

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

FLÁVIO JOSÉ DA COSTA RAMOS

**Polimorfismos do gene *MTHFR* e suas relações com a leucemia mielóide  
aguda infantil**

RECIFE

2006

FLÁVIO JOSÉ DA COSTA RAMOS

**Polimorfismos do gene *MTHFR* e suas relações com a leucemia mielóide  
aguda infantil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neide Santos – Depto. Genética/UFPE

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Tereza Cartaxo Muniz – Depto. Bioquímica/UPE

RECIFE

2006

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Ramos, Flávio José da Costa.

Polimorfismos do gene MTHFR e suas relações com a leucemia mieloide aguda infantil. / Flávio José da Costa Ramos. – 2006.

67 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Neide Santos.

Coorientadora: Maria Tereza Cartaxo Muniz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2006.

Inclui referências.

1. LMA. 2. MTHFR. 3. Polimorfismo. 4. Folato. I. Santos, Neide. (Orient.). II. Muniz, Maria Tereza Cartaxo. III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-123

FLÁVIO JOSÉ DA COSTA RAMOS

**Polimorfismos do gene *MTHFR* e suas relações com a leucemia mielóide aguda infantil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em: 06/03/2006

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neide Santos (Orientadora)  
Depto. De Genética Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosilda dos Santos Silva (Examinador Interno)  
Depto. De Genética Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Ferraz Leal (Examinador Externo)  
Depto. De Genética Médica – IMIP/PE

---

Prof. Dr. Maria do Socorro Pombo de Oliveira (Examinador Externo)  
Divisão de Medicina Experimental – INCA/RJ

A meus pais, amigos, colegas, orientadoras e, principalmente, aos pacientes e familiares dedico este trabalho e esforço na sua realização.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus o fato de ter concretizado mais esta etapa da minha formação profissional.

Agradeço aos meus pais Marcos Germano da Silva Ramos (*in memoriam*) e Amara Fernandes da Costa Ramos pelos seus esforços na minha formação. Tenham a certeza de que nada foi em vão.

Agradeço a minha orientadora Neide Santos pelo apoio, incentivo, dedicação e, principalmente, por ter adotado esta ideia e embarcado nesta “viagem”. Meu reconhecimento e gratidão.

Agradeço as minhas orientadoras, amigas, mães, colegas de trabalho, Maria Tereza Cartaxo Muniz e Elizabete Malaquias Freitas as horas de ensinamentos, a confiança depositada na minha pessoa, seus esforços, incentivos, broncas, apoio, amizade, orientação... Enfim, agradeço a minha formação profissional desde a graduação, passando pelo mestrado e agora, em voos mais altos no desenvolvimento do meu doutorado. Muito obrigado por tudo! Nada foi em vão! Vamos continuar viajando juntos em busca de mais conhecimento, se Deus quiser, por muito tempo ainda!

Agradeço a Dr<sup>a</sup> Vera Lúcia Lins de Moraes, chefe da oncologia pediátrica do CEON-Pediatria/HUOC e equipe o apoio na condução deste trabalho como também o apoio na divulgação dos nossos trabalhos em congressos, apoio em viagens, seleção dos pacientes e auxílio na obtenção dos dados pertinentes a pesquisa.

Agradeço o apoio irrestrito do Instituto de Ciências Biológicas representado na pessoa da prof<sup>a</sup> Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti.

Agradeço o apoio do Centro Infantil Boldrini, em especial, à Dr<sup>a</sup> Marcela Araújo e ao Dr. Andres Yunes o apoio e participação neste projeto.

Agradeço a Dr<sup>a</sup> Maria do Socorro Pombo de Oliveira do Instituto Nacional de Câncer a oportunidade de expansão deste trabalho e de intercambio de resultados.

Agradeço aos meus mestres que tanto contribuíram na aquisição de conhecimentos ao longo desta jornada. Agradeço as sugestões e críticas que visaram melhorar nosso trabalho. Muito obrigado pela paciência e dedicação.

Agradeço aos meus colegas de mestrado não apenas pelos conhecimentos compartilhados, mas agradeço a companhia de todos, os momentos de “desespero”

e descontração ao longo das disciplinas, as discussões e momentos inesquecíveis que vivemos juntos. O meu saudoso agradecimento a todos.

Agradeço a colaboração da fantástica equipe do laboratório de Biologia Molecular do CEON-Pediatria/ICB/UPE. Obrigado pela paciência, apoio e incentivo. Obrigado a todos aqueles que contribuíram diretamente com este trabalho (Eliane, Silvana, Vanessa, Karina, Gabriela, Henrique, Andrezza) e, um agradecimento especial, para aqueles que além de bons colegas de trabalho são excelentes amigos e companheiros. Sou eternamente grato pelos momentos inesquecíveis passados com cada um de vocês. Sigam firmes e fortes nas suas caminhadas.

Agradeço aos membros do Departamento de Biologia do ICB/UPE, minha segunda casa, todo o apoio fornecido ao longo desta jornada.

Agradeço a colaboração por parte dos pais ou responsáveis pelos nossos pacientes por permitirem que seus filhos participem desta pesquisa, apesar do difícil momento vivido.

Agradeço o apoio da Pós-graduação em genética da UFPE o apoio e dedicação fornecidos ao longo desta jornada bem como contribuição financeira.

Agradeço a CAPES a bolsa de mestrado concedida.

Muito Obrigado!

## RESUMO

A leucemia é a neoplasia hematológica mais comum na criança, correspondendo a 30% dos casos de câncer pediátrico. A etiologia das leucemias, no homem, não está totalmente elucidada sendo provável uma interação gene-ambiente. Estudos epidemiológicos associam várias neoplasias ao folato. O folato é uma importante vitamina do complexo B e alterações nos seus níveis induzem o desenvolvimento de fatores de risco para o câncer, tais como rearranjos cromossômicos, hipometilação genômica e formação de micronúcleos. A enzima chave no metabolismo do folato é a metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), que converte irreversivelmente o 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF) a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF). Este estudo foi do tipo caso-controle onde se observou a influência dos polimorfismos C677T e A1298C no risco de desenvolvimento da leucemia mielóide aguda (LMA). Foram analisados 182 casos e 315 controles. Os resultados sugerem uma associação entre o genótipo 677CT na redução do risco de desenvolvimento de LMA em crianças não-brancas [OR, 0,37; IC 95%, 0,14-0,92] e a associação do genótipo 1298AC no aumento do risco de desenvolvimento da LMA [OR, 2,90; IC 95%, 1,26-6,71].

**Palavras-chave:** LMA, MTHFR, polimorfismo, folato.



## ABSTRACT

Leukemia is the more common hematology neoplasia in childhood, corresponding 30% of the cases of pediatric cancer. The etiology of the leukemia is not yet elucidated, being probable an interaction gene-environment. Epidemiological studies associate some kinds of cancer with folate. Folate is an important vitamin of the B complex and alterations in its levels induce the development risk factors for the cancer, such as chromosomic rearrangements, genomic hypomethylation and micronuclei formation. The enzyme key in the folate metabolism is methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), that converts the 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-MTHF) to 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF). This study it was a case-control, where indicated the influence of the polymorphisms C677T and A1298C for the risk of development of acute myeloid leukemia (AML). 182 cases and 315 controls had been analyzed. The results suggest an association for genotype 677CT in the reduction of the risk of development of AML in children non-whites [OR, 0,37; CI 95%, 0,14-0,92] and association of the 1298AC genotype in the increase of the development risk of AML [OR, 2,90; CI 95%, 1,26-6,71].

**Keywords:** AML, MTHFR, polymorphism, folate.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Visão geral da via metabólica do ácido fólico em humanos e a rota da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), timidilato sintase (TS), metionina sintase (MS), S-adenosil metionina (SAM), S-adenosil homocisteína (SAH), ácido dihidrofólico (DHF) e ácido tetrahidrofólico (THF). 19

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Características da amostra analisada.  | 41 |
| Tabela 2 – Distribuição dos genótipos da MTHFR, de acordo com a raça, em portadores de LMA e controles.                                 | 42 |
| Tabela 3 – Características dos pacientes e controles investigados para o polimorfismo A2756G da MS.                                     | 46 |
| Tabela 4 – Frequência dos alelos para o polimorfismo do loco A2756G da MS em pacientes com LLA e controles.                             | 47 |
| Tabela 5 – Prevalências dos genótipos do loco MS A2756 em pacientes com LLA e indivíduos saudáveis.                                     | 48 |
| Tabela 6 – Susceptibilidade do homocigoto MS 2756GG ao desenvolvimento de LLA, em relação aos demais genótipos.                         | 48 |
| Tabela 7 – Frequências alélicas para os polimorfismos C677T e A1298C em portadores de LMA e controles de acordo com a região de origem. | 50 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|       |   |
|-------|---|
| A     | Adenina   |
| C     | Citosina  |
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CEONP | Centro de Oncologia Pediátrica                              |
| cDNA  | <i>Complementar Desoxyribonucleic Acid</i>                  |
| DFH   | Dihidrofolato   |
| DNA   | <i>Desoxiribonucleic Acid</i>                               |
| dNTP  | Dinucleotideo Trifosfatado                                  |
| dTMP  | Timidina monofosfato  |
| dUMP  | Uridina monofosfato   |
| G     | Guanina   |
| Hcy   | Homocisteína  |
| HUOC  | Hospital Universitário Oswaldo Cruz                         |
| IC    | Intervalo de confiança                                      |
| INCA  | Instituto Nacional de Câncer                                |
| Kb    | Kilo bases (mil pares de bases)                             |
| MS    | Metionina sintase   |
| MTHFR | Metilenotetrahidrofolato redutase                           |
| NaCl  | Cloreto de sódio  |
| OR    | <i>Odds ratio</i>   |
| Pb    | Pares de Bases  |
| PCR   | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                            |
| RFLP  | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>             |
| RNA   | <i>Ribonucleic Acid</i>                                     |
| SAM   | S-adenosil metionina  |
| SAH   | S-adenosil homocisteína                                     |
| T     | Timina  |
| Taq   | <i>Thermophylus aquaticus</i>                               |
| TBE   | Tris-borato-EDTA  |
| THF   | Tetrahidrofolato  |
| TS    | Timidilato sintase  |
| UFPE  | Universidade Federal de Pernambuco                          |
| UPE   | Universidade de Pernambuco                                  |
| UTR   | <i>Untranslated Region</i>                                  |
| UV    | Ultra-violeta   |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                       | <b>14</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DA LITERATURA</b>                            | <b>16</b> |
| 2.1      | Leucemias: Aspectos gerais                              | 16        |
| 2.1.1    | <i>Principais leucemias infantis</i>                    | 17        |
| 2.2      | Papel do ácido fólico no metabolismo                    | 18        |
| 2.3      | Polimorfismos da MTHFR                                  | 21        |
| 2.4      | Polimorfismo da MS                                      | 23        |
| <b>3</b> | <b>REFERÊNCIAS</b>                                      | <b>24</b> |
| <b>4</b> | <b>MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO</b>                  | <b>34</b> |
| 4.1      | Abstract  | 35        |
| 4.2      | Introdução  | 35        |
| 4.3      | Materiais e Métodos                                     | 36        |
| 4.3.1    | <i>População do estudo</i>                              | 36        |
| 4.3.2    | <i>Aspectos éticos</i>                                  | 36        |
| 4.3.3    | <i>Coleta de material biológico</i>                     | 36        |
| 4.3.4    | <i>Genotipagem</i>                                      | 36        |
| 4.3.5    | <i>Análise estatística</i>                              | 37        |
| 4.4      | Resultados  | 37        |
| 4.5      | Discussão   | 38        |
| 4.6      | Referências   | 39        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÕES</b>                                       | <b>43</b> |
| <b>6</b> | <b>APÊNDICE</b>   | <b>44</b> |
| 6.1      | Análise do polimorfismo A2756G do gene MS               | 44        |
| 6.1.1    | <i>Metodologia</i>                                      | 44        |
| 6.1.1.1  | <i>Coleta do material biológico</i>                     | 44        |
| 6.1.1.2  | <i>Extração do DNA de Amostra de Sangue</i>             | 44        |
| 6.1.1.3  | <i>Amplificação do DNA</i>                              | 45        |
| 6.1.1.4  | <i>Digestão</i>   | 45        |
| 6.1.1.5  | <i>Análise da digestão e determinação dos genótipos</i> | 45        |
| 6.1.2    | <i>Resultados para o polimorfismo A2756G</i>            | 46        |
| 6.1.3    | <i>Discussão dos resultados do polimorfismo A2756G</i>  | 49        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 6.2      | Dados complementares do manuscrito do artigo científico: Associação do Polimorfismo C677T, do gene MTHFR, à redução do risco para LMA em crianças não brancas brasileiras | 50        |
| 6.3      | Termo de consentimento informado  | 51        |
| 6.4      | Artigo científico in press: “The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population”                             | 54        |
| <b>7</b> | <b>ANEXOS</b>   | <b>60</b> |
| 7.1      | Instrução para autores - revista Genetics and Molecular Biology   | 60        |
| 7.2      | Instrução para autores – revista Cancer Letters   | 66        |

## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias hematológicas compreendem um grande número de distúrbios cujas origens são atribuídas a alterações genéticas de células hematopoéticas. Estas alterações modificam o padrão de divisão celular, maturação/diferenciação e apoptose, determinando vantagem proliferativa das células alteradas. Dentre as neoplasias hematológicas destacam-se as leucemias nas suas mais variadas formas. As leucemias correspondem a 30% dos casos de câncer em crianças, sendo as leucemias agudas responsáveis por 95% dos casos de leucemias infantis.

Nas últimas décadas, têm sido realizadas inúmeras investigações a fim de identificar os fatores de risco genéticos e ambientais relacionados ao evento leucêmico. Alguns destes fatores como radiações ionizantes, agentes químicos e vírus foram bem descritos e outros, como a deficiência de certos nutrientes essenciais ao metabolismo são alvo de estudos atualmente.

O ácido fólico é uma importante vitamina do complexo B, vital para a divisão celular e manutenção da homeostase e sua deficiência determina sérias desordens ao nível celular. Produtos do seu metabolismo participam de processos de metilação, dentre os quais a metilação gênica, além de atuarem na síntese e reparo de DNA, um mecanismo vital para prevenção de rearranjos cromossômicos comuns em quadros leucêmicos.

A enzima chave no metabolismo do ácido fólico é a metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) que converte irreversivelmente o 5,10 metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF) a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF). O loco gênico da MTHFR tem se mostrado polimórfico exibindo diferentes alelos responsáveis pela diminuição da atividade enzimática e conseqüente acúmulo de 5,10-MTHF. A redução da atividade enzimática da MTHFR está associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, defeitos no tubo neural e desenvolvimento de determinados tipos de câncer. Por outro lado, esta diminuição da atividade enzimática da MTHFR também está associada a uma melhoria na síntese e reparo do DNA, prevenindo possíveis rearranjos cromossômicos.

Polimorfismos apresentados por locus que codificam a síntese de outras enzimas envolvidas no metabolismo de folatos também podem conduzir a alterações metabólicas significativas. A metionina sintase (MS) é a enzima responsável pela remetilação da homocisteína a metionina, utilizando como co-substrato o 5-MTHF.

Além disso, a metionina sintetizada a partir da remetilação da homocisteína será convertida a S-adenosil metionina (SAM) um importante doador de radicais metil para mais de cem reações, incluindo a metilação do DNA. Alterações no processo de metilação podem inativar genes supressores tumorais ou converter protooncogenes em oncogenes ativos conduzindo a célula afetada a malignização.

Poucos estudos acerca dos marcadores analisados neste trabalho foram realizados na população brasileira. Estes trabalhos envolveram doenças como Mal de Alzheimer (Silva et al., 2003), doença arterial coronariana (Muniz et al., 2006) e leucemia linfóide aguda (LLA) (Zanrosso et al., 2005) não sendo realizado nenhum estudo com a intenção de analisar uma possível associação dos polimorfismos analisados com a leucemia mielóide aguda (LMA). O estudo dos polimorfismos do gene para MTHFR visa contribuir para a identificação de potenciais fatores de susceptibilidade gênica para o desenvolvimento do câncer. Um maior conhecimento deste marcador possibilitará um melhor entendimento dos mecanismos de metilação, síntese e reparo do DNA. Além disso, contribuirá para o esclarecimento dos mecanismos que conduzem a rearranjos cromossômicos, um dos fatores determinantes da leucemogênese.

Com o objetivo de investigar a associação dos polimorfismos C677T e A1298C do gene MTHFR em pacientes portadores de LMA na população brasileira, em face da inexistência de estudos nacionais com este tema, foi utilizada uma amostra obtida a partir de Centros de Referência no tratamento da leucemia da infância no Brasil, o que contribuirá para o melhor entendimento da participação destes polimorfismos na gênese da LMA.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Leucemias: aspectos gerais

O sistema hematopoético é composto por células pluripotentes indiferenciadas na medula óssea que poderão originar duas linhagens celulares: a linhagem linfóide, que irá originar os linfócitos T e B e a linhagem mielóide, responsável pela formação de eritrócitos, plaquetas, monócitos e granulócitos (Colby-Graham e Chordas, 2003).

As neoplasias hematológicas compreendem um grande número de distúrbios cujas origens são atribuídas a alterações genéticas de células hematopoéticas, onde se destacam as leucemias nas suas mais variadas formas. O termo leucemia é originário do grego (leucos = branco, hema = sangue) e refere-se a um grupo de doenças malignas dos glóbulos brancos (Colby-Graham e Chordas, 2003). Sua etiologia, no homem, é desconhecida sendo, possivelmente, condicionada a uma série de fatores, tais como exposição a radiações ionizantes (Heyssel et al., 1960), pesticidas (Ciccone et al., 1993), fumaça de cigarro (Pogoda et al., 2002), benzeno (Smith et al., 2004) e alguns campos eletromagnéticos de baixa frequência (Ciccone et al., 1993). Além disto, algumas alterações cromossômicas, tais como translocações, inversões e deleções em células progenitoras do sistema linfo-hematopoético, podem promover significativas alterações em genes envolvidos no programa de diferenciação celular, determinando, dessa forma uma vantagem proliferativa do clone leucêmico, resultando numa progressiva substituição do tecido hematopoético normal (Bloomfield e Caligiuri, 2001; Ribeiro, 2001).

As leucemias podem ser classificadas de acordo com o estágio de diferenciação das células afetadas, em agudas e crônicas e, de acordo com a natureza dos blastos, em linfóides e mielóides. As quatro maiores formas de leucemias são a leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia linfóide crônica (LLC) e leucemia mielóide crônica (LMC) (Cole e Rodu, 2001).

Na década de 70 as leucemias agudas foram classificadas levando em consideração critérios morfológicos determinados pelo comitê FAB (Franco-Americano-Britânico). Segundo estes critérios a LLA é classificada em L1, L2 e L3, com base no diâmetro celular, na forma do núcleo, no número e protuberância dos nucléolos e na quantidade e aspectos relativos do citoplasma; e a LMA em M1, M2, M3, M4, M5 e M6, com base nas características nucleares e citoplasmáticas e no grau

de maturação das células blásticas (Bennett et al., 1976; Bennett et al., 1985a). Recentemente, foram descritos dois novos grupos de LMA - M0 (definido por marcadores imunológicos, em pacientes que não apresentam critérios morfológicos) e M7 (Bennett et al., 1985b; Bennett et al., 1991).

Atualmente, além dos critérios FAB, as LLA são classificadas segundo a presença de antígenos de superfície, sendo possível detectar com bastante precisão, além da linhagem celular (T ou B), o nível de diferenciação em que se encontra o processo leucêmico (Bene et al., 1995; Cavalcanti Jr., 1997).

Os três principais tipos de leucemia pediátrica são: a LLA correspondendo a 75% a 80% dos casos, a LMA com 20% a 25% e a LMC que ocorre com frequência de 5% (Colby-Graham e Chordas, 2003).

### *2.1.1 Principais leucemias infantis*

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) representa o principal tipo de leucemia em crianças e a maior parte dos cânceres comuns da infância (Wiemels e Greaves, 1999). A LLA é caracterizada pelo acúmulo de linfoblastos em vários órgãos e tecidos, notadamente na medula óssea e no sangue periférico (Barrios e Laksa, 2001).

De acordo com o estágio de diferenciação das células B existem três formas diferentes de LLA: LLA de células B-progenitoras (pro-B cell ALL), LLA comum (common ALL ou CALLA), LLA de células B-precursoras (precursor-B cell ALL) (Jaffe et al., 2001) e LLA de células B-maduras (Farias e Castro, 2004).

A LLA do tipo pró-B representa 5% dos casos pediátricos e 10% dos casos de LLA em adultos (Falcão e Rego, 2002). As células pró-B expressam os marcadores: CD34, CD19 e CD22(c) (Kotilo, 1995). As LLA do tipo comum (CALLA) representam 75% dos casos das LLA pediátricas e 50% dos casos em adultos, expressa CD10, que causa um impacto favorável no prognóstico (Bene e Faure, 1997; Consolini et al., 1998), CD22(c), CD19 e/ou CD20 (Kotilo, 1995). A leucemia do tipo pré-B expressa cadeia  $\mu$  citoplasmática, além de CD19, CD20 e CD10 (Kotilo, 1995), representando, aproximadamente 15% das crianças com LLA e 10% dos casos em adultos. Finalmente, a LLA do tipo B maduro, presente em 2% a 5% de crianças e adultos, apresenta um fenótipo incomum, caracterizando-se pela expressão de cadeias leves de imunoglobulina na superfície de membrana (Smlg) (Falcão e Rego, 2002).

A leucemia mielóide aguda (LMA) é caracterizada pelo aumento da proliferação e alteração na maturação das células mielóides, resultando numa insuficiência hematopoiética (granulocitopenia, trombocitopenia ou anemia), com ou sem leucocitose. Os sintomas e as características clínicas da LMA são, normalmente, atribuídos diretamente à infiltração leucêmica da medula óssea, com resultante citopenia (Löwenberg et al., 1999).

A classificação da LMA consiste em 4 categorias de acordo com a Organização Mundial de Saúde: (1) LMA com anormalidades genéticas, (2) LMA com displasia de linhagem múltipla (multilineage dysplasia), (3) LMA relacionadas à terapia (therapy related) (4) e algumas não categorizadas (LMA not otherwise categorized) (Jaffe et al., 2001).

A leucemia mielóide crônica (LMC) caracteriza-se pela expansão clonal de uma célula-tronco primitiva e pluripotente que tem a capacidade de se diferenciar em células mielóides, monocíticas, megacariocíticas e células B e T (Barboza e Souza, 2002). A LMC apresenta três fases que correspondem à excessiva proliferação da linhagem mielóide (fase crônica-FC), seguida por uma perda progressiva da diferenciação celular (fase acelerada-FA) e terminando num quadro de leucemia aguda (fase blástica-FB) (Conduas do INCA, 2003). A progressão para a fase blástica ocorre, devido ao surgimento de mutações secundárias, num período de 3 e 18 meses. A fase de agudização afeta as células da linhagem linfóide em 1/3 dos pacientes, e 2/3 apresentam uma leucemia aguda indiferenciada (AUL-Acute Undifferentiated Leukemia) ou células mielóides (Griffin et al., 1983).

## 2.2 Papel do Ácido Fólico no Metabolismo

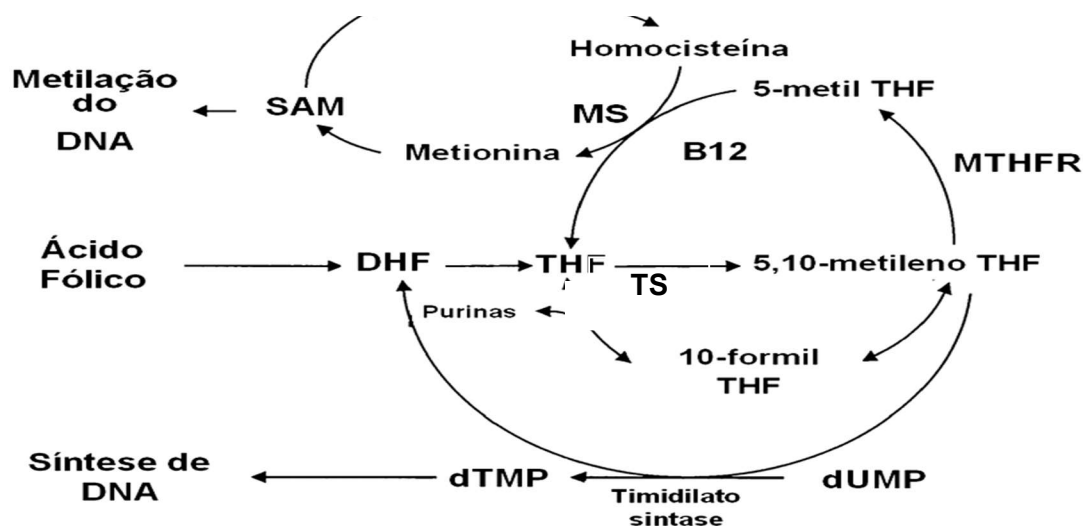
O ácido fólico é uma importante vitamina do complexo B, pouco armazenada no organismo. É vital para a divisão celular e manutenção da homeostase. Na rota das coenzimas de metabolização do ácido fólico há transferência de unidades de um carbono (metil), requeridas para regulação de determinadas reações metabólicas. Tais reações incluem biossíntese de purinas, necessárias para a formação de ácidos nucléicos. Grupos metil também atuam na recuperação da metionina, que é o precursor imediato de S-adenosilmetionina (SAM), que atua como doador universal dos radicais metil, em várias reações biológicas que envolvem metilação (Selhub e Miller, 1991; Goyette et al., 1994).

Estudos epidemiológicos e experimentais indicam que a deficiência de ácido fólico em seres humanos induz a extensas quebras cromossômicas (Menzics et al., 1966), formação de micronúcleos (Everson et al., 1988), hipometilação genômica (Jacob et al., 1998), diminuição da capacidade de reparo do DNA (Choi e Manson, 1998), além do aumento dos níveis de uracila no DNA das células da medula óssea (Wickramasinghe e Fida, 1994). Outros estudos epidemiológicos caso-controle associam a deficiência de folato com várias neoplasias, tais como câncer de pulmão, de esôfago, de pâncreas, de mama, de cérebro e de câncer colonretal (Mason e Levesque, 1996; Duthie et al., 2002).

Estudos intervencionais indicam que a suplementação de ácido fólico pode reduzir o risco do aparecimento de defeitos do tubo neural (Berry et al., 1999), retardo mental (Krishnaswamy e Nair, 2001), doenças vasculares (Chen et al., 2001), câncer (Kim, 2000) e, em especial, leucemia linfóide aguda em crianças cujas mães fizeram suplementação de ácido fólico durante a gestação (Krajinovic et al., 2004).

Baixos níveis de ácido fólico no organismo são resultantes de ingesta nutricional insuficiente ou deficiências da assimilação no seu metabolismo. A figura 1 mostra as principais etapas do metabolismo do ácido fólico que estão relacionadas à síntese e reparo do DNA.

Figura 1: Visão geral da via metabólica do ácido fólico em humanos e a rota da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), timidilato sintase (TS), metionina sintase (MS), S-adenosil metionina (SAM), S-adenosil homocisteína (SAH), ácido dihidrofolico (DHF) e ácido tetrahidrofolico (THF).



Adaptado de Skibola et al., 1999.

A partir da figura 1 observa-se que a via metabólica do ácido fólico é dividida em duas rotas principais: a primeira consiste na reação que envolve a síntese de purinas e conversão de dUMP a dTMP. Na segunda rota, o 5-metilTHF atua como doador de radical metila para homocisteína (Hcy) que, sob atividade catalítica da metionina sintase (MS) e vitamina B<sub>12</sub>, é remetilada a metionina, aminoácido essencial para o metabolismo das proteínas (Lorenzi, 1991). A metionina é transformada em Hcy, mediante duas reações sucessivas: na primeira, catalisada pela enzima metionina adenosiltransferase, é produzido um metabólito intermediário, a S-adenosilmetionina (SAM); na segunda, a SAM sofre desmetilação e se transforma em S-adenosilhomocisteína, que logo é hidrolisada a Hcy e adenosina, pela enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase (Alemán *et al.*, 2001).

Uma das consequências da deficiência do ácido fólico é o esgotamento celular de SAM, que induz a hipometilação do DNA e, potencialmente, leva a hiperexpressão de protooncogenes e conversão dos mesmos a oncogenes, que iniciam o processo carcinogênico quando estão hipometilados (Fearon e Vogelstein, 1990; Fang *et al.*, 1996; Zingg e Jones, 1997). Crescimento seletivo e transformação de células podem resultar também de hipermetilação de genes supressores de tumor (Issa *et al.*, 1994), nas suas regiões promotoras, que ocorrem exclusivamente em zonas de repetição dos dinucleotídeos CpG em seres humanos (Ulrich, *et al.*, 2000; Selhub e Miller, 1991).

O câncer é uma, dentre várias doenças, que está associada à diminuição da concentração plasmática de ácido fólico. Estudos têm demonstrado que a hipometilação global do DNA, um marcador do déficit de ácido fólico plasmático, induz a perdas de segmentos cromossômicos por causar uma condensação irregular da heterocromatina pericentromérica (Guttenbach e Schmid, 1994). Quebras cromossômicas podem levar ao aparecimento de micronúcleos e conduzir a célula a condições aneuplóides que podem ser potenciais fatores de risco no desenvolvimento de neoplasias (Rasnick e Duesberg, 1999). Entretanto, estudos utilizando células humanas *in vitro* demonstraram que a presença de quebras e rearranjos cromossômicos são minimizados na presença de altas concentrações de ácido fólico (60-120nM) (Crott *et al.*, 2001).

Baixos níveis citosólicos de 5,10-MetilenoTHF diminuem a síntese de dTMP, aumentando a relação celular dUMP/dTMP e a incorporação incorreta de dUTP no DNA (Blount *et al.*, 1997). Normalmente, uracil é uma base apenas para RNA, entretanto, ela é incorporada erroneamente no DNA quando a metilação de uridilato

para timidilato é insuficiente durante a síntese de DNA. Essa incorporação é excisada pela uracil DNA glicosilase, o que poderá resultar em quebras nas fitas do DNA, precursoras de translocações, deleções e inversões (Matsuo *et al.*, 2001).

A deficiência na atividade da enzima que converte 5,10-metilTHF em 5-metilTHF – a metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) – contribui para manter o nível de 5,10 metilTHF mais alto, o que reduz as chances de quebras cromossômicas devido a menor incorporação de uracila. Como decorrência disto, o fornecimento de 5-metilTHF fica comprometido elevando a taxa de homocisteína plasmática e conseqüente redução na síntese de metionina (Yamada *et al.*, 2001).

Indivíduos com quantidades excessivas de homocisteína, como resultado de mutações no loco MTHFR, podem desenvolver defeitos do tubo neural, retardo mental severo, doenças vasculares e alguns tipos de câncer (Sibani *et al.*, 2000; Wiemels *et al.*, 2001). Segundo Kim (2000) a suplementação de ácido fólico pode reduzir o risco do aparecimento dessas doenças.

### 2.3 Polimorfismos da MTHFR

A enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (EC 1.5.1.20) é a enzima mestra no metabolismo do ácido fólico catalisando a redução de 5,10-MTHF a 5-MTHF, a principal forma de folato no plasma (Friso *et al.*, 2002). O gene para MTHFR localiza-se no cromossomo 1 (1p36.3) apresentando 11 exons com tamanhos variando de 103 a 432 pb (Goyette *et al.*, 1994; Goyette *et al.*, 1998).

Utilizando-se de análises por Northern blot Gaughan *et al.* (2000) identificaram transcritos do gene MTHFR que variavam entre 2,8-9,0 Kb. Esta diferença entre os transcritos pode ser explicada devido a presença de sítios alternativos de início da transcrição e sinais de poliadenilação no gene. Também, foi descrito por Gaughan *et al.* (2000) que o gene MTHFR não apresenta TATA box estando presente, em seu lugar, várias ilhas CpG e múltiplos sítios de ligação SP1 além de sítios de ligação para outros fatores iniciadores da transcrição.

Nos últimos anos foram descritas algumas mutações no gene MTHFR sendo, a maioria delas, raras ou distribuídas em populações isoladas (Sibani *et al.*, 2000; Sibani *et al.*, 2003). Duas mutações deste gene são bem distribuídas nas populações em geral sendo, uma delas, uma transição comum entre citosina (C) e timina (T) no éxon 4 (nucleotídeo 677) que determina uma substituição de alanina por valina na

cadeia polipeptídica, sendo a mesma relacionada a uma maior termolabilidade bem como diminuição da atividade catalítica da enzima (Frosst et al., 1995; Guenther et al., 1999). A outra mutação é resultante de uma transversão de adenina (A) para citosina no éxon 7 (nucleotídeo 1298), cuja consequência é uma substituição do aminoácido glutamato por alanina, na enzima (van der Put et al., 1998; Weisberg et al., 1998). Diferentemente da transição no nucleotídeo 677, a alteração em 1298 não resultará numa proteína termolável (Friedman et al., 1999; van der Put et al., 1998). A possível explicação para esta diferença está no fato da mutação C677T envolver o domínio catalítico enzimático, onde ocorre perda do sítio de ligação com o co-fator da MTHFR – FAD e da mutação A1298C estar localizada no domínio regulatório S-adenosilmetionina da enzima (van der Put et al., 1998; Guenther et al., 1999; Jencks e Mathews, 1987).

Estudos da distribuição geográfica e étnica da mutação C677T em 16 áreas do globo, incluindo a Europa, Ásia, Américas, Oriente médio e Austrália determinaram uma frequência para o genótipo TT em torno de 20% na China, 26% na Itália e 32% no México. Entre os africanos e afro-descendentes a frequência deste genótipo é baixa (5%) (Wilcken et al., 2003). Outros estudos descreveram a frequência do alelo T em cerca de 24-40% em europeus, 26-37% em japoneses e 11% em populações afro-americanas (Papapetrou, et al., 1996; Schneider et al., 1998).

A mutação no nucleotídeo 677 do gene MTHFR confere, respectivamente, aos indivíduos com genótipo TT e CT 30% e 40% de atividade enzimática em relação aos indivíduos de genótipo selvagem CC (Ulrich et al., 2001). Esta variante C677T de baixa atividade está associada ao aumento dos níveis de homocisteína no plasma e ao aumento no risco de doenças vasculares (Kluijtmans et al., 1997; Brattstrom, et al., 1998; Andreassi et al., 2003). A troca na posição 1298 também está correlacionada com uma diminuição da atividade da MTHFR, sendo mais pronunciada nos homozigotos (CC) que no estado heterozigoto (AC) (van der Put et al., 1998; Friedman et al., 1999).

A presença dos genótipos 677TT e 1298CC está associada a um déficit na metilação do DNA podendo conduzir a um estado de hipometilação e ativação oncogênica (Castro et al., 2004). Também, têm sido sugerido que o genótipo TT referente à mutação C677T da MTHFR tem um efeito protetor no desenvolvimento de algumas neoplasias devido a redução da atividade da enzima e consequente acúmulo de 5,10-MTHF e maior conversão de dUMP a dTMP (Blount et al., 1997). Outros

estudos sugerem uma associação entre o genótipo 677TT e a diminuição da chance de desenvolvimento de certos tipos de cânceres, em especial, LLA em crianças e adultos (Wiemels et al., 2001; Skibola et al., 1999; Franco et al., 2001; Zanrosso, et al., 2005). Outros resultados são indicativos de uma menor associação entre o genótipo 1298CC e casos de leucemias em adultos e de leucemias hiperdiplóides em crianças (Wiemels et al., 2001; Skibola et al., 1999).

#### 2.4 Polimorfismo da MS

O papel de polimorfismos relacionados a outras enzimas envolvidas no metabolismo do ácido fólico e o câncer, em especial, a metionina sintase (MS) e a timidilato sintase (TS), foi recentemente demonstrado (Ma et al., 1999; Krajnovic e Costea 2002; Hishida et al., 2003; Lincz et al., 2003).

A enzima metionina sintase (5-metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferase) (EC 2.1.1.13) é responsável pela remetilação da homocisteína a metionina utilizando como co-substrato a metilcobalamina e o 5-MTHF como doador de grupamentos metil (Li et al., 1996). O gene MS apresenta um cDNA com 3,8 Kb de comprimento e 33 exons. Localiza-se no cromossomo 1 (1p42.3-q43) e codifica uma proteína com 1265 aminoácidos (Leclerc et al., 1996; Chen, et al., 1997; Ma et al., 1999; Watkins et al., 2002). Uma transversão entre uma adenina (A) e uma guanina (G) na posição 2756 do gene MS determina a substituição do ácido aspártico por um resíduo de glicina, na molécula da enzima comprometendo sua atividade (Leclerc et al., 1996).

O papel desta transversão é controverso. Matsuo et al (2001) observaram que a mutação A2756G pode atuar como fator de risco no desenvolvimento de linfomas malignos, enquanto Skibola et al (2002) sugerem que a mutação em questão tem um efeito protetor ao desenvolvimento de LLA quando os resultados são analisados simultaneamente com mutações no gene para serina hidroximetiltransferase.

Deficiência severa de vitamina B12 ou de MS causam hipometioninemia, hiperhomocisteinemia e homocistinúria (Watkins e Rosenblatt, 1989). Isto pode resultar em acúmulo de 5-metiltetrahidrofolato e diminuição de derivados intracelulares de folato incluindo, 5,10-metilenotetrahidrofolato requerido para a biossíntese de timidilato ocasionando acúmulo de desoxiuridilato no DNA (Banerjee e Matthews, 1990; Bount e Ames, 1995).



### 3 REFERÊNCIAS

- Alemán G, Trovar R and Torres N (2001) Metabolismo de la homocisteína y riesgo de enfermedades cardiovasculares: Importancia del estado nutricional en ácido fólico, vitaminas B6 y B12. *Rev Invest Clin* 53: 141-151.
- Andreassi MG, Botto N, Battaglia FCD, Antonioli E, Manfredi SMS, Colombo MG, Biagini A and Clerico A (2003) Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease. *Hum Genet* 112: 171–177.
- Banerjee RV and Matthews RG (1990) Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J* 4: 1450-1459.
- Barboza LP e Souza JM (2002) Análise dos transcritos da translocação t(9;22) em Leucemia Mielóide Crônica *Rev. Bras.hematol.hemoter* 22: 89-98.
- Barrios CH e Laksa D (2001) Leucemia Linfóide Aguda no Adulto In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R *Hematologia - Fundamentos e Prática*. São Paulo, Atheneu, p. 477-485.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A and van't Veer MB (1995) Proposal for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL). *Leukemia* 9: 1783-1786.
- Bene MC and Faure GC (1997) CD10 in acute leukemias *Haematologica* 82: 205-210.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR and Sultan C (1976) Proposals for the classification of the acute leukemia. French-American-British (FAB) Co-operative group. *Br J Haematol* 33: 451-458.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR and Sultan C (1985a) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103: 620-625.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR and Sultan C (1985b) Criteria for the diagnosis for acute leukemia of megakaryocyte lineage (M<sub>7</sub>). A report of the French-American-British. *Ann Intern Med* 103: 460-462.

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR and Sultan C (1991) Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol* 78: 325-329.
- Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LY, Gindler J, Hong SX and Correa A (1999) Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention *N Engl J Med* 341:1485-1490.
- Bount BC and Ames BN (1995) DNA damage in folate deficiency. *Baillieres Clin. Haematol.* 8: 461-478.
- Blount HC, Mack MM, Wehr CM, Macgregor JT, Hiatt RAW, Ang G, Wickramasinghe NS, Everson RB and Ames BN (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *PNAS* 94: 3290- 3295.
- Bloomfield CD and Caligiuri MA (2001) Molecular biology of leukemias. In: Devita VT, Hellman S and Rosenberg SA (eds) *Cancer: principles and practice of oncology*. Lippincott, Williams & Wilkins. Philadelphia. pp 2389–2404.
- Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J and Brudin L (1998) Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 98: 2520-2526.
- Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ and Almeida IT (2004) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C/T and 1298A/C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* 41:454-458.
- Cavalcanti Jr, GB (1997) Importância da aplicação de anticorpos monoclonais no diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *Rev Bras Anal Clin* 29: 159-167.
- Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J and Shane B (1997) Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization, and expression. *J. Biol. Chem.* 272: 3628, and 3634.

- Chen J, Stampfer MJ, Ma J, Selhub J, Malinow MR, Hennekens CH and Hunter DJ (2001) Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction *Atherosclerosis* 154:667-672.
- Choi SW and Mason JB (1998) Folate and colorectal carcinogenesis: is DNA repair the missing link? *Am J Gastroenterol* 93: 2013-2016.
- Ciccione G, Mirabelli D, Levis A, Gavarotti P, Rege-Cambrin G, Davico L and Vineis P (1993) Myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes: chemical exposure, histologic subtype and cytogenetics in a case-control study. *Cancer Genet Cytogenet* 68: 135–139.
- Colby-Graham MF and Chordas C (2003) The Childhood Leukemias. *J Pediatric Nurs* 18: 87-95.
- Cole P and Rodu B (2001) Descriptive epidemiology: cancer statistics. In: Devita VT, Hellman S and Rosenberg SA (eds) *Cancer: principles and practice of oncology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. pp 228–241.
- Conduas do INCA (2003) Leucemia Melóide Crônica. *Rev. Bras. de cancerologia* 49:5-8.
- Consolini R, Legitimo A, Rondelli R, Guguelmi C, Barisone E, Lippi A, Cantu-Rajnoldi A, Arico M, Conter V, Cocito MG, Putti MC, Pession A, Masera G, Biondi A and Basso G (1998) Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL *Haematologica* 83: 967-973.
- Crott JW, Mashiyama ST, Ames BN and Fenech M (2001) The effect of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphism on chromosome damage in human lymphocytes in vitro *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 1089-1096.
- Duthie SJ, Narayanan S, Brand GM, Pirie L and Grant G (2002) Impact of folate deficiency on DNA stability. *J Nutr* 132: 2444- 2449.
- Everson RB, Wehr CM, Erexson GL and Macgregor JT (1988) Association of marginal folate depletion with increased human chromosomal damage in vivo: demonstration by analysis of micronucleated erythrocytes. *J Natl Cancer Inst* 80: 525-529.

- Falcão RP e Rego, EM (2002) Leucemia linfóide aguda em adultos e crianças: características morfológicas e imunofenotípicas. Ser Monogr Esc Bras Hemat 9: 25-35.
- Fang JY, Zhu SS, Xiao SD, Jiang SJ, Shi Y, Chen XY, Zhou XM and Qian LF (1996) Studies on the hypometylation of *c-myc* *c-Ha-ras* oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. J Gastroenterol Hepatol 11: 1079 -1082.
- Farias MG e Castro SM (2004) Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas J. Bras. Patol. Med. Lab, 40: 2.
- Fearon ER and Vogelstein BA (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61: 759-767.
- Franco RF, Simoes BP, Tone LG, Gabellini SM, Zago MA and Falcao RP (2001) The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia Br J Haematol 115: 616-618.
- Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S, Mendel M, Kidron M and Bar-on H (1999) A Common Mutation A1298C in Human Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Association with Plasma Total Homocysteine and Folate Concentrations J. Nutr 129: 1656-1661.
- Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R and Selhub J (2002) A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. PNAS 99:5606–5611.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluitmans LA, van den Heuvel, LP and Rozen, R (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation at the methylenetetrahydrofolate reductase locus. Nat n 10: 110 -113.
- Gaughan DJ, Barboux S, Kluijtmans LA and Whitehead AS (2000) The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. Gene 257: 279-289.

- Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthew ARG and Rozen R (1994) Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Gen* 7: 195-200.
- Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M and Rozen R (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 9:652-656.
- Griffin JD, Todd RF and Ritz J (1983) Differentiation patterns in the blastic phase of chronic myeloid leukemia *Blood* 61: 85-91.
- Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG and Ludwig ML (1999) The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia *Nat Struct Biol* 6: 359-365.
- Guttenbach M and Schmid M (1994) Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocytes cultures. *Exp. Cell Res* 211:127-132.
- Heysel R, Brill AA and Woodbury LA (1960) Leukemia in Hiroshima atomic bomb survivors. *Blood* 15: 313.
- Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, Ito H, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Morishima Y, Emi N and Tajima K (2003) Associations between polymorphisms in the thymidilate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologyca/J of Hematol* 88: 159-166.
- Issa J-P, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE and Baylin SB (1994) Methylation of the oestrogen receptor CpG island links aging and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 7: 536-540.
- Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, Henning SM and Swendseid ME (1998) Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr* 128: 1204 -1212.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H and Vardiman JW (2001) Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press.

- Jencks DA and Mathews RG (1987) Allosteric inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. Effects of adenosylmethionine and NADPH on the equilibrium between active and inactive forms of the enzyme and on the kinetics of approach to equilibrium. *J Biol Chem* 262: 2485-2493.
- Kim Y (2000) Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms, Folate and Cancer risk: A Paradigm of Gene-Nutrient Interactions in Carcinogenesis. *Nut Rev* 58: 205-209.
- Kluijtmans LA, Kastelein JJ, Lindemans J, Boers GH, Heil SG, Brusckhe AV, Jukema JW, van den Heuvel LP, Trijbels FJ, Boerma GJ, Verheugt FW, Willems F and Blom HJ (1997) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 96: 2573-2577.
- Kotilo PN (1995) Flow cytometric analysis in diagnostic hematology. In: RODAK, B. F. *Diagnostic Hematology*. Sunders Company.
- Krajinovic M and Costea SC (2002) Polimorphism of the thymidylate syntase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 359: 1033-1034.
- Krajinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I and Moghrabi A (2004) Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia *Pharmacogenomics J* 4: 66-72.
- Krishnaswamy K and Nair KM (2001) Importance of folate in human nutrition *British J Nutrition* 85:115-124.
- Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R and Gravel RA (1996) Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the *cb/G* complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 5: 1867-1874.
- Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R and Kruger WD (1996) Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum. Molec. Genet.* 5: 1851-1858.
- Lincz LF, Scorgie FE, Kerridge I, Potts R, Spencer A and Enno A (2003) Methionine synthase genetic polymorphism MS A2756G alters susceptibility to follicular but

not diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma. *Br J Haem* 120: 1051-1054.

Löwenberg B, Downing JR, Burnett A (1999) Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine* 341: 1051-1062.

Lorenzi TF (1991) Eritócitos In: Aires, MM *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.63-74.

Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Gravel R and Rozen RA (1999) Polymorphism of the methionine syntase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prevent* 88: 825-829.

Mason JB and Levesque T (1996) Folate: Effects on carcinogenesis and the potential for cancer chemoprevention. *Oncology* 10: 1727-1744.

Matsuo K, Suzuki R, Hamajima N, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Kondoh E, Maeda S, Asakura S, Kaba S, Nakamura S, Seto M, Morishima Y and Tajima K (2001) Association between polimorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma *Blood* 97: 3205-3209.

Menzics RC, Crossen PE, Fitzgerald PH and Gunz FW (1966) Cytogenetic and cytochemical studies on marrow ce1ls in B 12 and folate deficiency. *Blood* 4: 581-594.

Muniz MTC, Siqueira ERF, Oliveira AC, Fonseca RA, D'Almeida V, Hotta JK, Santos JE, Cavalcanti MSM, Melo EP, Sampaio CAM (2006) Avaliação da relação entre o polimorfismo C677T da MTHFR e o nível de homocisteína na Doença Arterial Coronariana. ABE&M- Submetido.

Papapetrou C, Lynch SA, Burn J and Edwards YH (1996) Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. *Lancet* 348:58

Pogoda JM, Preston-Martin S, Nichols PW and Ross RK (2002) Smoking and risk of acute myeloid leukemia: results from a Los Angeles County case-control study. *Am J Epidemiol* 155: 546–553.

- Rasnick D and Duesberg PH (1999) How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer. *Biochem. J* 340: 621-630.
- Ribeiro R (2001) Leucemia Linfóide Aguda na Infância e Adolescência In: Zago MA, Falcão RP and Pasquini R (eds) *Hematologia - Fundamentos e Prática*. Atheneu. São Paulo. Pp 487-506.
- Schneider JA, Rees DC, Liu YT and Clegg JB (1998) Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 62:1258–1260.
- Selhub JL and Miller JW (1991) The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 55: 131-138.
- Sibani S, Christensen B, O'Ferrall E, Saadi L, Mou-Tim FJ, Rosenblatt DS and Rozen R (2000) Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat* 15: 280-287.
- Sibani S, Leclerc D, Weisberg IS, O'Ferrall, E, Watkins D, Artigas C, Rosenblatt DS and Rozen R (2003) Characterization of mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency reveals an FAD-responsive mutation. *Hum. Mutat.* 21: 509-520.
- Silva, VC (2003) Polimorfismos C677T e A1298C no gene Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) como fatores de risco para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer. Monografia de graduação. Universidade de Pernambuco, Recife.
- Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA and Morgan GJ (1999) Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *PNAS* 96: 12810-12815.
- Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, Rollinson S, Roman E, Cartwright RA and Morgan GJ (2002) Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 99: 3786-3791.



- Smith MT, Skibola CF, Allan JM, Morgan GJ (2004) Causal models of leukaemia and lymphoma. *IARC Sci Publ* 157: 373-392.
- Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, Fosdick L, Beresford SA, Yasui Y and Potter JD (2000) Lack of association between the C677T MTHFR polymorphism and colorectal hyperplastic polyps. *Cancer Epidemiol* 9: 427- 433.
- Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, Ariail KS, Keener CL, Li S, Liu H, Farin FM and Potter JD (2001) Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polimorphism. *Blood* 98: 231- 234.
- van der Put NMJ, Gabreëls F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trubels FJM, Eskes TKAB, Van Den Heuvel LP and Blom HJ (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62: 10044-1051.
- Watkins D and Rosenblatt DS (1989) Functional methionine synthase deficiency (cb1E and cb1G): clinical and biochemical heterogeneity. *Am J Med Genet* 34: 427-434.
- Watkins D, Ru M, Hwang H-Y, Kim CD, Murray A, Philip NS, Kim W, Legakis H, Wai T, Hilton JF, Ge B, Dore C, Hosack A, Wilson A, Gravel RA, Shane B, Hudson TJ and Rosenblatt DS (2002) Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency, cb1G: structure of the MTR gene, genotype diversity, and recognition of a common mutation, P1173L. *Am J Hum Genet* 71: 143-153.
- Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S and Rozen R (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64: 169-172.
- Wickramasinghe SN and Fida S (1994) Bone marrow cells from vitamin B12- and folate-deficient patients misincorporate uracil into DNA. *Blood* 83:1656-1661.
- Wiemels JL and Greaves M (1999) Structure and Possible Mechanisms of TEL-AML1 Gene Fusion in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Research* 59: 4075-4082 1999.

- Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE and Greaves MF (2001) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *PNAS* 98: 4004- 4009.
- Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, Lopez MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martinez-Frias ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G and Botto LD (2003) Geographical and ethnic variation of the 677C-T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet* 40 619-625.
- Yamada K, Chen Z, Rozen R and Matthews RG (2001) Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *PNAS* 98: 14853-14858.
- Zanrosso CW, Hatagima A, Emerenciano M, Ramos F, Figueiredo A, Felix TM, Segal SL, Guigliani R, Muniz MT and Pombo-de-Oliveira MS (2005) The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. *Leu Research*; in press.
- Zingg JM and Jones PA (1997) Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18: 869-882.

#### 4 MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscrito a ser submetido à revista Cancer Letters.

### Associação do Polimorfismo C677T, do gene *MTHFR*, à redução do risco para LMA em crianças não brancas brasileiras

F.J.C. Ramos<sup>1,2</sup>, V.C. Silva<sup>1</sup>, M. Araújo<sup>6</sup>, E.P. Leite<sup>4</sup>, E.M. Freitas<sup>2</sup>, M.S. Pombo-de-Oliveira<sup>5</sup>,  
M.T.C. Muniz<sup>2,3</sup>, N. Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, CCB/UFPE

<sup>2</sup>Departamento de Biologia, ICB/UPE

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, ICB/UPE

<sup>4</sup>Centro de Oncologia, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, UPE

<sup>5</sup>Divisão de Medicina Experimental, INCA

<sup>6</sup>Centro Infantil Boldrini

Correspondência: Departamento de Genética/Centro de Ciências Biológicas. Av. prof. Moraes Rego s/n Cidade Universitária, Recife-Brasil CEP:50.670-420

Tel: +55-81-21268520, Fax: +55-81-21268569, cel.: +55-81-91455405.

E-mail: [santos\\_neide@yahoo.com.br](mailto:santos_neide@yahoo.com.br)

#### 4.1 Abstract

A metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima chave no metabolismo do folato e a presença de polimorfismos que reduzem sua atividade têm sido relacionados ao desenvolvimento de certos tipos de câncer. Com o objetivo de investigar o papel dos polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR no desenvolvimento da LMA foi realizado um estudo caso-controle em crianças brasileiras e grupo-controle sem histórico de câncer. Foram determinados os genótipos de 182 crianças e 315 controles para os polimorfismos em estudo, através da técnica de PCR-RFLP. Os resultados sugerem uma associação entre o genótipo 677CT na redução do risco de desenvolvimento de LMA em crianças não-brancas [OR, 0,37; IC 95%, 0,14-0,92] e a associação do genótipo 1298AC no aumento do risco de desenvolvimento da LMA [OR, 2,90; IC 95%, 1,26-6,71].

Palavras-chave: LMA, MTHFR, polimorfismos, folato.

#### 4.2 Introdução

A leucemia mielóide aguda (LMA) é caracterizada pelo aumento na proliferação e alteração na maturação das células mielóides. Atualmente, a LMA corresponde à cerca de 15-17% dos casos de leucemias pediátricas. Os subtipos de LMA são freqüentemente caracterizados por alterações genéticas tais como mutações pontuais e alterações cromossômicas que incluem translocações, inversões e deleções [1,2,3].

A enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) desempenha um papel chave no metabolismo do ácido fólico convertendo, irreversivelmente, o 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofoato. Nos últimos anos tem sido demonstrada a associação entre dois polimorfismos do gene MTHFR (C677T e A1298C) com a incidência de casos de leucemia linfóide aguda (LLA) em crianças e adultos [4,5,6,7,8].

A presença dos polimorfismos C677T e A1298C diminuem a atividade enzimática da MTHFR com conseqüente acúmulo de 5,10-metilenotetrahidrofolato que será desviado para síntese de purinas, conversão de dUMP a dTMP e reparo do DNA [9,10]. Estas reações estão associadas a prevenção de alterações genéticas desencadeadoras da leucemogênese.

O objetivo do presente estudo é investigar a associação entre os polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR com o risco do desenvolvimento da LMA pediátrica em casos atendidos em Centros de referência no tratamento do câncer no Brasil.

#### 4.3 Materiais e métodos

##### 4.3.1 *População do estudo*

O grupo teste foi composto por 182 indivíduos com idade  $\leq 18$  anos e diagnóstico clínico e laboratorial para LMA atendidos no Centro de Oncologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (CEONP/HUOC) – Recife, região Nordeste, Instituto Nacional de Câncer (INCA) – Rio de Janeiro e Centro Infantil Boldrini – Campinas, ambos da região Sudeste. Além desses, foram analisados casos de LMA das regiões Sul e Centro Oeste atendidos nas instituições participantes. O grupo controle foi composto por 315 indivíduos sem histórico de câncer das mesmas regiões brasileiras dos casos de LMA investigados. A classificação dos indivíduos em brancos e não-brancos foi considerada de acordo com a cor da pele.

##### 4.3.2 *Aspectos éticos*

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética das três instituições envolvidas.

##### 4.3.3 *Coleta de material biológico*

Para o grupo de estudo foram obtidos 5mL de amostras sanguíneas por punção venosa periférica, a vácuo com EDTA, para extração de DNA dos leucócitos antes do tratamento quimioterápico. De cada indivíduo do grupo controle foi coletada uma amostra de 5mL de sangue por punção venosa periférica, a vácuo com EDTA, a semelhança do grupo de estudo. As amostras foram imediatamente armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### 4.3.4 *Genotipagem*

O DNA genômico foi isolado dos leucócitos periféricos utilizando-se protocolo adaptado de Miller et al, 1988 [11]. A determinação do polimorfismo C677T ocorreu por PCR-RFLP segundo protocolo descrito por Frosst et al [12]. A transição C $\rightarrow$ T cria um sítio de restrição para enzima HinfI e o produto digerido foi separado, eletroforeticamente, em gel de agarose 2% e os fragmentos visualizados após

revelação com brometo de etídio em luz UV. Indivíduos selvagens (CC) apresentaram um único fragmento de 198pb, indivíduos heterozigotos (CT) apresentaram fragmentos de 198, 175 e 23pb e homozigotos mutantes (TT) apresentaram dois fragmentos com 175 e 23pb.

A presença do polimorfismo A1298C foi determinada por PCR-RFLP segundo adaptação do protocolo de Skibola et al [4]. A transversão A→C elimina um sítio de restrição para enzima MbolI. O produto de PCR de 163 pb foi digerido pela MbolI e os fragmentos separados, eletroforeticamente, em gel de agarose 4%. A visualização foi realizada após coloração com brometo de etídio e exposição a luz UV. Indivíduos selvagens (AA) apresentaram cinco fragmentos de 56, 31, 30, 28 e 18pb; heterozigotos (AC) apresentaram seis fragmentos de 84, 56, 31, 30, 28, 18pb e homozigotos mutantes (CC) apresentaram quatro fragmentos de 84, 31, 30 e 18 pb.

#### 4.3.5 Análise estatística

A prevalência de diferentes genótipos foi comparada pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). As frequências alélicas foram estimadas pelo método da contagem gênica. O teste  $\chi^2$  foi também utilizado para verificar se a distribuição genotípica está de acordo com a hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança a 95% (IC 95%) foram estimadas através do Pacote Estatístico SPSS (versão 11.5).

## 4.4 RESULTADOS

A distribuição dos genótipos quanto ao loco MTHFR está em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos pacientes e controles. A frequência obtida para os alelos mutantes nas LMA e controles foi 0,31 e 0,30 para MTHFR 677T e 0,26 e 0,23 para MTHFR 1298C, respectivamente. Os valores referentes à distribuição dos casos e controles analisados em relação à média de idade, sexo, raça, região do Brasil e distribuição dos genótipos são apresentados na Tabela 1

Na Tabela 2 observa-se a distribuição dos genótipos A1298C e C677T de acordo com a cor da pele em portadores e controles. Foi observada associação entre o genótipo 677CT (OR = 0,37; IC 95%, 0,14-0,92) e redução no risco de LMA em indivíduos não-brancos. Quando os genótipos 677TT e 677CT foram comparados simultaneamente em indivíduos não-brancos também foi observado redução do risco de LMA (OR = 0,45; IC 95%, 0,20-1,02). Os resultados obtidos para o polimorfismo

A1298C são indicativos de aumento do risco de desenvolvimento da LMA na presença do genótipo 1298AC (OR = 2,90; IC 95%, 1,26-6,71). Foi também observada associação entre o risco ao desenvolvimento da LMA quando comparados, simultaneamente, os genótipos 1298AC e 1298CC (OR = 2,32; IC 95%, 1,06-5,11).

#### 4.5 DISCUSSÃO

LMA, o tipo mais comum de leucemias no adulto, é relativamente incomum em crianças. Nos últimos anos alguns estudos têm demonstrado que a maioria dos subtipos de LMA estão associados com uma variedade de translocações cromossômicas. Estas translocações poderão dar origem a produtos gênicos que atuem como elementos no crescimento e diferenciação celular normal [13].

Ainda que se suponha que interações gene-ambiente descritas para LLA também influenciem a LMA poucos foram os estudos realizados em relação ao papel dos polimorfismos da MTHFR e a patogênese da LMA. [4]. Os resultados do presente trabalho demonstraram que o polimorfismo C677T está associado a uma diminuição de 2,7 vezes no risco de desenvolvimento da LMA entre crianças não-brancas e adultos jovens. Em contraste, um aumento no risco significativo na ordem de 2,9 vezes foi observado para A1298C. Estes achados corroboram com os dados recentemente publicados por Zanrosso et al. em crianças com LLA [7]. Estes achados contrastam com os dados do papel do polimorfismo A1298C em pacientes adultos norte-americanos nos quais foi observado um efeito de proteção na presença desta alteração [4]. A associação gene-ambiente da LLA que apresenta um efeito protetivo na presença do polimorfismo C677T apresenta uma explicação plausível. A atividade reduzida da MTHFR na presença de variantes heterozigotas e mutantes aumenta a disponibilidade de 5,10-metilenotetrahidrofolato e os metabólitos de folato requeridos para síntese de DNA e divisão celular normal [14]. Entretanto, o polimorfismo A1298C da MTHFR não está associado à elevação da concentração de homocisteína, nem interações com o folato plasmático, que foram observadas com o polimorfismo C677T [15]. O polimorfismo A1298C da MTHFR localiza-se no domínio regulatório S-adenosil-metionina (SAM) da enzima resultando em mudanças conformacionais da enzima MTHFR que inibem sua atividade. Os sítios MTHFR C677T e MTHFR A1298C estão separados por 2,1Kb e apresentam-se em desequilíbrio de ligação [16]. A presença dos dois polimorfismos no mesmo alelo é muito raro. Estes achados

sugerem diferentes efeitos para as alterações dos alelos selvagens. Neste estudo a combinação de heterozigotos foi encontrada numa proporção de casos e controles, respectivamente, porém a combinação de homozigotos 677C>T + heterozigotos A1298C foi observada apenas nos casos e ambos os homozigotos mutantes não foram encontrados. O efeito encontrado no qual a combinação alterada envolveu os casos deve ser avaliada posteriormente em maiores estudos.

Investigações adicionais combinadas com fatores demográficos, dados de exposição ambiental e marcadores moleculares de LMA são necessários para prover mais informações específicas em relação à chance de alterações genéticas e a interações com anormalidades citogenéticas observadas na LMA.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

- [1] S.A. Speer, J.C. Semenza, T. Kurosak, H. Anton-Culver, Risk factors for acute myeloid leukemia and multiple myeloma: a combination of GIS and case-control studies, *Environ Health*. (2002) 64: 9-16.
- [2] T. Look, Oncogenic transcript factors in the human acute leukemias, *Science* (1997) 278: 1059-1064.
- [3] J.D. Licht, D.W. Sternberg, The molecular pathology of acute myeloid leukemia, *Hematology* (2005) 137-142.
- [4] C.F. Skibola, M.T. Smith, E. Kane, E. Roman, S. Rollinson, R.A. Crtwright, G. Morgan, Polimorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults, *PNAS* (1999) 96: 12810-12815.
- [5] J.L. Wiemels, R.N. Smith, G.M. Taylor, O.B. Eden, F.E. Alexander, M.F. Greaves, Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia, *PNAS* (2001) 98: 4004- 4009.
- [6] R.F. Franco, B.P. Simões, L.G. Tone, S.M. Gabellini, M.A. Zago, R.P. Falcao, The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia, *Br. J. Hematol* (2001) 115: 616–618.
- [7] C.W. Zanrosso, A. Hatagima, M. Emerenciano, F. Ramos, A. Figueiredo, T.M. Felix, S.L. Segal, R. Guigliani, M.T. Muniz, M.S. Pombo-de-Oliveira, The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population, *Leu Research – in press* (2005).



- [8] M. Krajcinovic, E. Lemieux-Blanchard, S. Chiasson, M. Primeau, I. Costea, A. Moghrabi, Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Pharmacogenomics J* (2004) 4: 66-72.
- [9] K. Yamada, Z. Chen, K. Rozen R.G. Matthews, Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase, *PNAS* (2001) 98: 14853-14858.
- [10] H.C. Blount, M.M. Mack, C.M. Wehr, J.T. Macgregor, R.A.W. Hiatt, G. Ang, N.S. Wickramasinghe, R.B. Everson, B.N. Ames, Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage, *PNAS* (1997) 94: 3290- 3295.
- [11] S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res* (1988) 16: 1215.
- [12] P. Frosst, H.J. Blom, R. Milos, P. Goyette, C.A. Sheppard, R.G. Matthews, G.J. Boers, M. Den Heuer, L.A. Kluitmans, L.P. Van Den Heuvel, R.A. Rozen, A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation at the methylenetetrahydrofolate reductase locus, *Nat. Gen.* (1995) 10:110 -113.
- [13] D.G. Tenen Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature Reviews* 2003; 3: 89-96.
- [14] L.B. Bailey, J.F. Gregory. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzyme: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 1999; 129: 919-922.
- [15] K. Robien, Ulrich CM. 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE Minireview. *Am J Epidemiol* 2003;157:571-582.
- [16] J. Chen, J. Ma, M.J. Stampfer, et al. Linkage disequilibrium between the 677C>T and 1298A>C polymorphisms in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and their contribution to risk of colorectal cancer. *Pharmacogenetics* 2002;12:339-342.

Tabela 1: Características da amostra analisada

| <b>Características</b> |             | <b>LMA</b>              | <b>Controles</b>         |
|------------------------|-------------|-------------------------|--------------------------|
|                        |             | <b><i>n</i>=182 (%)</b> | <b><i>n</i> =315 (%)</b> |
| <b>Sexo:</b>           | Masculino   | 89 (49,0)               | 151 (48,0)               |
|                        | Feminino    | 93 (51,0)               | 164 (52,0)               |
| <b>Raça:</b>           | Bancos      | 139 (76,0)              | 209 (66,0)               |
|                        | Não-Brancos | 43 (24,0)               | 106 (34,0)               |
| <b>Regiões:</b>        | Sudeste     | 131 (72)                | 150 (48)                 |
|                        | Nordeste    | 34 (19)                 | 93 (29)                  |
|                        | Outras*     | 17 (9)                  | 72(23)                   |
| <b>C667T</b>           | CC          | 93 (51)                 | 156 (49)                 |
|                        | CT          | 67 (37)                 | 128 (41)                 |
|                        | TT          | 22 (12)                 | 31 (10)                  |
| <b>A1298C</b>          | AA          | 104 (57)                | 190 (60)                 |
|                        | AC          | 62 (34)                 | 104 (33)                 |
|                        | CC          | 16 (9)                  | 21 (7)                   |

Tabela 2. Distribuição dos genótipos da MTHFR, de acordo com a raça, em portadores de LMA e controles.

|                    | Polimorfismo      | MTHFR        | LMA<br>n (%) | Controles<br>n (%) | OR (95% CI)        | P-Yates |
|--------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------------|---------|
| <b>Branços</b>     | <b>677C&gt;T</b>  | <b>CC</b>    | 63 (46.3)    | 102(48.8)          | 1.0*               |         |
|                    |                   | <b>CT</b>    | 58 (41.7)    | 84(40.1)           | 1.12 (0.69 – 1.82) |         |
|                    |                   | <b>TT</b>    | 18 (12.9)    | 23 (11.0)          | 1.27 (0.60 – 2.67) |         |
|                    |                   | <b>CT+TT</b> | 76 (54.6)    | 107(51.1)          | 1.15 (0.73 – 1.81) |         |
|                    | <b>1298A&gt;C</b> | <b>AA</b>    | 83 (59.7)    | 117(55.9)          | 1.0*               |         |
|                    |                   | <b>AC</b>    | 42 (30.2)    | 80 (38.2)          | 0.74 (0.45 – 1.21) |         |
|                    |                   | <b>CC</b>    | 14 (10.0)    | 12(5.7)            | 1.64 (0.67 – 4.03) |         |
|                    |                   | <b>AC+CC</b> | 56 (40.2)    | 92(44.0)           | 0.86 (0.54 – 1.36) |         |
| <b>Não-Branços</b> | <b>677C&gt;T</b>  | <b>CC</b>    | 30 (69.7)    | 54 (50.9)          | 1.0*               |         |
|                    |                   | <b>CT</b>    | 9 (20.9)     | 44 (41.5)          | 0.37 (0.14 – 0.92) | 0.030   |
|                    |                   | <b>TT</b>    | 4 (9.3)      | 8 (7.5)            | 0.90 (0.21 – 3.69) |         |
|                    |                   | <b>CT+TT</b> | 13 (30.2)    | 52 (49.0)          | 0.45 (0.20 – 1.02) | 0.055   |
|                    | <b>1298A&gt;C</b> | <b>AA</b>    | 21(48.8)     | 73 (68.8)          | 1.0*               |         |
|                    |                   | <b>AC</b>    | 20 (46.5)    | 24 (22.6)          | 2.90 (1.26 – 6.71) | 0.010   |
|                    |                   | <b>CC</b>    | 2 (4.6)      | 9 (8.4)            | 0.77 (0.11 – 4.32) |         |
|                    |                   | <b>AC+CC</b> | 22 (51.1)    | 33 (31.1)          | 2.32 (1.06 – 5.11) | 0.035   |
| <b>Total</b>       | <b>677C&gt;T</b>  | <b>CC</b>    | 93 (51.1)    | 156 (49.5)         | 1.0*               |         |
|                    |                   | <b>CT</b>    | 67 (36.8)    | 128 (40.6)         | 0.88 (0.58 – 1.32) |         |
|                    |                   | <b>TT</b>    | 22 (12.0)    | 31 (9.8)           | 1.19 (0.62 – 2.27) |         |
|                    |                   | <b>CT+TT</b> | 89 (48.9)    | 159 (50.4)         | 0.94 (0.64 – 1.38) |         |
|                    | <b>1298A&gt;C</b> | <b>AA</b>    | 104 (57.1)   | 190 (60.3)         | 1.0*               |         |
|                    |                   | <b>AC</b>    | 62 (34.0)    | 104 (33.0)         | 1.09 (0.72 – 1.65) |         |
|                    |                   | <b>CC</b>    | 16 (8.7)     | 21(6.6)            | 1.39 (0.66 – 2.93) |         |
|                    |                   | <b>AC+CC</b> | 78(42.8)     | 125(39.6)          | 1.14 (0.77 – 1.68) |         |

(\*) Grupo de referência (OR = 1.0).

## 5 CONCLUSÕES

- Os polimorfismos C677T e A1298C estão envolvidos no processo leucemogênico;
- O genótipo 667CT é um fator de proteção a LMA em crianças não brancas;
- O genótipo 1298AC está associado ao aumento do risco de LMA na população analisada.

## 6 APÊNDICE

Os dados a seguir foram obtidos durante o mestrado, entretanto, o número de pacientes ainda é insuficiente para uma publicação sendo necessário aumentar o tamanho da amostra tanto de indivíduos portadores de LLA como de indivíduos que formarão o grupo controle.

### 6.1 Análise do polimorfismo A2756G do gene MS

#### 6.1.1 Metodologia

##### 6.1.1.1 Coleta do material biológico

Foram obtidos 5mL de amostras sanguíneas por punção venosa periférica, a vácuo com EDTA, para extração de DNA dos leucócitos. A amostra foi imediatamente armazenada a -20oC.

##### 6.1.1.2 Extração do DNA de Amostra de Sangue

O DNA genômico foi isolado dos leucócitos periféricos pelo método de Salting Out (Miller et al, 1988). Inicialmente, foi realizada a lise da membrana plasmática, onde em um tubo eppendorf de 2mL, foi adicionado 300µL de sangue total e 1mL de tampão de lise celular, com 10 minutos de incubação a temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a centrifugação a 13.000rpm por 1 minuto. A próxima etapa, a lise de núcleo, foi proporcionada pela solução de lise nuclear (200µL) e SDS a 10% (50µL) com posterior vórtex vigoroso e adição de proteinase K (10µL – 20mg/mL) seguindo-se banho-maria a 65°C. Em seguida foi feita a remoção de proteínas celulares, através da adição de 175µL de solução de NaCl a 5,3M, e centrifugação a 13.000rpm por 15 minutos. O DNA presente no sobrenadante foi transferido para outro tubo, no qual foi adicionado 1mL de isopropanol, para precipitá-lo e permitir sua visualização, após a agitação do tubo. Posteriormente o DNA foi centrifugado a 13.000rpm por 10 minutos, para a formação do pellet de DNA. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e no eppendorf foi adicionado 1mL de etanol a 70%. Antes da última centrifugação a 13.000rpm por 2 minutos, realizou-se um vórtex rápido. O sobrenadante foi

novamente descartado, para ser adicionado 150µL de solução de reidratação (Tris EDTA, pH 8).

### **6.1.1.3 Amplificação do DNA**

A determinação do polimorfismo MS 2756A→G foi realizada segundo método desenvolvido por Matsuo et al., 2001. O DNA genômico foi amplificado com os primers: 5'-TGTTCCCAGCTGTTAGATGAAAATC-3' e 5'-GATCCAAAGCCTTTTACACTCCTC-3'. A PCR do DNA genômico foi realizada no volume total de 24µL, contendo 2,5µL do primer1 (2,5pmol) e 2,5µL de primer2 (2,5pmol); 13,5µL de H2O milliQ autoclavada; 2,5µL de PCR Buffer (10X) [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)]; 2,0µL de dNTP (1mM); 1,0µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), e 1,25 unidades (5U/µL) de enzima DNA Taq Polimerase (Invitrogen), em termociclador Gradient da Eppendorf. As condições dos ciclos térmicos foram: 2 min de desnaturação a 94°C, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30s (desnaturação), 60°C por 30s (pareamento), e 72°C por 30s (extensão), e uma extensão final por 5 min a 72°C.

### **6.1.1.4 Digestão**

A digestão dos fragmentos amplificados da MS foi feita em reação contendo todo produto amplificado, 8 µL de buffer HaeIII 10X e 0,3µL de HaeIII (Qbiogene), em 37°C por 48h.

### **6.1.1.5 Análise da digestão e determinação dos genótipos**

Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3%, o qual é constituído de 0,9g de agarose, 35mL de solução tampão TBE 1X e 1,8 µL de brometo de etídio (0,5µg/mL), e visualizados em transiluminador de UV (Ultralum). Para a corrida das amostras digeridas foram aplicados 3µL de xilenocianol (loading) nos poços do gel, e submergido em uma solução tampão TBE 1X na cuba eletroforética, em uma voltagem de 100V por 20 min.

Os fragmentos resultantes da digestão são de 211 pb para o alelo A e de 131 e 80 pb para o alelo G. Heterozigotos produzem bandas para cada alelo.

### 6.1.2. Resultados para o polimorfismo A2756G da MS

Foram determinados os perfis genéticos de 41 pacientes portadores de LA e 32 controles para o polimorfismo A2756G da MS. Na tabela 1 pode ser verificado que 54% dos pacientes foram do sexo feminino, enquanto 46% foram do masculino. Nos controles, 72% foram do sexo feminino, enquanto 28% foram do sexo masculino ( $\chi^2=2.522$ ; GL=1). De acordo com a cor, nos pacientes foram encontrados 17% de cor branca, 29% de cor não-branca e 54% não-informados, e nos controles, 41% eram brancos e 59% não-brancos ( $\chi^2=0,072$ ; GL=1). E sobre a procedência dos pacientes, 73% foram de Pernambuco, 25% da Paraíba e 2% do Rio grande do Norte, diferentemente das amostras controles, que tiveram, na totalidade, procedência de Pernambuco ( $\chi^2=16.666$ ; GL=1).

**TABELA3:** Características dos pacientes e controles investigados para o polimorfismo A2756G da MS.

| <b>VARIÁVEIS</b>    | <b>PACIENTES</b> | <b>CONTROLES</b> | <b>P</b> |
|---------------------|------------------|------------------|----------|
| <b>SEXO</b>         |                  |                  |          |
| Feminino            | 22 (54%)         | 23 (72%)         | 0.11*    |
| Masculino           | 19 (46%)         | 9 (28%)          |          |
| <b>COR</b>          |                  |                  |          |
| Branca              | 7 (17%)          | 13 (41%)         | 0,78**   |
| Não branca          | 12 (29%)         | 19 (59%)         |          |
| Não informado       | 22 (54%)         | -                |          |
| <b>PROCEDÊNCIA</b>  |                  |                  |          |
| Pernambuco          | 30 (73%)         | 55 (100%)        | 0.00***  |
| Paraíba             | 10 (25%)         | -                |          |
| Rio Grande do Norte | 1 (2%)           | -                |          |

\* $\chi^2=2.522$ ; GL=1    \*\* $\chi^2=0,072$ ; GL=1    \*\*\* $\chi^2=16.666$ ; GL=1

Na Tabela 2 encontram-se descritas as frequências encontradas dos alelos para o loco A2756G de pacientes e controles. As frequências dos alelos MS 2756G e 2756A foram bastante semelhantes para ambos os grupos ( $\chi^2=0,03$ ;  $p=0,86$ ).

**TABELA 4:** Frequência dos alelos para o polimorfismo do loco A2756G da MS em pacientes com LLA e controles

| <i>ALELOS</i> | <i>PACIENTES</i> | <i>CONTROLES</i> | <i>p</i> |
|---------------|------------------|------------------|----------|
| A2756G        | N = 82           | N = 64           | 0,86*    |
| 2756G         | 15               | 11               |          |
| 2756A         | 67               | 53               |          |

A Tabela 3 apresenta as distribuições genóticas do loco MS A2756G de pacientes e controles. Inicialmente, foi investigado se as prevalências dos genótipos estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, no loco estudado, tanto em pacientes como nos controles. Como foi confirmado o estado de equilíbrio indicando ausência de um mecanismo seletivo para qualquer um dos genótipos, procedeu-se à comparação das proporções dos mesmos entre pacientes LLA e controles, através do qui-quadrado de heterogeneidade. Os dados obtidos não mostraram quaisquer diferenças significantes entre os grupos. A homogeneidade das distribuições genóticas é uma evidência favorável à hipótese de que o loco MS 2756GG não deve estar associado a LLA, em nossas amostras.



**TABELA 5:** Prevalências dos genótipos do loco MS A2756 em pacientes com LLA e indivíduos saudáveis.

| <b>Genótipos</b> | <b>N° de casos (%)</b> | <b>N° de controles (%)</b> | <b>P</b> |
|------------------|------------------------|----------------------------|----------|
| A2756G           | N= 41                  | N= 32                      | 0,72*    |
| AA               | 27 (66%)               | 22 (69%)                   |          |
| AG               | 13 (32%)               | 9 (28%)                    |          |
| GG               | 1 (2%)                 | 1 (3%)                     |          |

\* -  $\chi^2_{h=0,64}$ ; GL=2

Para estimar o papel potencial do homozigoto MS 2756GG, individualmente, em relação aos demais genótipos, quanto à susceptibilidade ao desenvolvimento da LLA, foram calculados as *odds ratios* (OR), cujos resultados estão dispostos na Tabela 4. Apesar da tendência dos portadores dos genótipos MS 2756GG se mostrarem menos susceptíveis a LLA (OR < 1), os resultados não chegaram a ser significantes estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

**TABELA 6:** Susceptibilidade do homozigoto MS 2756GG ao desenvolvimento de LLA, em relação aos demais genótipos

|         | <b>Casos (%)</b> | <b>Controles (%)</b> | <b>OR</b> | <b>95% CI</b> | <b>P</b> |
|---------|------------------|----------------------|-----------|---------------|----------|
| A2756G  | N= 41            | N= 32                |           |               |          |
| AA      | 27 (66%)         | 22 (69%)             | 1         |               |          |
| AG      | 13 (32%)         | 9 (28%)              | 1,17      | 0.42 - 3.26   | 0,95     |
| GG      | 1 (2%)           | 1 (3%)               | 0,81      | -             | 0,56     |
| AG + GG | 14 (34%)         | 10 (31%)             | 1,14      | 0.42 - 2.78   | 0,99     |

### 6.1.3 Discussão dos resultados da análise do polimorfismo A2756G

A MS pode ser alvo de quatro mutações, três silenciosas e apenas uma mutação com mudança de aminoácido, resultando em uma troca de um ácido aspártico com uma glicina, A→G no nucleotídeo 2756. Sua consequência é o aumento na concentração de ácido fólico no plasma, visto que o metil-THF é o substrato da MS para na remetilação da homocisteína para a metionina (Put, 1997).

Embora o impacto funcional direto desse polimorfismo não tenha sido claramente estabelecido, existem evidências que seja um polimorfismo ativo. Em alguns estudos, indivíduos com genótipo mutante para esse polimorfismo apresentam baixa concentração de homocisteína e alta concentração de ácido fólico no soro (Dekou *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001). Outros estudos, entretanto, não sugerem diferenças funcionais (Jaques *et al.*, 2003).

Quanto ao sexo, os resultados do presente trabalho não mostraram diferença significativa na incidência de leucemia entre homens e mulheres nas amostras. Alguns estudos mostram que a incidência de LLA é maior em meninos do que em meninas e esta diferença se acentua na puberdade. Apesar da especulação acerca do possível papel dos hormônios sexuais na leucemogênese, ainda não existe uma explicação plausível para estas diferenças (Pombo-de-Oliveira *et al.*, 2005).

Os resultados para a MS não mostraram diferenças significativas entre os grupos de pacientes e controles em relação à prevalência dos genótipos para o loco A2756G e para a frequência de alelos. Portanto, não foi observada diferença significativa para a redução ao risco de desenvolvimento de LLA do genótipo mutante em relação ao selvagem, embora os resultados sugiram uma pequena redução nesse risco.

Put *et al.* sugerem que a mutação A2756G da MS seja provavelmente um polimorfismo benigno devido a sua razoável prevalência e ausência de efeito no nível de homocisteína em seus trabalhos.

6.2 Dados complementares do manuscrito do artigo científico: “Associação do Polimorfismo C677T, do gene MTHFR, à redução do risco para LMA em crianças não brancas brasileiras”

Os dados apresentados na tabela 5 são referentes as frequências alélicas para os polimorfismos C677T e a1298C nos portadores de LMA analisados e grupo controle de acordo com a região do Brasil. Estes dados são relevantes, mas não são necessários no manuscrito de artigo científico.

Tabela 7: Frequências alélicas para os polimorfismos C677T e A1298C em portadores de LMA e controles de acordo com a região de origem.

| <b>Polimorfismo</b> | <b>LMA</b> | <b>Controles</b> |
|---------------------|------------|------------------|
| <b>Sudeste</b>      |            |                  |
| <b>C677T</b>        |            |                  |
| <b>Alelo C</b>      | 0,66       | 0,70             |
| <b>Alelo T</b>      | 0,34       | 0,30             |
| <b>A1298C</b>       |            |                  |
| <b>Alelo A</b>      | 0,77       | 0,73             |
| <b>Alelo C</b>      | 0,33       | 0,27             |
| <b>Nordeste</b>     |            |                  |
| <b>C677T</b>        |            |                  |
| <b>Alelo C</b>      | 0,86       | 0,58             |
| <b>Alelo T</b>      | 0,14       | 0,42             |
| <b>A1298C</b>       |            |                  |
| <b>Alelo A</b>      | 0,70       | 0,69             |
| <b>Alelo C</b>      | 0,30       | 0,31             |
| <b>Sul</b>          |            |                  |
| <b>C677T</b>        |            |                  |
| <b>Alelo C</b>      | 0,57       | 0,7              |
| <b>Alelo T</b>      | 0,43       | 0,3              |
| <b>A1298C</b>       |            |                  |
| <b>Alelo A</b>      | 0,86       | 0,72             |
| <b>Alelo C</b>      | 0,14       | 0,28             |
| <b>Central</b>      |            |                  |
| <b>C677T</b>        |            |                  |
| <b>Alelo C</b>      | 0,60       | 0,62             |
| <b>Alelo T</b>      | 0,40       | 0,38             |
| <b>A1298C</b>       |            |                  |
| <b>Alelo A</b>      | 0,65       | 0,84             |
| <b>Alelo C</b>      | 0,35       | 0,16             |

### 6.3 Termo de consentimento livre e esclarecido

#### Afirmação introdutória

A criança pela qual você responde frente à equipe médica está sendo convidada a participar de um estudo de investigação clínica para decidir se deseja ou não que ela participe, você precisa entender os benefícios e riscos do mesmo, a fim de formar a sua opinião.

#### Objetivo do estudo

O médico diagnosticou na criança que você acompanha uma doença conhecida como leucemia, que é caracterizada por uma produção anormal de glóbulos brancos no sangue e acúmulo de células jovens anormais na medula óssea. Neste estudo, não serão administrados medicamentos para esta doença, mas através de uma coleta única de sangue, poderão ser determinadas características genéticas (características que vem de nossos pais) que possam estar associadas com alterações que poderão estar ligadas a leucemia. Farão parte deste estudo crianças que apresentem leucemias linfóide agudas. Através do estudo das características genéticas, ou seja, relacionadas com a leucemia poderão ser reconhecidos novos fatores de risco delas.

#### Procedimentos a serem seguidos

Após você ter assinado o Consentimento Informado, será coletada uma amostra de sangue para os exames de laboratório. Através destes exames serão verificadas características genéticas e fenotípicas que poderão estar associadas com as leucemias. A criança continuará a tomar todos os remédios que vem fazendo uso, ou a critério de seu médico estes poderão ser modificados no futuro se os seus exames revelarem que outros poderiam ser mais apropriados. O estudo constará de apenas uma visita médica e coleta de sangue. A criança continuará a receber a assistência ambulatorial que já vinha sendo oferecida, sem prejuízo ou interrupção de medicamentos que porventura já esteja fazendo uso.

#### Desconforto e riscos

Nenhum novo medicamento ou forma de tratamento será testado na criança não apresentando nenhum desconforto, pois a coleta de sangue será realizada no momento do diagnóstico ou durante o tratamento sendo aproveitado para tanto o sangue que normalmente é coletado para acompanhamento médico.

### Exclusões

Se você não entender alguma palavra do texto, peça explicações ao seu médico.

### Benefícios aos participantes

A leucemia representa um grupo de doenças malignas que poderão incapacitar o paciente ou mesmo levá-lo à morte. Ao deixar a criança pela qual você é o responsável frente ao médico, enfermeiras e demais membros da equipe participar de estudos como este você colaborará para que um maior conhecimento médico e científico das leucemias em nosso país seja conseguido.

### Confidencialidade

A menos que sejam requeridos por lei, apenas o investigador, o comitê de revisão e a Comissão de Ética irão ter acesso a dados confidenciais que identificam o paciente. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou em publicações, no entanto você e a criança não serão identificadas nestas apresentações. Todo o material biológico coletado neste estudo será exclusivamente utilizado para as pesquisas de variantes genéticas e fenotípicas especificadas no protocolo, podendo ainda ser examinadas e descritas novas características genéticas relacionadas às leucemias. Este material não será utilizado para outros estudos ou utilizado para outros fins.

### Novas descobertas

Se no decorrer deste estudo ou ao seu final surgir alguma conclusão relevante para benefício no tratamento da leucemia você será informado a respeito.

## Pessoas para contato

O pesquisador ou seu substituto responderá a todas as perguntas, se você tiver questões adicionais no decorrer deste estudo sobre a pesquisa ou seus direitos como um participante da pesquisa, poderá dirigi-las à professora Maria Tereza Cartaxo Muniz, Instituto de Ciências Biológicas, Disciplina de Bioquímica fones: 3423-8112 ou 3423-8582 ou professora Elizabete Malaquias Freitas Instituto de Ciências Biológicas Disciplina de Genética fone: 3222-1127.

## Participação voluntária

A criança está participando voluntariamente deste estudo. Você pode se recusar a deixá-la participar do mesmo a qualquer momento, sem penalidades nem perda dos benefícios que ela já tem direito.

## Consentimento Informado

Li o texto acima e estou ciente do conteúdo deste formulário de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Autorizarei a criança que acompanho em participar. Recebi uma cópia deste formulário de consentimento.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável: \_\_\_\_\_

data: \_\_/\_\_/\_\_

Nome do investigador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

data: \_\_/\_\_/\_\_

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_

data: \_\_/\_\_/\_\_

Pessoa que conduziu o Termo de Consentimento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

data: \_\_/\_\_/\_\_

6.4 Artigo científico in press: “The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population”

**“The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population”**

Crisiane Wais Zanrosso<sup>a</sup>, Ana Hatagima<sup>b</sup>, Mariana Emerenciano<sup>a</sup>, Flávio Ramos<sup>c</sup>, Alexandre Figueiredo<sup>a</sup>, Têmis Maria Félix<sup>d</sup>, Sandra L. Segal<sup>d</sup>, Roberto Guigliani<sup>d</sup>, Maria Tereza Cartaxo Muniz<sup>c</sup>, Maria S. Pombo-de-Oliveira<sup>a</sup>,

a Divisão de Medicina Experimental, Centro de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti, 37, CEP 20231-050 Rio de Janeiro, Brazil

b Departamento de Genética, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

c Divisão de Biologia Molecular do Departamento de Biologia do ICB-UPE, Recife, Pernambuco, Brazil

d Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Este artigo foi produzido durante o período de realização do mestrado a partir da parceria científica entre o Instituto Nacional de Câncer representado pela Dr<sup>a</sup> Maria do Socorro Pombo de Oliveira e o Centro de Oncologia pediátrica da Universidade de Pernambuco representado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Tereza Cartaxo Muniz. O mestrando e sua co-orientadora foram co-autores do presente artigo.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Leukemia Research 30 (2006) 477–481

---

**Leukemia  
Research**


---

[www.elsevier.com/locate/leukres](http://www.elsevier.com/locate/leukres)

Brief communication

## The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population

Crisiane Wais Zanrosso<sup>a</sup>, Ana Hatagima<sup>b</sup>, Mariana Emerenciano<sup>a</sup>, Flávio Ramos<sup>c</sup>, Alexandre Figueiredo<sup>a</sup>, Têmis Maria Félix<sup>d</sup>, Sandra L. Segal<sup>d</sup>, Roberto Guigliani<sup>d</sup>, Maria Tereza Cartaxo Muniz<sup>c</sup>, Maria S. Pombo-de-Oliveira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Divisão de Medicina Experimental, Centro de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti, 37, CEP 20231-050 Rio de Janeiro, Brazil*

<sup>b</sup> *Departamento de Genética, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil*

<sup>c</sup> *Divisão de Biologia Molecular do Departamento de Biologia do ICB-UPE, Recife, Pernambuco, Brazil*

<sup>d</sup> *Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

Received 30 May 2005

Available online 22 September 2005

---

### Abstract

The polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene are associated with leukemogenesis. In order to investigate the influence of two polymorphisms in the *MTHFR* gene, 677C>T and 1298A>C, on the risk of acute lymphoblastic leukemia (ALL) we performed a case-control study in children from different Brazilians' regions. Genotyping of 176 ALL and 199 unselected healthy subjects was performed using PCR-RFLP assay. There was no association between the 677C>T or 1298A>C and risk of ALL in total case-control sample. However, 677T allele was linked to a decrease risk of ALL [odds ratio (OR), 0.43; 95% confidence interval (CI), 0.22–0.86], whereas the 1298A>C polymorphism presents an elevated risk factor [OR, 2.01; 95% CI, 1.01–3.99] in non-White children. Our investigation provides interesting data concerning the opposite effect of A1298C polymorphisms, particularly in the light of relatively scarce data regarding the *MTHFR* role in leukemia susceptibility in different populations.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *MTHFR*; Polymorphism; Childhood acute leukemia

---

### 1. Introduction

Recently, inheritance of mutant alleles of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) has been linked to the risk of molecularly defined acute lymphoblastic leukemia (ALL) subtypes according to epidemiological studies [1]. The rationale is that the folate metabolism pathways lead to the irreversible conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to

5-methylenetetrahydrofolate, toward methionine and DNA synthesis. Folate deficiency has been associated with uracil miss incorporation into DNA, leading to double strand DNA breaks during uracil excision repair and increasing the risk of chromosomal aberrations that is presumably the onset of the leukemogenic process [2]. Furthermore, the value of folate supplementation during pregnancy was shown to prevent acute leukemia in children. The results strongly suggest that genetic polymorphisms and environment interaction might play a role in the susceptibility to childhood ALL [3]. In order to understand the multi-factors that influence the leukemogenesis in a heterogeneous population, we investigated the influence of two polymorphisms of the *MTHFR* gene, 677C>T and 1298A>C, on the risk of ALL in three different regions in Brazil.

**Abbreviations:** ALL, acute lymphoblastic leukemia; BpALL, B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia; CI, confidence interval; GBTLI, Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemias Infantis; *MTHFR*, methylenetetrahydrofolate reductase; na, not applied; OR, odds ratio; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 32331324; fax: +55 21 32331470.  
E-mail address: [mpombo@inca.gov.br](mailto:mpombo@inca.gov.br) (M.S. Pombo-de-Oliveira).

0145-2126/\$ – see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.leukres.2005.08.008



Table 1  
Main characteristics of ALL and controls

| Characteristic    | Case, n=176 (%) | Control, n=199 (%) |
|-------------------|-----------------|--------------------|
| Sex               |                 |                    |
| Male              | 92 (52.3)       | 83 (41.7)          |
| Female            | 84 (47.7)       | 116 (58.3)         |
| Race              |                 |                    |
| White             | 94 (53.4)       | 120 (60.3)         |
| Non-White         | 82 (46.6)       | 79 (39.7)          |
| Acute leukemia    |                 |                    |
| BpALL             | 167 (94.9)      | na                 |
| T-ALL             | 9 (5.1)         | na                 |
| Regions of Brazil |                 |                    |
| South             | 15 (8.5)        | 57 (28.7)          |
| Southeast         | 79 (44.9)       | 59 (29.6)          |
| Northeast         | 82 (46.6)       | 83 (41.7)          |
| Total             | 176 (100)       | 199 (100)          |

n: total number; BpALL: B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia; T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia; na: not applied.

## 2. Methods

### 2.1. Subjects

A series of 176 children with ALL was subjected to immune-molecular studies including genetic polymorphism analysis before any chemotherapeutic treatment. Cases evaluated in this study came from three different Brazilian regions: (i) Rio de Janeiro, São Paulo and Minas Gerais (Southeast region); (ii) Pernambuco, Paraíba and Bahia (Northeast region); (iii) Santa Catarina e Rio Grande do Sul (South region). The main clinical and demographical characteristics of cases and controls are shown in Table 1. The majority of the cases (95%) were B-cell precursor ALL (BpALL) with the mean age of 6.2 years old, whereas in control group, the mean age was 25 years old. The proportion of ALL enrolled in the *Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemia Infantil* [GBTLI-93,99] clinical trials was estimated in 85% of cases.

Controls consisted of blood samples obtained from unselected healthy subjects from the same regions of cases (n=199). Informed consent was obtained from all parents or responsible for the subject, after easy-to-understand explanations of the issues related to this study. The race variables were considered according to the definition of skin colour complexion provided by the mother of each child and by the interviewers of the cases and controls. Because of the heterogeneous phylogeography of the Brazilians, the distribution in this study was categorized into two major groups: Whites (mainly Brazilians from European descent) and non-Whites (admixture of Amerindians, Europeans and Africans).

### 2.2. Genotyping of MTHFR variants

Genotyping was performed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique on DNA

from peripheral blood samples as previously described by Wiemels et al. [1].

### 2.3. Statistical analysis

Maximum likelihood method was used to estimate the allelic frequencies and the goodness of fit of phenotype distribution to Hardy–Weinberg equilibrium was tested by chi-square. Comparison among race and region groups was performed through contingency tables analyzed by chi-square or Fisher exact test. The analysis was carried out using the SPSS Statistical Package (Version 11.5) to estimate odds ratios (OR) and confidence intervals at 95% (95% CI) significance level.

## 3. Results

The frequencies of mutant alleles ( $\pm$ standard error) in ALL and controls are  $0.25 \pm 0.02$  and  $0.31 \pm 0.02$  for MTHFR 677T and  $0.28 \pm 0.02$  and  $0.25 \pm 0.02$  for MTHFR 1298C, respectively. Both groups, ALL cases and controls, showed a good fit to Hardy–Weinberg's genetic equilibrium model in relation to observed and expected genotypic frequencies for MTHFR 677C>T and 1298A>C polymorphisms (data not shown). Table 2 shows the frequencies of MTHFR 677 genotypes, as well as, MTHFR 1298 genotypes and, MTHFR 677C>T and 1298A>C polymorphisms distribution in cases and controls, in different Brazilian regions. There was no association between the 677C>T or 1298A>C and risk of ALL in total case–control sample, but the OR for ALL linked to MTHFR 677CT heterozygotes was 0.49 (95% CI, 0.23–1.00) in Northeast region. The distribution of MTHFR genotypes according to race is shown in Table 3. In non-White children a protective effect for 677C>T was found for both heterozygotes [OR, 0.46; 95% CI, 0.22–0.97] and overall (CT+TT) [OR, 0.43; 95% CI, 0.22–0.86]. On the other hand, an increased risk of ALL was observed in 1298A>C for both heterozygotes [OR, 2.10; 95% CI, 1.03–4.29] and overall (AC+CC) [OR, 2.01; 95% CI, 1.01–3.99]. No associations were observed in White children group in all analysis performed. In order to identify which factor (geographical or race) was responsible for the associations found, an independent analysis of the Northeast region, stratified by race, was performed in Table 4. This resulted in a drawback related to the small number of subjects. Significant associations were observed only in non-White children [OR, 0.33; 95% CI, 0.13–0.82] for 677C>T and [OR, 2.93; 95% CI, 1.22–7.08] for 1298A>C.

## 4. Discussion

The causes of the majority of ALL are unknown and commonly involve gene–environment interactions that may result in chromosome translocations. This study showed a

Table 2  
Distribution of *MTHFR* genotypes in ALL and controls according to region of Brazil

| Polymorphism | <i>MTHFR</i> | ALL, n (%) | Controls, n (%) | ALL vs. controls, OR (95% CI) |
|--------------|--------------|------------|-----------------|-------------------------------|
| South        |              |            |                 |                               |
| 677C>T       | CC           | 8 (57.2)   | 29 (51.8)       | 1.0 <sup>a</sup>              |
|              | CT           | 5 (35.7)   | 20 (35.7)       | 0.91 (0.22–3.7)               |
|              | TT           | 1 (7.1)    | 7 (12.5)        | 0.52 (0.02–5.54)              |
|              | CT+TT        | 6 (42.8)   | 27 (48.2)       | 0.81 (0.21–3.02)              |
| 1298A>C      | AA           | 4 (36.4)   | 30 (52.6)       | 1.0 <sup>a</sup>              |
|              | AC           | 5 (45.4)   | 23 (40.3)       | 1.63 (0.33–8.35)              |
|              | CC           | 2 (18.2)   | 4 (7.1)         | 3.75 (0.34–40.39)             |
|              | AC+CC        | 7 (63.6)   | 27 (47.4)       | 1.94 (0.44–9.04)              |
| Southeast    |              |            |                 |                               |
| 677C>T       | CC           | 39 (53.4)  | 27 (45.7)       | 1.0 <sup>a</sup>              |
|              | CT           | 29 (39.8)  | 25 (42.4)       | 0.80 (0.36–1.77)              |
|              | TT           | 5 (6.8)    | 7 (11.9)        | 0.49 (0.12–1.99)              |
|              | CT+TT        | 34 (46.6)  | 32 (54.3)       | 0.74 (0.35–1.55)              |
| 1298A>C      | AA           | 40 (52.0)  | 31 (52.5)       | 1.0 <sup>a</sup>              |
|              | AC           | 31 (40.2)  | 23 (39.0)       | 1.04 (0.48–2.27)              |
|              | CC           | 6 (7.9)    | 5 (8.5)         | 0.93 (0.22–3.94)              |
|              | AC+CC        | 37 (48.0)  | 28 (47.5)       | 1.02 (0.49–2.14)              |
| Northeast    |              |            |                 |                               |
| 677C>T       | CC           | 49 (62.9)  | 40 (48.2)       | 1.0 <sup>a</sup>              |
|              | CT           | 22 (28.2)  | 37 (44.6)       | 0.49 (0.23–1.00)              |
|              | TT           | 7 (8.9)    | 6 (7.2)         | 0.95 (0.26–3.53)              |
|              | CT+TT        | 29 (37.1)  | 43 (51.8)       | 0.55 (0.28–1.08)              |
| 1298A>C      | AA           | 39 (48.7)  | 50 (60.2)       | 1.0 <sup>a</sup>              |
|              | AC           | 38 (47.5)  | 30 (36.2)       | 1.62 (0.82–3.23)              |
|              | CC           | 3 (3.8)    | 3 (3.6)         | 1.28 (0.19–8.55)              |
|              | AC+CC        | 41 (51.2)  | 33 (39.8)       | 1.59 (0.82–3.11)              |
| Total        |              |            |                 |                               |
| 677C>T       | CC           | 96 (58.2)  | 96 (48.5)       | 1.0 <sup>a</sup>              |
|              | CT           | 56 (33.9)  | 82 (41.4)       | 0.68 (0.43–1.09)              |
|              | TT           | 13 (7.9)   | 20 (10.1)       | 0.65 (0.29–1.46)              |
|              | CT+TT        | 69 (41.8)  | 102 (51.5)      | 0.68 (0.44–1.05)              |
| 1298A>C      | AA           | 83 (49.4)  | 111 (55.8)      | 1.0 <sup>a</sup>              |
|              | AC           | 74 (44.1)  | 76 (38.2)       | 1.30 (0.83–2.04)              |
|              | CC           | 11 (6.5)   | 12 (6.0)        | 1.23 (0.48–3.15)              |
|              | AC+CC        | 85 (50.6)  | 88 (44.2)       | 1.29 (0.84–1.99)              |

<sup>a</sup> Reference group (OR = 1.0).

protective role of *MTHFR* 677C>T polymorphism in non-White children, linked to a significant 2.18-fold decreased risk of developing ALL, whereas the 1298A>C polymorphism demonstrated a significant 2.01-fold increased risk for ALL. These risks were noteworthy when only the Northeast region was analyzed: 3.00-fold decreased risk for *MTHFR* 677C>T and 2.93-fold increased risk for 1298A>C of developing ALL, in non-White children. The frequencies of the different subtypes of ALL have been related to age, ethnicity and social conditions in different countries and folate deficiency has been associated with uracil misincorporation into DNA and the increased risk of chromosomal aberrations [2]. For instance, a case-control study with Australian children demonstrated that folate supplementation during pregnancy reduced the risk of ALL, and that the protective effect of the *MTHFR* polymorphisms

depended on adequate folate intake [4]. Franco et al. also demonstrated a reduced risk of ALL [OR, 0.4 (0.2–0.8)] associated with 677T allele, and no significant association with 1298A>C genotypes, however their data suggested a trend to risk factor to 1298A>C [5]. This Brazilian study was small and characterized in its majority by White children, while in our cohort the non-White children are well represented.

The opposite effect of 1298A>C polymorphisms in our study was surprising when compared to other reports about leukemia susceptibility. In addition, malnutrition in lower socio-economic status was associated with ethnicity of African descent in Brazil [6]. Therefore, further studies are necessary to explain how these combined risk factors, 1298A>C and lack of folate supplementation influence the high risk in the leukemogenesis process.

Table 3  
Distribution of *MTHFR* genotypes in ALL and controls according to race

| Polymorphism | <i>MTHFR</i> | ALL, n (%) | Controls, n (%) | ALL vs. controls, OR (95% CI) | <i>P</i> , Yates corrected |
|--------------|--------------|------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------|
| White        |              |            |                 |                               |                            |
| 677C>T       | CC           | 43 (50.0)  | 59 (49.6)       | 1.0 <sup>a</sup>              |                            |
|              | CT           | 35 (40.7)  | 50 (42.0)       | 0.96 (0.50–1.80)              |                            |
|              | TT           | 8 (9.3)    | 10 (8.4)        | 1.10 (0.36–3.34)              |                            |
|              | CT+TT        | 43 (50.0)  | 60 (50.4)       | 0.98 (0.54–1.78)              |                            |
| 1298A>C      | AA           | 48 (53.3)  | 62 (51.7)       | 1.0 <sup>a</sup>              |                            |
|              | AC           | 35 (38.9)  | 50 (41.6)       | 0.90 (0.49–1.67)              |                            |
|              | CC           | 7 (7.8)    | 8 (6.7)         | 1.13 (0.34–3.75)              |                            |
|              | AC+CC        | 42 (46.7)  | 58 (48.3)       | 0.94 (0.52–1.68)              |                            |
| Non-White    |              |            |                 |                               |                            |
| 677C>T       | CC           | 53 (67.0)  | 37 (46.8)       | 1.0 <sup>a</sup>              |                            |
|              | CT           | 21(26.6)   | 32 (40.5)       | 0.46 (0.22–0.97)              | 0.040                      |
|              | TT           | 5 (6.4)    | 10 (12.7)       | 0.35 (0.09–1.24)              |                            |
|              | CT+TT        | 26 (32.9)  | 42 (53.2)       | 0.43 (0.22–0.86)              | 0.015                      |
| 1298A>C      | AA           | 35 (44.9)  | 49 (62.0)       | 1.0 <sup>a</sup>              |                            |
|              | AC           | 39 (50.0)  | 26 (32.9)       | 2.10 (1.03–4.29)              | 0.040                      |
|              | CC           | 4 (5.1)    | 4 (5.1)         | 1.40 (0.27–7.28)              |                            |
|              | AC+CC        | 43 (55.1)  | 30 (38.0)       | 2.01 (1.01–3.99)              | 0.046                      |

<sup>a</sup> Reference group (OR = 1.0).

Table 4  
Distribution of *MTHFR* genotypes in childhood leukemia and controls according to race in the Northeast region

| Polymorphism         | <i>MTHFR</i> | ALL, n (%) | Controls, n (%) | ALL vs. controls, OR (95% CI) | <i>P</i> , Yates corrected |
|----------------------|--------------|------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------|
| Northeast, White     |              |            |                 |                               |                            |
| 677C>T               | CC           | 13(46.4)   | 16 (51.6)       | 1.0 <sup>a</sup>              |                            |
|                      | CT           | 11(39.3)   | 14(45.1)        | 0.97 (0.29–3.26)              |                            |
|                      | TT           | 4(14.3)    | 1(3.2)          | 4.92 (0.41–131.28)            |                            |
|                      | CT+TT        | 15 (53.6)  | 15 (48.4)       | 1.23 (0.39–3.89)              |                            |
| 1298A>C              | AA           | 20 (68.9)  | 17 (54.8)       | 1.0 <sup>a</sup>              |                            |
|                      | AC           | 9 (31.1)   | 13 (41.9)       | 0.59 (0.18–1.94)              |                            |
|                      | CC           | 0(0)       | 1 (3.3)         | 0.0 (0.0–16.21)               |                            |
|                      | AC+CC        | 9 (31.1)   | 14 (45.2)       | 0.55 (0.17–1.78)              |                            |
| Northeast, non-White |              |            |                 |                               |                            |
| 677C>T               | CC           | 36 (72.0)  | 24 (46.2)       | 1.0 <sup>a</sup>              |                            |
|                      | CT           | 11 (22.0)  | 23 (44.2)       | 0.32 (0.12–0.84)              | 0.018                      |
|                      | TT           | 3 (6.0)    | 5 (9.6)         | 0.40 (0.07–2.19)              |                            |
|                      | CT+TT        | 14 (28.0)  | 28 (53.8)       | 0.33 (0.13–0.82)              | 0.014                      |
| 1298A>C              | AA           | 19 (37.3)  | 33 (63.5)       | 1.0 <sup>a</sup>              |                            |
|                      | AC           | 29(56.8)   | 17 (32.7)       | 2.96 (1.20–7.36)              | 0.016                      |
|                      | CC           | 3 (5.9)    | 2 (3.8)         | 2.61 (0.31–24.96)             |                            |
|                      | AC+CC        | 32 (62.7)  | 19 (36.5)       | 2.93 (1.22–7.08)              | 0.014                      |

<sup>a</sup> Reference group (OR = 1.0).

### Acknowledgments

This work was supported in part by a grant-in-aid from the CNPq (No. 550891/01-3) and INCA-FAF/Swiss Bridge Foundation (No. 230150-4). M.S.P.O. provided conception, design, analyzed all data collected through the *Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia* and also reviewed the manuscript; C.W.Z., F.R., T.M.F., M.E. and A.F. performed techniques regarding molecular data; A.H., C.W.Z. and M.E. performed the statistical analysis and wrote the manuscript; S.L.S., R.G. and M.T.C.M. helped in the assembly of control samples. The authors are grateful to Dr.

Alessandra Splendore for helpful comments and reviewing this manuscript. We thank Dr. Marcelo Reis for helping in the technique standardization.

### References

- [1] Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylentetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4004–9.
- [2] Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation

- into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3290–5.
- [3] Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard E, Theoret Y, Moghrabi A, et al. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:252–7.
- [4] Thompson JR, Gerald PF, Willoughby ML, Armstrong BK. Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against acute lymphoblastic leukaemia in childhood: a case-control study. *Lancet* 2001;358:1935–40.
- [5] Franco RF, Simoes BP, Tone LG, Gabellini SM, Zago MA, Falcao RP. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;115:616–8.
- [6] Chor D, Faerstein E, Kaplan GA, Lynch JW, Lopes CS. Association of weight change with ethnicity and life course socioeconomic position among Brazilian civil servants. *Int J Epidemiol* 2004;33:100–6.

## 7 ANEXOS

### 7.1 Instrução para autores - revista Genetics and Molecular Biology

#### Scope and policy

Genetics and Molecular Biology (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although Genetics and Molecular Biology is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal as judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board are reviewed by the Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

#### Submission of papers

1. Manuscripts should be submitted to Fábio de Melo Sene, Editor-in-Chief in the address below.

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere.

A copy of the manuscript, including original figures.

A copy of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.

A copy of the text, tables and figures on a disk. Be sure that the disk is adequately protected. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.g). Disk must be labeled with the first author's last name, platform and software. (See detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution, and manuscripts may be returned before being reviewed.

### 3. Categories of Contribution

#### 3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

- a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.
- b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.
- c) The text must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use "et

al". Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name ("et al" should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. Binomial Names: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should be in the Title.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: citations must be ordered alphabetically by the first author; only articles that are published or in press should be included; personal communications must be cited within the text; journal titles must be abbreviated according to Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>).

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet* 1:103-120.

Sample book citation:

Salzano FM and Freire-Maia N (1967) *Populações Brasileiras*. Companhia Editora Nacional and EDUSP, São Paulo, 178 pp.

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Carvalho A, Monaco LC and Krug CA (1966) Melhoramento genético das plantas e sua repercussão econômica. In: Pavan C and da Cunha AB (eds) *Elementos de Genética*. 2nd ed. EDUSP and Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp 587-653.

Sample abstracts in meeting citation:

Basile R (1973) Cromossomos Politénicos em células nutritivas de ovócitos de ovário atrofiado de *Rhyncosciara*. *Ciênc e Cult* 25 (suppl): 248. XXV Reunião Anual da SBPC, Rio de Janeiro, Brazil.

Sample Thesis/Dissertation citation:

Frota-Pessoa O (1953) Revision of the *Tripunctata* group of *Drosophila* with description of fifteen new species. PhD Thesis, Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.

Sample Electronic Article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD, Van Dyke T (2004) pRb Inactivation in Mammary Cells Reveals Common Mechanisms for Tumor Initiation and Progression in Divergent Epithelia. *Plos Biol* 2: 194-205. <http://www.plosbiology.org>.

Sample Electronic Database citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), [www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM)

f) Tables each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

g) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. A set of original illustrations of the highest quality must be provided in glossy paper. If you have created figures electronically submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF



or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

- h) Nomenclature: current standard international nomenclature should be adhered to.
- i) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.
- j) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.
- k) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the work was approved by the institutional review board. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

3.2 Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews: publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories: accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs: Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

5. Reprints are free of charge and provided as a pdf-file

## 7.2 Instrução para autores – revista Cancer Letters



Cancer Letters 232 (2006) 121–122

[www.elsevier.com/locate/canlet](http://www.elsevier.com/locate/canlet)

### Instructions to authors

#### Aims and scope

CANCER LETTERS is a journal providing rapid publication of brief articles in the broad area of cancer research. The journal places emphasis on the molecular and cell biology of cancer, oncogenes, carcinogenesis, radiation biology, molecular pathology, hormones and cancer, viral oncology, biology of cancer and metastasis, molecular cytogenetics, epidemiology, and experimental therapeutics. The primary criterion for publication is interest to a multidisciplinary audience. Papers should be brief but technically sound and substantiated by sufficient experimental detail. Clinical papers will be accepted if they contribute to the understanding of the basic mechanisms underlying disease.

**Types of papers:** Papers should deal with original research not previously published or being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to the journal carries with it the right to publish that paper. The main object of the journal is the publication of original research papers with application to the human species. These should appeal to clinicians and research workers alike.

**Submission of manuscripts:** *Cancer Letters* has moved to an online submission and review system. Manuscripts should be submitted online at <http://www.ees.elsevier.com/can> and the instructions on the site should be closely followed. Authors may submit manuscripts and track their progress through to final decision. Reviewers can download manuscripts and submit their reports to the Managing Editors.

**Submission** of a paper to CANCER LETTERS is understood to imply that it is not being considered for publication elsewhere and that the author's permission to publish his/her article(s) in this journal implies the exclusive authorisation of the publisher to deal with all issues concerning the copyright therein. Submission of multi-authored manuscripts implies the consent of each of the authors. The Publisher will assume that the senior or corresponding author has specifically obtained the approval of all other co-authors to submit the article to this journal.

**Manuscripts** should be submitted to one of the Managing Editors as listed above; should be in English; should be submitted in triplicate (including three sets of illustrations to facilitate refereeing, together with a matching file on disk); should not be longer than 6 printed pages (approx. 12 double-spaced typewritten pages) including the space needed for illustrations; revised manuscripts should also be submitted in triplicate. Authors' full names, academic or professional affiliations, and addresses should be included on the first page. The name and complete address of the author to whom any correspondence is to be sent should be given. Telephone and FAX numbers and the email address of the corresponding author should also be provided where possible. Authors should supply the names and addresses of up to 5 potential reviewers for their manuscript. E-mail submission of manuscripts as attached files is encouraged where possible.

**Title** should be informative and preferably not exceed 185 characters, including spaces. Extraneous words such as 'study' 'investigation', etc. should be avoided.

**Summary** not exceeding 80–100 words should be given at the beginning of the paper, followed by 3–6 indexing terms (keywords).

**Tables** should be typed, with double spacing, each on a separate sheet, numbered consecutively with Roman numerals, and should only contain horizontal lines. A short descriptive heading should be given above each table, and any footnotes and explanations underneath.

**Figures** must be numbered and keyed into the text. The author's name, the figure number and an arrow clarifying orientation should be appended to the reverse of each illustration. Line drawings (including graphs) must be in black ink on white paper. Alternatively, sharp photoprints on glossy paper may be provided. The lettering should be large enough to permit photographic reduction. Halftone illustrations may be included. They should be submitted as black and white prints on glossy paper and have as much contrast as possible. All legends should be typed on a separate sheet of paper. Illustrations should be designed for use in either a single column (7.5 cm) or a double column (16 cm). Actual magnification of all photomicrographs should be indicated by a micron bar on the legend.

**Colour illustrations:** Submit colour illustrations as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. Polaroid colour prints are *not* suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>.

122

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations.

**References** should be numbered and listed on a separate sheet. In the text they should be referred to by their numbers in square brackets. Literature references must conform to the following examples. The abbreviation of journal titles should conform to those adopted by the International Serials Catalogue. For example:

- [1] E.R. Smith, D.R. Redwood, W.E. McCarron, S.E. Epstein, Coronary artery occlusion in the conscious dog: effects of alterations in arterial pressure produced by nitroglycerine, hemorrhage, and alpha-adrenergic agonists on the degree of myocardial ischemia, *Circulation* 47 (1973) 1–36.
- [2] R.A. Massumi, C.J. De Sando, Intra-arterial and esophageal electrography in the diagnosis of complex arrhythmias, in: R.C. Schlant, J.W. Hurst (Eds.), *Advances in Electrocardiography*, Grune and Stratton, New York, 1972, pp. 229–248.

Numbered references to personal communications, unpublished data and manuscripts either 'in preparation' or 'submitted for publication' should not be included. If essential, such material may be incorporated at the appropriate place in the text.

**Authors in Japan please note:** if you would like information about how to have the English of your paper checked, corrected and approved (*before submission*), please contact our Tokyo office who will inform you of the services provided by language correctors: Elsevier Science, 9–15, Higashi Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106, Japan; Tel. +81 3 5561 5033; Fax +81 3 5561 5047; E-mail; info@elsevier.co.jp

**Electronic manuscripts** have the advantage that there is no need for the rekeying of text, thereby avoiding the possibility of introducing errors and resulting in reliable and fast delivery of proofs. The preferred storage medium is a 5¼ or 3½ inch disk in MS-DOS format, although other systems are welcome, e.g., Macintosh (in this case, save your file in the usual manner, do not use the option 'save in MS-DOS format'); if you use NEC, please submit your article on a double density or high density 5¼ inch disk or double density 3½ inch disk (not a high density 3½ inch disk). Please do not split the article into separate files (title page as one file, text as another, etc.). Ensure that the letter 'l' and digit '1' (also letter 'O' and digit '0') have been used properly, and structure your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your wordprocessor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open but indicated by a unique code (e.g. galpha, @, #, etc., for the Greek letter  $\alpha$ ). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your wordprocessor to introduce word splits and do not use a 'justified' layout. Please adhere strictly to the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. It is very important that you save your file in the wordprocessor format. If your wordprocessor features the option to save files 'in flat ASCII', please do not use it. Format your disk correctly and ensure that only the relevant file (one complete article only) is on the disk. Also, specify the type of computer and wordprocessing package used and label the disk with your name and the name of the file on the disk. After final acceptance, your disk plus one, final, printed and exactly matching version (as a printout) should be submitted together. **It is important that the file on disk and the printout are identical.** Further information may be obtained from the Publisher.

**Copyright:** Upon acceptance of an article, Authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright, see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding Author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided.

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: Tel. (+1) 215 238 7869; Fax (+1) 215 238 2239, e-mail [healthpermissions@elsevier.com](mailto:healthpermissions@elsevier.com). Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

**Proofreading** When you receive a (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible.

**Reprints.** A total of 50 reprints of each paper will be provided free of charge. Additional copies may be ordered at prices shown in the reprint order form which will be sent to the author.

#### Author enquiries

Authors can also keep track of the progress of their accepted article, and set up email alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's Author Gateway (<http://authors.elsevier.com>).

For specific enquiries on the preparation of electronic artwork, consult <http://authors.elsevier.com>

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.

CANCER LETTERS has no page charges.