA PL, FARINA FM, BAMMLERA TK, EATON DL, SMITH-WELLERA T, FRANKLINA GM, SWANSONB PD, LONGSTRETH WT, CHECKOWAYA H. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and Parkinson's Disease. **Neuroscience Letters** v.337, p.5–8, 2003.

KENTARO O, MASAHARU H, KEIJI T, TOMOKO Y, SHUICHI M, TORU M, KAZUKO N. Association between glutathione S-transferase A1, M1 and T1 polymorphisms and hypertension. **Pharmacogenetics Genomics** v.18, p.275–277, 2008.

KNUDSON A.G, Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of National Academia of Science**, v.68, p.820-823, 1971.

KRUSE, J. P. & GU, W. SnapShot: p53 posttranslational modifications. **Cell** v.133, p.930–930, 2008.

KVITKO, K, GASPAR KA, TORRES MR, MARA HH. Ethnicity and mortality from systemic lupus erythematosus in the US. **Annals Of Rheumatology Diseases** v.65, p.1500-1505, 2006.

LEU, J. I., DUMONT, P., HAFEY, M., MURPHY, M. E. & GEORGE, D. L. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak–Mcl1 complex. **Nature Cellular Biology**. v6, p.443–450, 2004.

MARCHENKO N.D, ZAIKA A, MOLL U.M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. **Journal of Biological Chemistry**. v26, p.16202-12, 2000.

MOORE J.O, GEORGE S.L, DODGE R.K, AMREIN P.C, POWELL B.L, KOLITZ J.E, BAER M.R, DAVEY F.R, BLOOMFIELD C.D, LARSON R.A, SCHIFFER C.A. Sequential multiagent chemotherapy is not superior to high-dose cytarabine alone as postremission intensification therapy for acute myeloid leukemia in adults under 60 years of age: Cancer and Leukemia Group B Study 9222. **Blood**. v.105, p.3420-3427, 2005.

MRÓZEK K, MARCUCCI G, NICOLET D, MAHARRY KS, BECKER H, WHITMAN SP, METZELER KH, SCHWIND S, WU YZ, KOHLSCHMIDT J. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. **Journal of Clinical Oncology** v.30, p.4515-4523, 2012.

NOMA C, MIYOSHI Y, TAGUSHI T, TAMAKI Y, NOGUSHI S. Association of p53 genetic polymorphism (arg72pro) with estrogen positive breast cancer risk in Japanese women. **Cancer Letter**. V.210, p.197-203, 2004.

OHAYON T, GERSHONI-BARUCH R, PAPA M.Z, MENACHEM D.T, BARZILAI E.S, The R72P P53 mutation is associated with familial breast cancer in Jewish women. **British Journal of Cancer**. v.92, p.1144-1148, 2005.

OLIVIER, HOLLSTEIN M, HAINAUT P. *TP53* Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.2, 2010.

OMAR ABDEL-WAHAB, JAY PATEL, ROSS L. LEVINE. Clinical Implications of Novels Mutations in Epigenetic Modifiers in AML. **Hematology/Oncology of Clinics of North America**. v.25, p.1119-1133, 2011.

PAGNANO K.B, TRAINA F, TAKAHASHI T, OLIVEIRA G.B, ROSSINI M.S, LORAND-METZE I, VIGORITO A.C, MIRANDA E.C, DE SOUZA C.A. Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience. **Sao Paulo Medical Journal**. v 1 p.118-173, 2000.

PAN C, ZHU G, YAN Z, ZHOU Y, LIU Z. Glutathione S-transferase T1 and M1 polymorphisms are associated with lung cancer risk in a gender-specific manner. **Prostate Cancer Prostatic Disease**. V.14, p.105-113, 2011.

PAOREZ G.I, BOSQUES-PADILHA F.J, CROSATTI M.L, TIJERINA-MENCHACA R, GONZALEZ E.G, Role of p53 codon 72 polymorphism in the risk of development of distal gastric cancer. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. V.40, p.56-60, 2005.

PETERSDORF S.H, RANKIN C, HEAD D.R, TEREBELO H.R, WILLMAN C.L, BALCERZAK S.P, KARNAD A.B, DAKHIL S.R, APPELBAUM F.R. Phase II evaluation of an intensified induction therapy with standard daunomycin and cytarabine followed by high dose cytarabine for adults with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study (SWOG-9500). **American Journal of Hematology** v.82, p.1056-1062, 2007.

PRIYA MALIK AMANDA F CASHEN. Decitabine in the treatment of acute myeloid leukemia in elderly patients. **Cancer Management** v.6: p.53–61, 2014.

REGO MF, PINHEIRO GS, METZE K, LORAND-METZE. Acute leukemias in Piauí: comparison with features observed in other regions of Brazil. **Brazilian Journal of Medical Biology** v.36 p.331-337 2003.

RILEY, T., SONTAG, E., CHEN, P. & LEVINE, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nature Reviews**. v.9, p.402–412, 2008.

ROCKOVA V, ABBAS S, WOUTERS B.J, ERPELINCK C.A, BEVERLOO H.B, DELWEL R, VAN PUTTEN W.L, LÖWENBERG B, VALK P.J. Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. **Blood**, v.118, p.1069-1076, 2011.

ROSSINI A, RAPOZO AC, AMORIM LM, MACEDO JM, MEDINA R. Frequency of *gstt1*, *GSTM1* and *GSTP1* polymorphisms in brazilian population. **Genetics and Molecular Research**. V.1, p.233-240, 2002.

ROTUNNO M, LAM T.K, VOGT A, BERTAZZI P.A, LUBIN J.H, CAPORASO N.E, LANDI M.T. *GSTM1* and *GSTT1* Copy Numbers and mRNA Expression in Lung Cancer. **Molecular Carcinogenesis**. V.51, p.142-150, 2012.

SAKIYAMA T, KOHNO T, MIMAKI S, OHTA T, YANAGITANI N, SOBUE T, KUNITOH H, SAITO R, SHIMIZU K, HIRAMA C, KIMURA J, MAENO G, HIROSE H, EGUCHI T, SAITO D, OHKI M, YOKOTA J. Association of amino acid substitution polymorphisms in DNA repair genes TP53, POL1, REV1 and LIG4 with lung cancer risk. **International Journal of Cancer**. v.114, p.730-737, 2004.

SCARDOCCI, A; GUIDI, F; D'ALO, F; GUMIERO D; FABIAN, E; Reduced BRCA1 Expression Due to Promoter Hypermethylation in Therapy-related Acute Myeloid Leukemia. **British Journal of Cancer** v95, p1108–1113, 2006.

SCHOOFS T, MULDER-TIDOW C. DNA Methylation as a Pathogenic Event and as a Therapeutic Target in AML. **Cancer Treatment Reviews**. v.37, p.S13-S18, 2011.

SCHOOFS T, BERDEL W.E, MÜLLER-TIDOW C. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. **Leukemia**. v1, p1-14, 2014.

SERGEANTANIS TN¹, ECONOMOPOULOS KP. *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Research Treatment** v.121, p.195-202, 2010.

SHEEHAN D, MEADE G, FOLEY VM, DOWD CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemistry Journal**. v.360, p.1– 16, 2001.

SIDDIQUE M.M, BALRAM C, FISZER L, TAN A, TAN P, SOO K.C, SABAPATHY K. Evidence for selective expression. Of the p53 codon 72 polymorphs: implications in cancer development. **Cancer Epidemiology Biomarkers**. V.14, p.2245-2252, 2005.

STOREY A, THOMAS M, KALITA A, HARWOOD C, GARDIOL D, MANTOVANI F, BREUER J, LEIGH I.M, MATLASHEWSKI G, BANKS L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. **Nature**, v.393, p.229-234, 1998.

STOSIC I, GRUJICIC D, ARSENIJEVIC S, BRKIC M, MILOSEVIC-DJORDJEVIC O. Glutathione S-transferase T1 and M1 polymorphisms and risk of uterine cervical lesions in women from central Serbia. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. V.15, p.3201-3205, 2014.

TAKESHITA K, SUETAKE I, YAMASHITA E, SUGA M, NARITA H, NAKAGAWA A, TAJIMA S. Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1). **PNAS**, v.108, p.9055–9059, 2011.

THOMAS M, KALITA A, LABRECQUE S, PIM D, BANKS L, MATLASHEWSKI G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Molecular and Cellular Biology**. v19, p.1092-100, 1999.

VANINETTI N.M, GELDENHUYS L, PORTER G.A, RISCH H, HAINAUT P, GUERNSEY D.L, CASSON A.G. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and p53 mutations in the molecular pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. **Molecular Carcinogenesis** v.47, p275–285, 2008.

VARDIMAN JW, THIELE J, ARBER DA, BRUNNING RD, BOROWITZ MJ, PORWIT A, HARRIS NL, LE BEAU MM, HELLSTRÖM-LINDBERG E E TEFFERI A. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood** v.114 p.937-951, 2009.

VELLOSO E.D.R.P, MOTTA C.H.A.S, FURTADO J.B, BACAL N.S, SILVEIRA P.A.A, MOYSES C.B, SITNIK R E PINHO J.R.R. Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies. **Einstein** v9, p184-189, 2011.

VOUSDEN K.H, LANE D.P. p53 in health and disease. **Nature Reviews Molecular and Cellular Biology**. v8, p275–283, 2007.

WANG Y, KRISTENSEN G.B, BØRRESEN-DALE A.L, HELLAND A. TP53 mutations and codon 72 genotype—impact on survival among ovarian cancer patients. **Annals of Oncology**. v.18, p.964-966, 2007.

WHIBLEY C, PHAROAH P.D.P, HOLLSTEIN A. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nature Reviews Cancer**. V.9, P.95-107. 2009.

www.p53.iarc.fr. Acessado no dia 11/11/2014.

Y.M. Zi¹, S. Wu¹, D. Ma, C. Yang, M. Yang, Y. Huang and S.J. Yang. Association of GSTT1 and GSTM1 variants with acute myeloid leukemia risk. **Genetic and Molecular Research**. V.9, 3681-5, 2014.

YALIN S, HATUNGIL R, TAMER L, ARAS ATES N, DOGRUER N, YILDIRIM H, KARAKAS S, ATIK U Glutathione S-transferase gene polymorphisms in Turkish patients with diabetes mellitus. **Cell Biochemistry and Functions** v.25, p.509–513, 2007.

YANG F, XIONG J, JIA X-E, GU Z-H, SHI J-Y, et al. (2014) GSTT1 Deletion Is Related to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Induced DNA Damage and Lymphoma Progression. **PLoS ONE**. V.9, 2014.

YOSHIDA K, MIKI Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Science**. V.95, p.866-71, 2004.

ZHONG SL, ZHOU SF, CHEN X, CHAN SY, CHAN E, NG KY, DUAN W, HUANG M. Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferases M1 and P1 in Chinese. **European Journal of Pharmacology Science** v.28, p.65-77, 2006.

ZHU Z.Z, CONG W.M, LEU S.F, XIAN Z.H, WU W.Q, WU M.C, GAO B, HOU L.F, ZHU G.S. A p53 polymorphism modifies the risk of hepatocellular carcinoma among non-carriers but not carriers of chronic hepatitis B virus infection. **Cancer letters**. V.229, p.77-83, 2005.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Investigar a influência de polimorfismos nos genes *TP53*, *GSTT1*, *GSTM1* e hipermetilação do *BRCA1* na susceptibilidade ao desenvolvimento da leucemia mielóide aguda, bem como sua relação com características clínico-laboratoriais e prognóstico dos pacientes.

4.2 ESPECÍFICOS

- Genotipar pacientes com LMA e controles saudáveis para o polimorfismo *TP53* R72P e deleções nos genes *GSTT1* e *GSTM1*;
- Avaliar o status de metilação no gene *BRCA1* em pacientes com LMA;
- Avaliar a correlação entre dados clínico-laboratoriais e de sobrevida dos pacientes com alterações dos genes estudados;
- Analisar o impacto dessas alterações na susceptibilidade à LMA e no seu prognóstico.

5 ARTIGO 1

TP53, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms impact on adult acute myeloid leukemia susceptibility and clinical outcome in a Brazilian population

Matheus Filgueira Bezerra¹, Aleide Santos de Melo Lima², Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento¹, Diego Pereira Martins², Cintia Renata Costa Rocha¹, Cintia Faria Gonsalves Machado³, Antonio Roberto Lucena de Araujo², Marcos André Cavalcanti Bezerra², Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,4}

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, UFPE, Recife, PE – Brazil
2. Departamento de Genética, UFPE, Recife, PE – Brazil
3. Fundação HEMOPE, Recife, PE – Brazil
4. Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife, PE – Brazil

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a multifactorial heterogeneous disease. Genetic *de novo* abnormalities commonly found in AML are caused mainly by DNA damaging agents, such as benzene, ionizing radiation and chemotherapy, and failure in DNA repair systems. Arising data from last decade suggests that genetic polymorphisms on phase II metabolism enzymes, such as glutathione-S-transferases, and DNA repair/cell cycle, such as TP53, may be involved in leukemogenesis. This study investigated the association between *TP53* codon 72, *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms with AML, clinical-laboratorial aspects of disease and polymorphisms influence on patient outcome. 223 AML adult patients and 202 health adult individuals (controls) were genotyped for *TP53* R72P and *GSTT1*, *GSTM1* deletions. For *TP53* R72P, AML patients genotype frequencies were 33.6% (75) ARG/ARG, 44.4% (99) ARG/PRO and 22% (49) PRO/PRO while in controls were 38.3% (78) ARG/ARG, 48.5 (98) ARG/PRO and 12.8% (26) PRO/PRO. Proline allele (PRO) was associated with AML occurrence both in recessive ($p=0.0198$) co-dominant ($p=0.0291$) and allelic ($p=0.0438$) genetic models. *GSTT1**0 polymorphism was observed in 23.3% (52) of patients and in 27.7% (56) of controls ($p=0,297$). *GSTM1**0 polymorphism was observed in 45.5% (101) of patients and in 42.6% (86) of controls ($p=0,573$). The co-occurrence of

*GSTT1**0 and *GSTM1**0 was observed in 11.7% (26) cases and in 8.4% (17) controls ($p=0.286$). No association between AML GST genes was observed. Despite, *GSTM1**0/*GSTT1**0 patients showed a borderline association with a higher complete remission achievement ($p=0.062$) and overall survival ($p=0.093$).

INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is a very heterogeneous disease, not only in its clinical features, but also in biological aspects. A high number of somatic mutations and cytogenetic alterations had been recurrently observed in AML patients (BURNETT *et al.*, 2011). The acquisition of such abnormalities is attributed mainly to exposure to DNA damaging agents, such as benzene, ionizing radiation and chemotherapy. In addition to environmental influence, recent studies have demonstrated that genetics variations on drug metabolizing enzymes, DNA repair and anti-apoptotic mechanisms seems to influence AML susceptibility (ZIL, 2014).

The tumor suppressor gene *TP53* plays a major role in DNA integrity, cell cycle regulation and apoptosis. The TP53 protein can act as a transcription factor for more than 100 genes or interact directly with other protein, such as BCL-2 to start apoptosis process. To date, R72P is the known *TP53* polymorphism with the most expressive impact on protein function. The change of a guanine to cytosine on the second position of codon 72, éxon 4, results in amino acid change from arginine to proline, on the proline-rich-domain, reducing TP53 apoptosis induction activity (DUMONT, 2003). Glutathione-S-transferase M1 (*GSTM1*) and glutathione-S-transferase T1 (*GSTT1*) are members of a superfamily of phase II detoxification enzymes and catalyzes the conjugation of glutathione to toxic electrophilic radicals, turning them into less toxic and more water soluble compounds. The more impacting polymorphisms described in *GSTT1* and *GSTM1* are gene deletions. Homozygotes individuals for the null allele (*GSTT1**0 and *GSTM1**0) loses completely enzyme expression, and as consequence, they have a reduced capacity to eliminate toxic radicals (ZHONG, 2006).

Although *TP53* Proline allele (PRO), *GSTT1**0 and *GSTM1**0 seems to be associated with many types of solid tumors, such as colorectal, breast and lung (PAOREZ, 2005; STOSIC, 2014), its role in leukemogenesis remains uncertain.

In this context, this study aimed to evaluate, in the first place, the possible association between *TP53* R72P, *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms with AML. Then, we analyzed the correlation between these polymorphisms with clinical-laboratorial aspects of AML patients and its influence on patient outcome.

METHODS

Patients

Two hundred twenty three patients with adult acute myeloid leukemia (AML) diagnosed between 2010 and 2014 in Fundação HEMOPE, Recife – Brazil were evaluated. Diagnosis and classification of AML patients were based on morphological, immunophenotyping, cytochemical and cytogenetic features, according to OMS or FAB classification (VARDIMAN, 2009). Patient's clinical details were retrieved from their medical records. The participation of all the patients was voluntary and informed consent was obtained. Treatment consisted of two courses of induction therapy with Ara-C 100 mg/m²/day administered as a continuous 7-day infusion plus daunorubicin 60 mg/m²/day administered as a 1-hour infusion on each of the first 3 days of treatment. For the patients who achieved a complete remission (CR) after induction, post-remission therapy consisted of two to three courses of consolidation with mitoxantrone 10 mg/m²/day, days 1–5, and cytarabine 1 mg/m² every 12 h, days 1–3. For clinical outcome and disease features analysis, all patients with acute promyelocytic leukemia, secondary AML, transferred to another hospital or treated with other than the standard 3+7 induction chemotherapy described above were excluded.

Controls

Peripheral blood samples of two hundred two individuals, from the same demographic area from patients, were obtained. Inclusion criteria for control group were be a healthy blood donors or hospital patients without any cancer history and not related to AML patients.

DNA extraction and polymorphism analysis

DNA was obtained from bone marrow or peripheral blood leucocytes using the phenol-chloroform method (SAMALLA, 1993). All PCR reactions were performed

using GoTaq® Green Master Mix (Promega) in a 12.5 PCR mix, following the manufacturer's instructions. In Table 1 PCR conditions and primers sequences are listed.

Table 1. Primers sequences and PCR conditions for polymorphisms analysis.

Gene	Primer sequence	Annealing temp.	PCR cycles
<i>TP53</i> exon 4	Fw: 5'-TGCTCTTTTCACCCATCTAC-3'	56	35
	Rv: 5'-ATACGGCCAGGCATTGAAGT-3'		
<i>GSTT1</i>	Fw: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'	55	30
	Rv: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'		
<i>GSTM1</i>	Fw: 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'	55	30
	Rv: 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'		

The 353bp amplified product was then digested with Bstul (New England Biolabs), cleaving the R72 (ARG) allele into two smaller fragments (214bp and 139bp), while the P72 allele (PRO) remains uncleaved. Heterozygous patients presented both cleaved and uncleaved fragments. For *GSTT1* and *GSTM1* deletions, a duplex PCR was performed. The presence or absence of amplification products of *GSTT1* (480bp) and *GSTM1* (215bp) indicate, respectively, positive or null gene. Another reaction was performed for b-actin gene as a sample quality control. PCR and digestion products were visualized in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

Statistical analysis

As patients ages had not a normal distribution, Mann-Whitney test was used to compare ages between patients and controls. For comparison between case and control groups, double sided Chi-square test was performed. For R72P polymorphism, five genetic models were applied: allele frequency, co-dominant, dominant, recessive and over-dominant. For *GSTT1* and *GSTM1*, patients were grouped into normal or null genotype. 107 patients were included in clinical-laboratorial features and patient outcome analysis. Among AML patients, the evaluated variables were: hiperleucocytosis (>50.000 leucocytes/uL), age (grouped into >60 or <60), Medical Research Council (MRC) risk stratification, *NPM1* and *FLT3*-ITD mutations, FAB classification, early death (ED), complete remission achievement (CR), overall survival

(OS) and disease free survival (DFS). OS was defined as the time from the initiation of induction therapy to death from any cause; those alive or lost to follow-up were censored at the date they were last known alive. DFS was defined as the time from complete remission to disease relapse, development of a secondary malignancy, or death from any cause. OS and DFS were calculated using the Kaplan-Meier method. Log-rank test was used for comparisons of Kaplan-Meier curves.

Ethical aspects

The project was approved by the local ethical committee and all subjects involved gave their permission to use biological material in the research.

RESULTS

AML susceptibility

The mean and median ages were, respectively, 48.5 and 47 for cases and 53.5 and 53.4 for controls. There was no statistically significant difference between the ages of the cases and controls ($p>0.05$).

Two hundred and twenty three AML patients and 202 controls were genotyped for *TP53* R72P and *GSTT1*, *GSTM1* deletions. *GSTT1**0 was observed in 23.3% (52) of patients and in 27.7% (56) of controls. *GSTM1**0 was observed in 45.5% (101) cases and in 42.6% (86) controls. The co-occurrence of *GSTT1**0 and *GSTM1**0 was observed in 11.7% (26) of patients and in 8.4% (17) of controls. *GSTT1**0, *GSTM1**0 and *GSTT1**0/*GSTM1**0 showed no association with AML (Table 3).

Table 2. *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms frequencies in AML and healthy controls.

	Cases (n=223)	Controls (n=202)	P value (C.I=95%)
<i>GSTT1</i>			
Null	52 (23.3%)	56 (27.7%)	$p=0,297$
Present	171 (76.7%)	146 (72.3%)	
<i>GSTM1</i>			
Null	101 (45.5%)	86 (42.6%)	$p=0,573$
Present	122 (54.5%)	116 (57.6%)	
<i>GSTT1/M1</i>			
Double null	26 (11.7%)	17 (8.4%)	$p=0.286$
Others	197 (88.3%)	185 (91.6%)	

For *TP53* R72P, patients genotype frequencies were 33.6% (75) ARG/ARG, 44.4% (99) ARG/PRO and 22% (49) PRO/PRO while in controls genotype frequencies were 38.3% (78) ARG/ARG, 48.5 (98) ARG/PRO and 12.8% (26) PRO/PRO. Both groups (patients, $p=0.1359$ and controls, $p=0.778$) were in Hardy–Weinberg equilibrium, suggesting that there was no sample bias. Proline allele (PRO) was associated with AML occurrence both in recessive, co-dominant and allelic genetic models (Table 3). As the recessive model had the strongest association ($p=0.0198$, OR=1.91), clinical-laboratorial and outcome results were analyzed by comparing PRO/PRO against other genotypes.

Table 3. *TP53* R72P association with AML incidence

<i>TP53</i> Allele	Case	Control	OR (CI 95%)	<i>p</i> value
ARG	249 (0.56)	254 (0.63)	Ref.	
PRO	197 (0.44)	150 (0.37)	1.34 (1.02 - 1.76)	0.0438*
Codominant				
ARG/ARG	75 (0.34)	78 (0.39)	Ref.	0.0475*
ARG/PRO	99 (0.44)	98 (0.49)	1.05 (0.69 - 1.6)	0.9034
PRO/PRO	49 (0.22)	26 (0.13)	1.96 (1.11 - 3.47)	0.0291*
Dominant				
ARG/ARG	75 (0.34)	78 (0.39)	Ref.	
ARG/PRO + PRO/PRO	148 (0.66)	124 (0.61)	1.24 (0.83 - 1.85)	0.3334
Recessive				
ARG/ARG + ARG/PRO	174 (0.78)	176 (0.87)	Ref.	
PRO/PRO	49 (0.22)	26 (0.13)	1.91 (1.13 - 3.21)	0.0198*
Overdominant				
ARG/ARG + PRO/PRO	124 (0.56)	104 (0.51)	Ref.	
ARG/PRO	99 (0.44)	98 (0.49)	0.85 (0.58 - 1.24)	0.4513

***TP53* and *GSTT1/M1* genotype versus clinical-laboratorial features and clinical outcome**

Among the 107 patients eligible for clinical-laboratorial features and outcome analysis, 62 (58%) achieved CR and 12 (11%) suffered ED. Four patients could not be tested for *TP53* and five for *GSTT1/M1*. No association was found between *TP53* or

GSTT1/M1 polymorphisms with the following characteristics: complete remission achievement, early death, age at diagnoses, FAB subtype, *FLT3*-ITD and *NPM1* mutations, MRC risk group and hyperleucocytosis (Table 4).

Median overall survival and disease free survival were, respectively, 263 and 668 days. PRO/PRO patients had a higher estimated median OS and estimated DFS than others genotypes: 408d vs 230d and 1077d vs 1067d, respectively (Figure 1). However, the difference was not statistically significant ($p=0.191$ and $p=0.675$). We also divided patients into three group based on MRC risk stratification (adverse, intermediary I + intermediary II, and favorable) and tested R72P impact on OS and DFS inside of each group, but no significant result was found (data no shown).

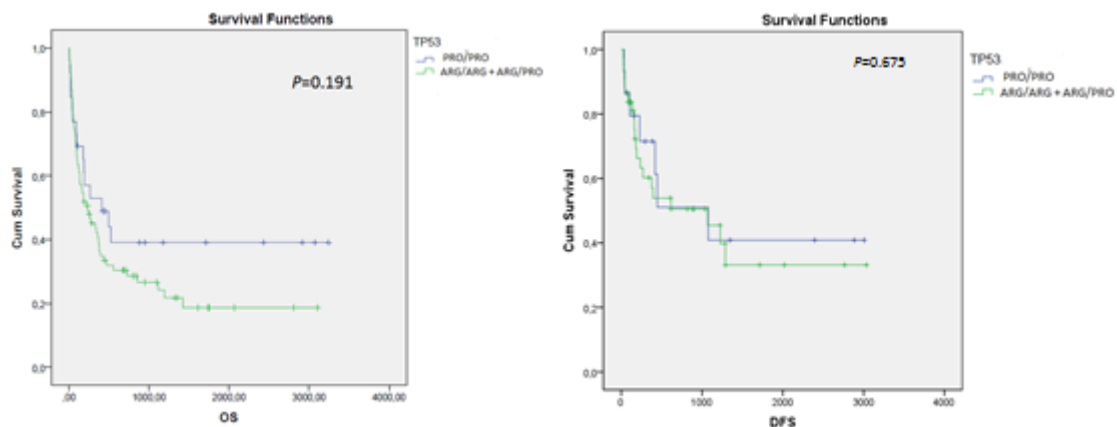


Figure 1. Overall survival (a) and disease-free survival (b) of *TP53* genotypes in patients.

Patients with wildtype *GSTT1* had 230d and 615d of estimated median OS and DFS, respectively, while the *GSTT1**0 ones had 329d and 1225d of OS and DFS, respectively. *GSTM1* wildtype patients had 164d and 1280d, while *GSTM1**0 had 356d and 392d. No significant difference was observed for *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms. Surprisingly, *GSTT1**0/*GSTM1**0 patients had an increase in OS, but it was not significant (Figure 2).

Table 4. *TP53*, *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms versus clinical-laboratorial features.

	<i>TP53</i> (PRO/PRO vs others)	<i>p</i> value	<i>GSTT1</i> (null vs others)	<i>p</i> value	<i>GSTM1</i> (null vs others)	<i>p</i> value	<i>T1/M1</i> (null vs others)	<i>p</i> value
CR								
yes	15/43	<i>p</i> =1.00	16/41	<i>p</i> =0.822	26/31	<i>p</i> =0.320	10/47	<i>p</i> =0.062
no	11/34		11/34		16/29		2/43	
ED								
yes	4/8	<i>p</i> =0.493	2/10	<i>p</i> =0.509	6/6	<i>p</i> =0.545	1/11	<i>p</i> =1.00
no	22/69		25/60		36/54		11/79	
FAB								
M0	7/12	<i>p</i> =1.00	5/13	<i>p</i> =0.181	4/14	<i>p</i> =0.524	1/17	<i>p</i> =0.616
M1	5/7		6/7		4/9		2/11	
M2	7/26		7/25		15/17		4/28	
M4	6/23		4/25		15/14		3/26	
M5	1/5		3/2		2/3		¼	
M6	0/3		1/2		½		0/3	
M7	0/2		1/1		1/1		1/1	
MRC								
Favorable	7/22		7/21	<i>p</i> =0.987	13/15	<i>p</i> =0.571	4/24	<i>p</i> =0.804
Inter. I and II	7/28		8/26		16/18		5/29	
unfavorable	4/9		3/10		4/9		1/12	
WBC								
>50	13/30	<i>p</i> =0.367	9/34	<i>p</i> =0.363	16/27	<i>p</i> =0.541	2/41	<i>p</i> =0.066
<50	13/46		18/40		26/32		10/48	
<i>NPM1</i>								
Mutated	5/21	<i>p</i> =0.602	6/19	<i>p</i> =1.00	7/18	<i>p</i> =0.162	2/23	<i>p</i> =0.725
Non-mutated	21/56		21/56		35/42		10/67	
<i>FLT3-ITD</i>								
Mutated	5/17	<i>p</i> =1.00	6/16	<i>p</i> =1.00	10/12	<i>p</i> =0.807	3/19	<i>p</i> =0.718
Non-mutated	21/60		21/59		32/48		9/71	
AGE								
>60	2/11	<i>p</i> =0.508	4/9	<i>p</i> =0.741	6/7	<i>p</i> =0.767	2/11	<i>p</i> =0.649
<60	24/66		23/66		36/53		10/79	

CR= complete remission; ED= early death; WBC= white blood cells

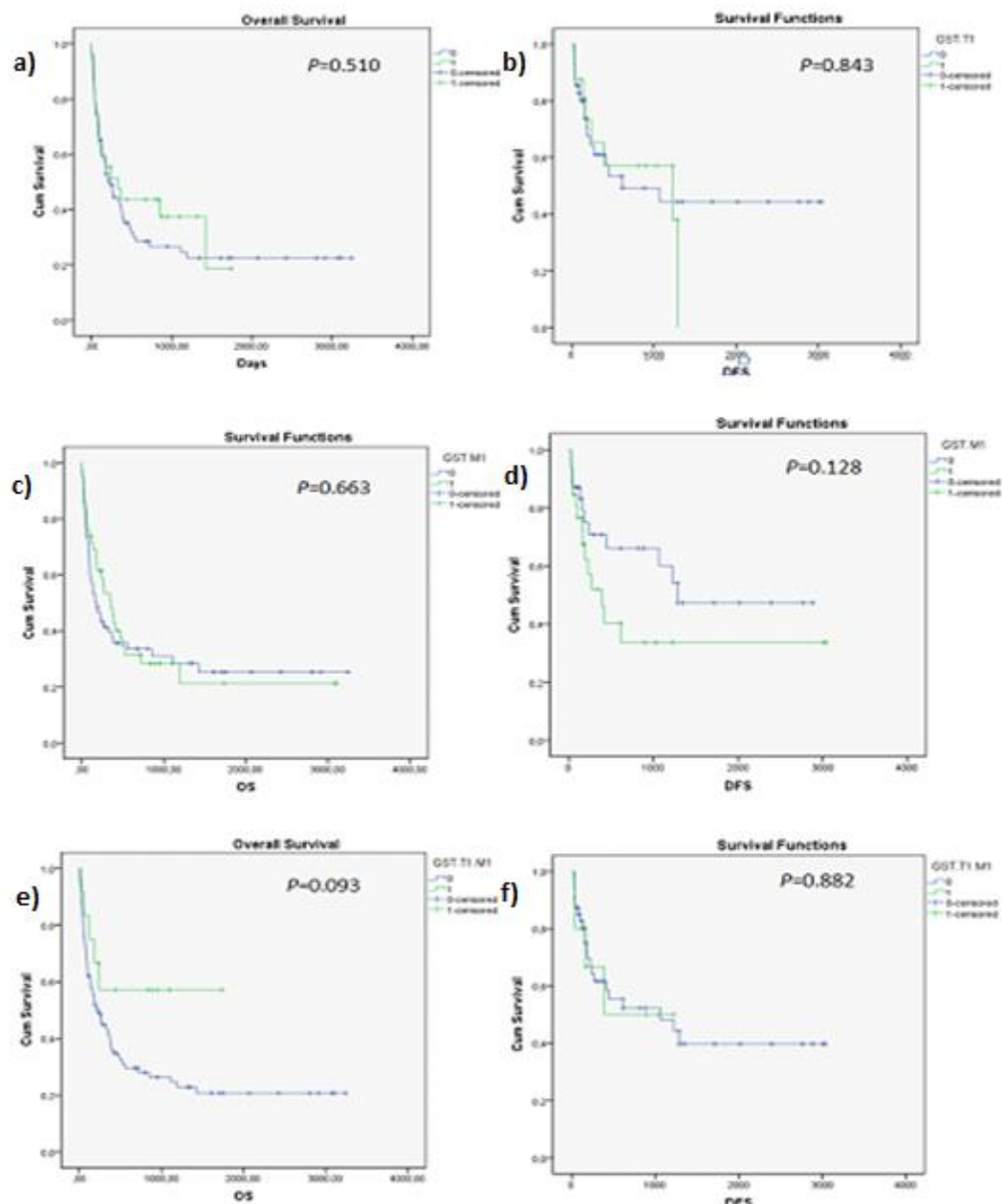


Figure 2. Overall survival and disease-free survival from AML grouped by *GSTT1* (a,b) *GSTM1* (c,d) and *GSTT1/GSTM1* genotypes.

DISCUSSION

Although *TP53* R72P has been widely investigated in human cancer, there are not yet enough data in AML to clarify consistently its role in leukemogenesis (CAHUAN, 2011). As far as we know, this is the first study to evaluated *TP53* R72P polymorphism influence on AML susceptibility in a south American population and one of the biggest case-control studies in the matter.

TP53 R72P was associated with AML susceptibility in three different genetic models. As the association of heterozygous genotype (ARG/PRO) was not significant in co-dominant model, current results suggest that the polymorphism needs to occur in homozygosis to exercises effect on leukemogenesis (recessive model).

Cahuan, 2011, using similar patient inclusion criteria of our study, but a smaller number of patients, found no association between polymorphism and AML occurrence in Indian population. This conflicting result may be explained by the expressive variation on *TP53* polymorphism frequency among different populations over the world. Xiong, 2009, and Danasouri, 2014, found a higher frequency of Proline allele on AML in a Chinese and Egyptian population, respectively. But in both cases, results were statistically significant only when associated with *MDM2*, a *TP53* regulator, polymorphism (SNP309). In contrast, Ellis, 2008, found, in a mixed English-North American population, that the combination of *TP53* Arginine allele and *MDM2* polymorphisms was significantly more frequent in therapy-related AML cases.

As genetic polymorphisms has less evident effect on phenotype than other genetic or environmental risk factors, bias in population studies may change considerably results. A recent meta-analysis including nine studies found no association between leukemia and *TP53* polymorphism, but it pooled lymphoid/myeloid and acute/chronic leukemias in the same analysis (WENG, 2012).

Individuals homozygous for Proline allele presented not only an increased risk for developing cancer in general but also seem to have a poorer outcome (CATTELANI, 2012; WANG, 2007; KATKOORI, 2014). In hematologic tumours, however, this relation is not clear yet (AMID, 2014). Arginine allele had a negative impact on chronic lymphocytic leukemia (MAJID, 2011) and multiple myeloma (ATTORI, 2014) and a positive outcome in adult T-cell leukemia/lymphoma (TAKEUCHI, 2005). In AML, there is a poor data available. Amid et al, 2014, found in a 48 AML patients cohort that patients homozygous for Proline had a worst overall survival. Here we present an interesting result: although there was no statistical significance, Proline/Proline patients had a longer overall survival.

As *GSTT1* and *GSTM1* are important phase II detoxification enzymes, we hypothesized that an accumulation of toxic radicals in intracellular environment caused by GSTs genes homozygous deletions could enhance the probability to developing

AML. Besides, once daunorubicin and cytarabine are neutralized by GSTs, the polymorphisms could affect treatment response as well (XIAO, 2014).

In the present study, no association was found for *GSTT1*, *GSTM1* and combined genotypes deletions and AML development. Two studies showed association of both *GSTT1* and *GSTM1* deletions and AML in Asian population (DUNNA, 2013; ZI, 2014). In the other hand, three different studies, in an English, Indian and Portuguese populations study (BASU, 1997; CAHUAN, 2011; – LEMOS, 1999), failed to reveal any association between these polymorphisms and AML. Another Brazilian study found a significant result, but the evaluated population was from southeast, which has a different ethnic heritage from northeast population, evaluated in this study. (ARRUDA, 2001).

We found a borderline association of *GSTT1/GSTM1* deletion with complete remission achievement ($p=0.062$) and a higher overall survival ($p=0.093$). There is a heterogeneous data around GSTs polymorphism impact on outcome. While some authors describe association with a shorter DFS and OS (LEE, 2008, VOSO, 2002), others observed no difference among groups (AUTRUP, 2002; MOSSALAM, 2006; WEISS, 2006; XIAO, 2014).

Despite the higher amount of data available in GSTs polymorphisms in comparison to *TP53* in AML, the association still inconclusive and there is a need for more and larger case-control studies.

In conclusion, in Northeast Brazilian population, there is association between *TP53* polymorphism, but not *GSTT1* nor *GSTM1*, and adult AML occurrence. However, as studies in other populations relate both concordant and discordant results, genetics polymorphisms may be a low penetrance risk factor on leukemogenesis, and may be overlapped by other genetic and environmental factors.

REFERENCES

ABDEL HAMID T.M, SABER M.M, EL GAMMAL M.M, IBEAD G.T, ABOL A.O. Clinical impact of SNP of P53 genes pathway on the adult AML patients. **Hematology**, 2014.

ARRUDA VR, LIMA CSP, GRIGNOLI CRE, DE MELO MB, LORAND-METZE I, ALBERTO FL, SAAD STO, COSTA FF. Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) gene defects. **European Journal of Haematology**. v.66, p.383-388, 2001.

AUTRUP J.L, HOKLAND P, PEDERSEN L, AUTRUP H. Effect of glutathione S-transferases on the survival of patients with acute myeloid leukaemia. **European journal of pharmacology**. v.438, 2002.

BASU T, GALE R.E, LANGABEER S, LINCH D.C. Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) gene defect in myelodysplasia and acute myeloid Leukaemia. **The Lancet**. v349, 1997.

BURNETT AK, HILLS RK, MILLIGAN D, KJELDSSEN L, KELL J, RUSSELL NH, YIN JA, HUNTER A, GOLDSTONE AH, WHEATLEY K. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. **Journal of Clinical Oncology** v.29, p.369-377, 2011.

CATTELANI S, FERRARI-AMOROTTI G, CALABRETTA B. The p53 Codon 72 Pro/Pro Genotype Identifies Poor-Prognosis Neuroblastoma Patients: Correlation with Reduced Apoptosis and Enhanced Senescence by the p53-72P Isoform. **Neoplasia**. v.14, p.634-43, 2012.

CHAUHAN P.S, IHSAN R, YADAV D.S, MISHRA A.K, BHUSHAN B, SONI A, KAUSHAL M, DEVI T.R, SALUJA S, GUPTA D.K, MITTAL V, SAXENA S, KAPUR S. Association of Glutathione S-Transferase, EPHX, and p53 codon 72 Gene Polymorphisms with Adult Acute Myeloid Leukemia. **DNA And Cell Biology** v.30, p. 39–46, 2011.

DANASOURI E.N.M, . RAGAB S.H,. RASHEED M.A, EL-SADAANY Z.A., EL-FATTAH S.N.. *MDM2* and *P53* codon 72 polymorphisms in acute myeloid leukaemia. **European Journal of Cancer**. v.50, p.38, 2014.

DUMONT P, LEU J, PIETRA ACD, GEORGE DL, MURPHY M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nature Genetics** v.33,p.357–365,2003.

DUNNA NR, VURE S, SAILAJA K, SUREKHA D, RAGHUNADHARAO D, RAJAPPA S, VISHNUPRIYA S. Deletion of *GSTM1* and *T1* genes as a risk factor for development of acute leukemia. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v.14, p.2221-4, 2013.

ELLIS N.A, HUO D, YILDIZ O, WORRILLOW L.J, BANERJEE M, LE BEAU M.M, LARSON R.A, ALLAN J.M, ONEL K. *MDM2* SNP309 and *TP53* Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility. **Blood** v.112, p.741–749, 2008.

HATTORI Y, IKEDA Y, SUZUKI Y, ICHIKAWA D, MATSUSHITA M. Codon 72 polymorphism of *TP53* gene is a novel prognostic marker for therapy in multiple myeloma. **British Journal of Haematology**. v.165, p.722–740, 2014.

KATKOORI V.R, JIA X, SHANMUGAM C, *et al*. Prognostic Significance of p53 Codon 72 Polymorphism Differs with Race in Colorectal Adenocarcinoma **Clinical Cancer Research**; v.15, p.2406-2416, 2009.

LEE H.S, LEE J, HUR E, LEE M.J, et al. Clinical significance of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms in younger patients with acute myeloid leukemia of intermediate-risk cytogenetics. **Leukemia Research**, v.33, p. 426–433, 2009.

LEMOS M.C, CABRITA F.J, SILVA H.A, VIVAN M, PLACIDO F, REGATEIRO F.J. Genetic polymorphism of CYP2D6, *GSTM1* and *NAT2* and susceptibility to haematological neoplasias. **Carcinogenesis**, v.20, p.1225-1229, 1999.

MAJID A, RICHARDS T, DUSANJH P, KENNEDY B, MIAL F, GESK S, SIEBERT R, WAGNER S.D, DYER M.J.S. TP53 codon 72 polymorphism in patients with chronic lymphocytic leukaemia: identification of a subgroup with mutated IGHV genes and poor clinical outcome. **British Journal of Haematology**, v.153, p.529–540, 2011.

MOSSALLAM G.I, ABDEL HAMID T.M, SAMRA M.A. Glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms in adult acute myeloid leukemia; its impact on toxicity and response to chemotherapy. **Journal of Egyptian National Cancer Institute**. v.18, p.264-73, 2006.

PAOREZ G.I, BOSQUES-PADILHA F.J, CROSATTI M.L, TIJERINA-MENCHACA R, GONZALEZ E.G, Role of p53 codon 72 polymorphism in the risk of development of distal gastric cancer. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. V.40, p.56-60, 2005.

SMALLA K, CRESSWELL N, MENDONCA-HAGLER L.C, WOLTERS A, VAN ELSAS J.D. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification, **Journal of Applied Bacteriology**. V.74 p.78–85, 1993.

TAKEUCHI S, MATSUSHITA M, TSUKASAKI K, TAKEUCHI N, TOMONAGA M, KOMATSU N, IKEZOE T, UEHARA Y, KOEFFLER H.P. P53 codon 72 polymorphism is associated with disease progression in adult T-cell leukaemia/lymphoma. **British Journal of Haematology**, v.131, p.552–556, 2005.

VOSO M.T, HOHAUS S, GUIDI F, FABIANI E, D'ALO F, GRONER S, SPA D, DOEHNER K, LEONE G, DOEHNER H AND SCHLENK R.F. Prognostic role of glutathione S-transferase polymorphisms in acute myeloid leukemia. **Leukemia**. V.22, p1685–1691, 2008.

WANG Y, KRISTENSEN G.B, BØRRESEN-DALE A.L, HELLAND A. TP53 mutations and codon 72 genotype—impact on survival among ovarian cancer patients. **Annals of Oncology**. v.18, p.964-966, 2007.

WENG Y, LU L, YUAN G, GUO J, ZHANG Z, ET AL. p53 codon 72 polymorphism and Hematological Cancer Risk: An Update Meta-Analysis. **PLoS ONE** v.7, 2012.

WEISS J.R, KOPECKY K.J, GODWIN J, ANDERSON J, WILLMAN C.L, MOYSICH K.B, SLOVAK M.L, HOQUE A, AMBROSONE B. Glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1 and GSTA1) polymorphisms and outcomes after treatment for acute myeloid leukemia: pharmacogenetics in Southwest Oncology Group (SWOG) clinical trials. **Leukemia** v. 20, p.2169–2171, 2006.

XIAO Q, DENG D, LI H, YE F, HUANG L, ZHANG B *et al.*, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms predict treatment outcome for acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis **Annals of Hematology**. v.93, p1381–1390, 2014.

XIONG X, WANG M, WANG L, LIU J, ZHAO X, TIAN Z, WANG J. Risk of *MDM2* SNP309 alone or in combination with the *p53* codon 72 polymorphism in acute myeloid leukemia. **Leukemia Research** v.33, p.1454–1458, 2009.

ZHONG SL, ZHOU SF, CHEN X, CHAN SY, CHAN E, NG KY, DUAN W, HUANG M. Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferases M1 and P1 in Chinese. **European Journal of Pharmacology Science** v.28, p.65-77, 2006.

ZI Y.M., WU S, MA D, YANG C, YANG M, HUANG Y, YANG S.J. Association of GSTT1 and GSTM1 variants with acute myeloid leukemia risk. **Genetic and Molecular Research**. v.13, p.3681-3685, 2014.

6 ARTIGO 2

BRCA1 PROMOTER HYPERMETHYLATION IS NOT A COMMON EVENT IN *DE NOVO* ADULT ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Matheus Filgueira Bezerra¹, Aleide Santos de Melo Lima², Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento¹, Cintia Renata Costa Rocha^{1,4}, Cintia Faria Gonsalves Machado³, Antonio Roberto Lucena de Araujo², Marcos André Cavalcanti Bezerra², Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1, 4*}.

1 Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, UFPE, Recife, PE – Brazil; 2 Departamento de Genética, UFPE, Recife, PE – Brazil; 3 Fundação HEMOPE, Recife, PE – Brazil; 4 Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife, PE – Brazil.

* Correspondence to: Eduardo Beltrão. LIKA – UFPE. Av. Prof. moares Rego, s/n – CDU – Recife – PE. 50670-901. E-mail: ebeltrao@hotmail.com

SHORT COMMUNICATION

Acute myeloid leukemia is a heterogeneous and multicausal hematologic malignance and many genetic alterations seem to play key roles in leukemogenesis (SLUSH, 2014). Such alterations are not only recognized as important events in malignant transformation but also used as markers for prognosis and therapy decision. Among them, chromosomal abnormalities, such as t(8:21), t(15:17) and inv(16), can be highlighted due to its high prevalence and expressive clinical significance (DOHNER, 2010).

Although the cause of these *de novo* abnormalities still remain unclear, it is reasonable to hypothesize that failure of the homologous repair pathway (HRP), which repairs DNA double strands breaks, may be, at least, one of the contributing factors in malignance. In fact, Faconi anemia (FA) patients, who has a cumulative incidence of AML of 33% by the age of 40 years (AUERBACH, 2009), have inherited mutations in

HRP genes, such as *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* and *CHK2*. The high prevalence of AML in this group of patients is a strong evidence of the importance of HRP dysfunction in leukemogenesis (LONGERICH, 2014).

Despite its high prevalence in FA-related AML cases, HRP genes mutations are almost absent in *de novo* AML. Thus, another molecular mechanism than genetic mutations could affect HRP function and favors *de novo* leukemogenesis. DNA hypermethylation in the promoter region of tumor suppressor genes arises as an alternative way to down regulate anti-tumoral pathways in cancer. In AML, many tumor suppressor genes are found silenced due to promoter hypermethylation (SCHOOFS, 2014). In regard to the exposed, the aim of this study was to evaluate if *BRCA1* promoter hypermethylation occurs as an alternative HRP loss-of-function event in *de novo* AML.

Fifty-five patients from Recife, capital of Pernambuco State, Northeast Brazil, were diagnosed as *de novo* adult AML, according to morphological, immunophenotyping, cytochemical and cytogenetic features, and selected from Fundação HEMOPE (Hemathologic Centre of Pernambuco). DNA was obtained from bone marrow or peripheral blood leucocytes using phenol-chloroform method. Genomic DNA was treated with sodium bisulfite using EpiTech Bissulfite Kit[®] (Quiagen), according to the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed using Platinum Taq Polymerase[®] (Invitrogen) and *BRCA1* promoter methylation analysis was performed using nested methylation-specific PCR (MS-PCR) in the first place. The nested primer set (5'- GTATTTTGAGAGGTTGTTGTTTAG-3' and 5'-CTAAAAAACCCCACAACCT ATC-3') amplified both methylated and unmethylated DNA and was *BRCA1* specific, not amplifying its pseudogene (GRUSHKO, 2004). Whereas the second primer set was methylation-specific (methylated: 5'-TCGTGGTAACGGAAAAGCGC-3' and 5'-AAATCTCAACGAACTCACGCCG-3'; unmethylated: 5'-TTGGTTTTTGTGGT AATGGAAAAGTGT and 5'-CAAAAAATCTCAACAACTCACACCA-3'). Amplicon products were 75bp, for methylated and 86bp for unmethylated reactions. PCR products were visualized in a 1.5% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. For bisulfite direct sequencing, the nested primer set was used and sequencing reaction was performed using BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) and run into ABI 3500[®] capillary electrophoresis apparatus (Applied Biosystems). Positive control for

both MS-PCR and bisulfite sequencing was a random patient DNA sample, globally methylated with Sss1 CpG methyltransferase (New England Biolabs) and then treated with sodium bisulfite.

Patients' features are listed in Table 1. No patient was found hypermethylated in nested MS-PCR and this result was confirmed by direct bisulfite sequencing. Converted non-CpG cytosines ratio was 100%, showing that there was no bias in bisulfite treatment. CpGs sequencing showed no methylation (Figure 1).

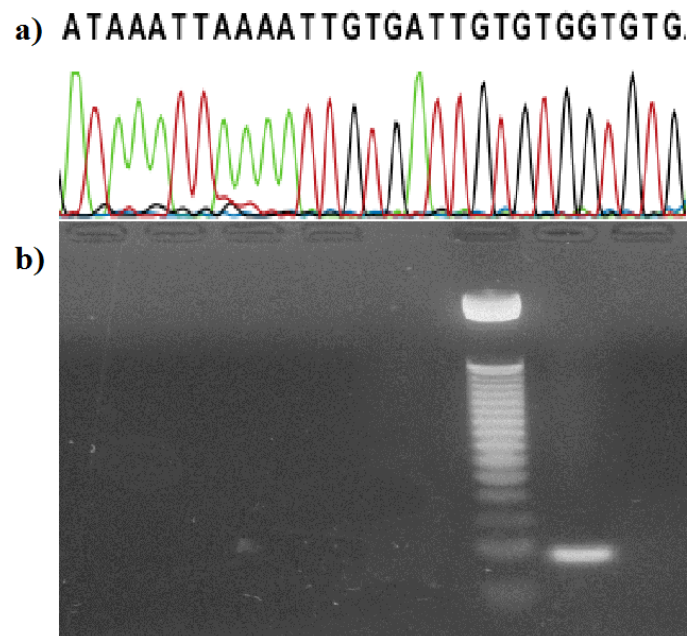


Figure 1. a) Unmethylated *BRCA1* from AML patient. Unmethylated cytosines after bisulfite treatment are converted into uracil, which is replaced by thymine in PCR (CG>TG). b) four negative patients for *BRCA1* MS-PCR, 50bp ladder, positive control and blank.

Xie *et al.*, 2000, observed reduced or absent HRP protein expression in AML cell lines and patient samples but they did not investigate if the reduction was caused by aberrant methylation. There is poor data concerning the theme. To date, only three other studies evaluated *BRCA1* hypermethylation in leukemia. Esteller *et al.*, 2002, using MS-PCR and Bianco *et al.*, 2000, using Southern blotting, found no methylated *BRCA1* in patients investigated. On the other hand, Sccardocci *et al.*, 2006, analyzing the same promoter region of Esteller *et al.*, 2002, and from our study, found that 32% of *de novo* AML and 75% of secondary AML patients were hypermethylated for *BRCA1*. As far as we know, no study was published in the field after 2006. Due to the conflicting results, we performed direct sequencing of *BRCA1* promoter and confirmed MS-PCR negative results.

As promoter methylation occurs in AML as a secondary event to somatic mutations in epigenetics regulatory genes, such as *DNMT3a* (SCHOOFS, 2014), the discordant results may not be explained by genetic heterogeneity among evaluated populations (Brazilian and Spanish versus Italian). Hence, the explanation could rely on MS-PCR bias, as false-positives are frequently found due to DNA damaging action of sodium bisulfite (WOJDACZ, 2008; AGGERHOLM, 1999).

In conclusion, although our results strongly indicate that *BRCA1* hypermethylation is not a common event in *de novo* adult AML, other homologous repair genes methylation and other epigenetic silencing mechanisms, such as histone deacetylation still is a potential explanation for HRP failure in AML and should be investigated in further studies.

Table 1. AML patients clinical-laboratorial features.

Age (median – range)	49.9 (17-83) years
Gender	
Male	47.3 (26)
Female	52.7% (29)
FAB¹ classification	
M0	11% (6)
M1	5.5% (3)
M2	27.3% (15)
M3	12.7% (7)
M4	29% (16)
M5	11% (6)
M6	3.5% (2)
M7	0%
Blasts in BM² (median-range)	70% (22-96%)
WBC³ (median-range)	44.000 (0.6-285 x 10 ³)
Hb⁴ (median-range)	7.5 (3.6-13.5 g/dL)
Platelets (median-range)	52.000 (8-651 x 10 ³)

1 – French-American-British; 2- Bone marrow ; 3- White blood cells ; 4 –Hemoglobin..

REFERENCES

AGGERHOLM A, GULDBERG P, HOKLAND M, HOKLAND P. Extensive Intra- and Interindividual Heterogeneity of p15INK4B Methylation in Acute Myeloid Leukemia, et al. **Cancer Research** v59, p436–441, 1999.

AUERBACH A.D. Fanconi Anemia and its Diagnosis. **Mutation Research**. v.668, p.4–10, 2009.

BIANCO T, CHINEVIX-TRENCH G, WALSH D.C.A, COOPER J.E, DOBROVIC A. Tumour-Specific Distribution Of *BRCA1* Promoter Region Methylation Supports A Pathogenetic Role In Breast And Ovarian Cancer. **Carcinogenesis** 21, 147-151, 2000.

DÖHNER, H.; ESTEY, E.H.; AMADORI, S.; APPELBAUM, F.R.; BÜCHNER, T.; BURNETT, A.K.; DOMBRET, H.; FENAUX, P.; GRIMWADE, D.; LARSON, R.A. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 115, p. 453-474, 2010.

ESTELLER M, CORN P.G, BAYLIN S.B, HERMAN J.G Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer **Cancer Research** 61, 3225–3229, 2001.

GRUSHKO T.A, DIGNAM S.D, BLACKWOOD A.M PEROU C.M, RIDDERSTRALE K.K, ANDERSON K.N, WEI M.J, ADAMS A.J, HAGOS F.G, SVEEN L, LYNCH H.T, WEBER B.L, OLOPADE O.I. MYC Is Amplified in BRCA1-Associated Breast Cancers **Clinical Cancer Research** 10, 499–507, 2004.

LONGERICH S, LI J, XIONG Y, SUNG P, KUPFER GM. Stress and DNA repair biology of the Fanconi anemia pathway. **Blood in press**, 2014.

SCARDOCCI, A; GUIDI, F; D'ALO, F; GUMIERO D; FABIAN, E; Reduced BRCA1 Expression Due to Promoter Hypermethylation in Therapy-related Acute Myeloid Leukemia **British Journal of Cancer** 95, 1108–1113, 2006.

SCHOOFS T, BERDEL W.E, MÜLLER-TIDOW C. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. **Leukemia**. 1, 1-14, 2014

SHLUSH, L.I.; ZANDI, S.; MITCHELL, A.; CHEN, W.C.; BRANDWEIN, J.M.; GUPTA, V. *et al.*: Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. **Nature**, v. 506, p. 328-333, 2014.

XIE Y, JOHAN P, WAISFISZ Q, NIEUWINT A.W.M,¹ SCHEPER R.J, ARWERT F, HOATLIN M.E, OSSENKOPPELE G.J, SCHUURHUIS, JOENJE H. Aberrant Fanconi anaemia protein profiles in acute myeloid leukaemia cells. **British Journal of Haematology**, v.111, p.1057-1064, 2000.

WOJDACZ T.K, LOTTE L, DOBROVIC A. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. **BMC Research Notes**. v.1, p.54, 2008.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que o polimorfismo R72P no *TP53* está relacionado a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento da LMA do adulto, ao tempo que deleções do *GSTT1* e *GSTM1* não apresentaram influência significativa. Nenhum dos polimorfismos avaliados mostrou ter impacto no sucesso terapêutico e no curso da doença. Os presentes resultados indicam que a hipermetilação do gene *BRCA1* não é um evento comum na LMA *de novo*.

8 PERSPECTIVAS

Considerando-se a grande quantidade de polimorfismos candidatos a marcadores de risco de desenvolvimento da LMA, a genotipagem de outros genes do metabolismo de radicais tóxicos e da via do *TP53* trará um retrato mais completo do papel de variações genéticas na susceptibilidade à LMA, visto que permitirá a avaliação do efeito acumulativo de múltiplos polimorfismos.

Apesar de termos observado a ausência de hipermetilação do *BRCA1* na LMA, as características fenotípicas das células leucêmicas ainda levam a crer que existe algum mecanismo de desregulação da via de reparo homólogo, se fazendo necessária a avaliação da metilação de DNA em outros genes da via, bem como a investigação de outros mecanismos epigenéticos de silenciamento gênico do *BRCA1*.