

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

Farmacogenómica na Terapêutica das Leucemias Agudas

Tatiana Isabel Silvestre Machado

Dissertação

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Prof.^a Doutora Vera Ribeiro

2013

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

Farmacogenómica na Terapêutica das Leucemias Agudas

Tatiana Isabel Silvestre Machado

Dissertação

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Prof.^a Doutora

Vera Ribeiro

2013



Farmacogenómica na Terapêutica das Leucemias Agudas

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Tatiana Isabel Silvestre Machado

Copyright Tatiana Isabel Silvestre Machado

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A todos aqueles que me apoiaram, direta ou indiretamente, ao longo deste trabalho, quero manifestar o meu sincero agradecimento.

Aos meus pais e aos meus padrinhos, por me ensinarem que enquanto der o máximo de mim, hei-de conseguir sempre aquilo que quero, pela forma como me inculiram a alegria de viver, e a confiança necessária para realizar os meus sonhos. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. A eles, dedico todo este trabalho.

À minha irmã por todo o apoio prestado, pela compreensão e pelo incentivo.

Ao Luís, por tudo aquilo que representa para mim, pelo modo como me apoiou e me acompanhou ao longo deste longo e árduo trabalho. A tua energia e determinação continuam a surpreenderem-me e a servirem-me de exemplo.

À minha orientadora, Professora Doutora Vera Ribeiro, pelo apoio e orientação disponibilizados na realização deste trabalho, conselhos e sugestões, além das palavras de ânimo que imprimia sempre que achava necessário.

À Comissão de curso do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

A toda a equipa dos serviços farmacêuticos do Centro Hospitalar do Porto-Hospital de Santo António, em especial à minha orientadora Doutora Teresa Almeida e, aos farmacêuticos da Unidade de Farmácia Oncológica, Doutora Bárbara Santos e Doutor José Pedro Liberal, a quem gostaria de agradecer a disponibilidade de meios, materiais e intelectuais essenciais à concretização deste trabalho.

À Doutora Alda Gonçalves pela forma como me orientou ao longo do meu estágio em farmácia comunitária.

Aos investigadores, Doutor Guillermo Gervasini Rodríguez, Doutor Alan Boddy, Doutor Mehmet Kantar e Doutor Andrew Moore, que tão gentilmente me disponibilizaram os seus trabalhos científicos.

Finalmente, gostaria de agradecer a todos os meus amigos e colegas pela amizade, companhia e afeto.

Muito Obrigada.

Resumo

As leucemias agudas são doenças raras, quando comparadas com outros tipos de neoplasias constituindo, no entanto, a doença maligna mais comum na infância. São responsáveis por 30% de todos os tipos de cânceros diagnosticados em crianças menores de 15 anos em países industrializados. Enquanto que a leucemia linfoblástica aguda apresenta uma taxa de incidência superior em crianças até aos 15 anos, correspondendo a cerca de 80% das leucemias em crianças e adolescentes, a leucemia mieloide aguda é rara abaixo dos 40 anos, sendo que a sua incidência aumenta progressivamente com a idade.

As estratégias atuais de tratamento dividem a terapêutica em duas etapas: a primeira possui como objetivo induzir a remissão da doença e a segunda consiste numa terapêutica de pós-remissão com o objetivo de erradicar a doença residual mínima, evitar recidivas e promover a cura.

Após anos de pesquisa na área da farmacogenómica, observa-se que as diferenças genéticas entre indivíduos podem explicar alguma da variabilidade observada na farmacocinética, eficácia e toxicidade de alguns fármacos. Embora muitos estudos relacionem diferentes respostas farmacológicas com a variabilidade genética, a maioria daqueles aplicam-se à população adulta pelo que a atenção dada à população pediátrica tem sido muito menor. Assim, o aperfeiçoamento na terapêutica das leucemias agudas é urgente.

Atualmente encontra-se perfeitamente estabelecida a relação entre reações adversas à 6-mercaptopurina e polimorfismos no gene que codifica para a enzima tiopurina s-metiltransferase, sendo um dos poucos exemplos na área da farmacogenética a ser “traduzido” para a prática clínica.

Palavras-chave: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda, farmacogenómica, polimorfismos, tiopurina s-metiltransferase, quimioterapia antileucémica.

Abstract

Acute leukemia are rare as compared to other types of malignancies, constituting, however, the most common malignancy in childhood. It is responsible for 30% of all cancers diagnosed in children under 15 years in industrialized countries. Whereas, acute lymphoblastic leukemia has a higher incidence rate in children up to 15 years, accounting for about 80% of all leukemias in children and adolescents, acute myeloid leukemia is rare under 40 years, and its incidence increases with age.

Current chemotherapy treatment is divided into two stages: the first has the objective of remission induction and the second is a post-remission therapy with the goal of eradicating minimal residual disease, preventing relapses and promoting healing.

After years of pharmacogenomics research, we have learned that genetic differences among individuals can explain some of the variability observed in the pharmacokinetics, efficacy, and toxicity of some drugs.

An increasing number of examples describing differences in drug response as a result of genetic polymorphisms and gene expression have been published, but most of these reports include only adult individuals. Few studies deal with pharmacogenomics of children. Therefore, further improvement of childhood leukemia therapy is urgently needed. The relationship between the adverse reactions to 6-mercaptopurine and polymorphisms in the gene coding for the enzyme thiopurine s- methyltransferase is well established, becoming one of a small number of examples in pharmacogenomics to be ‘translated’ into routine clinical care.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, pharmacogenomics, polymorphisms, thiopurine s-methyltransferase, antileukemic chemotherapy.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Acrónimos	x
Secção I - Introdução	1
1. Leucemias agudas	2
1.1. Classificação	3
1.1.1. Leucemia mieloide aguda	3
1.1.2. Leucemia linfoblástica aguda	6
1.2. Epidemiologia	8
1.3. Etiologia	10
1.4. Diagnóstico	12
1.5. Prognóstico	15
2. Quimioterapia das leucemias agudas	18
2.1. Antimetabolitos	20
2.1.1. Antifolato- Metotrexato	20
2.1.1.1. Mecanismo de acção	20
2.1.1.2. Farmacocinética	22
2.1.2. Análogos de purinas	23
2.1.2.1. Mecanismo de acção	23
2.1.2.2. Farmacocinética	24
2.1.3. Análogos de pirimidinas	25
2.1.3.1. Mecanismo de acção	25
2.1.3.2. Farmacocinética	26
2.2. Citotóxicos que interferem com a tubulina	27
2.3. Antibióticos Antracíclicos	28
2.3.1. Vias metabólicas	29
2.3.2. Mecanismo de acção	29
2.3.3. Farmacocinética	31
2.4. Reações Adversas	31

3.	Princípios gerais da Farmacogenómica	34
3.1.	Enzimas de fase I	34
3.1.1.	Citocromo P450	34
3.1.1.1.	Aspetos moleculares dos polimorfismos genéticos do CYP P450	37
3.1.2.	Aldeído desidrogenase	39
3.2.	Enzimas de fase II	39
3.2.1.	UDP-Glucuronosiltransferases	40
3.2.2.	Glutathiona S-transferases	41
3.2.3.	Tiopurina S-metiltransferase	42
3.3.	Transportadores	44
3.3.1.	Transportadores de Influxo	44
3.3.2.	Transportadores de Efluxo	45
Secção II - A Influência da farmacogenómica na terapêutica das leucemias agudas		48
1.	Farmacogenómica na terapêutica das leucemias agudas	49
1.1.	A Farmacogenómica na terapêutica com o metotrexato	50
1.1.1.	Polimorfismos nos genes envolvidos na via dos folatos	50
1.1.2.	Polimorfismos nos genes envolvidos no transporte de metotrexato	66
1.2.	A Farmacogenómica na terapêutica com tiopurinas	74
1.2.1.	Polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo de tiopurinas	74
1.3.	A Farmacogenómica na terapêutica com citarabina	85
1.3.1.	Polimorfismos nos genes envolvidos no transporte da citarabina	86
1.3.2.	Polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo da citarabina	88
1.4.	A Farmacogenómica na terapêutica com a vincristina	96
1.5.	A Farmacogenómica na terapêutica com antibióticos antracíclicos	100

1.5.1. Polimorfismos nos genes envolvidos no transporte de antibióticos antracíclicos	101
1.5.2. Polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo de antibióticos antracíclicos	103
Conclusão	107
Referências Bibliográficas	108
Anexos	121

Índice de Figuras

Secção I – Introdução

Figura 2.1. Vias metabólicas envolvendo o fármaco ara-C	26
Figura 2.2. Mecanismo de ação da vincristina dentro da célula tumoral	28
Figura 3.1. Estruturas secundária e terciária do citocromo microsossomal humano P450 3A4 determinadas por cristalografia de raios-X.	36
Figura 3.2. Reação de conjugação de UDPGA com um substrato nucleófilo catalisado pela UGT levando à formação de β -D-glucuronido e uridina difosfato.	40
Figura 3.3. Formação de glutathione-S-conjugada.	42
Figura 3.4. Esquema simplificado do metabolismo da 6-mercaptopurina	43
Figura 3.5. Representação esquemática do alelo <i>wild-type</i> para o gene da TPMT e para dois dos alelos variantes	44
Figura 3.6. Topologia de transportadores ABC e modelo do mecanismo de transporte	46

Secção II- A influência da farmacogenómica na terapêutica das leucemias agudas

Figura 1.1. Curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida global em 7 anos de <i>follow-up</i> para os diferentes genótipos de <i>MTHFR</i> 677C>T	52
Figura 1.2. Representação esquemática de polimorfismos no promotor do gene <i>DHFR</i> com as respetivas frequências alélicas mínimas	56

Figura 1.3 Curvas de sobrevida livre de evento para os doentes com LLA de acordo com o genótipo para <i>DHFR</i>	56
Figura 1.4 Curvas sobrevida livre de evento para os doentes com LLA de acordo com o genótipo para <i>DHFR</i> .	57
Figura 1.5 Transcrição de ARNm de acordo com os genótipos e haplótipos de <i>DHFR</i>	58
Figura 1.6 Organização do gene <i>DHFR</i> humano	59
Figura 1.7 Representação esquemática de polimorfismos localizados na região do promotor do gene <i>DHFR</i>	60
Figura 1.8 Gráficos de subtipos do haplótipo *1 em relação aos níveis de ARNm	61
Figura 1.9. Associação de diferentes genótipos para o polimorfismo <i>SLCO1B1</i> rs11045879 com a depuração plasmática de metotrexato	71
Figura 1.10 Associação do polimorfismo rs11045879 no gene <i>SLCO1B1</i> 79 com toxicidade gastrointestinal	72
Figura 1.11 Mecanismo de ação do MTX na via metabólica dos folatos	73
Figura 1.12 Histograma da distribuição da frequência da atividade da enzima TPMT em eritrócitos	75
Figura 1.13 Individualização da dose de mercaptopurina de acordo com o genótipo de <i>TPMT</i>	76
Figura 1.14 Curvas da incidência cumulativa de neutropenia febril de acordo com o genótipo de <i>ITPA</i> durante a quimioterapia de manutenção.	81
Figura 1.15 Gráfico do <i>Odds ratio</i> da toxicidade em função dos genótipos de <i>TPMT</i> e <i>ITPA</i> , em crianças com LLA	83
Figura 1.16 Expressão de ARNm <i>hENT1</i> em relação à sensibilidade a ara-C <i>in vitro</i>	87
Figura 1.17 Citotoxicidade de ara-C em populações caucasianas (CEU) e africanas (YRI) em função do genótipo.	89
Figura 1.18. Análise da expressão de ARNm <i>DCK</i>	90

Índice de Tabelas

Secção I – Introdução

Tabela 1.1. Dados de incidência e mortalidade de leucemias para todas as idades referentes a 2008.	9
Tabela 1.2. Incidência, mortalidade e prevalência estimadas para ambos os sexos em Portugal no ano de 2012.	10
Tabela 2.1. Transportadores de influxo responsáveis pela entrada do MTX nos enterócitos, células renais e hepatócitos	22
Tabela 2.2. Transportadores de efluxo responsáveis pela saída do MTX nos enterócitos, células renais e hepatócitos	22

Secção II- A influência da farmacogenómica na terapêutica das leucemias agudas

Tabela 1.1. Número de casos de doentes com e sem recaída da doença em função do genótipo de <i>MTHFR</i> para os polimorfismos 677C> T e 1298A> C	52
Tabela 1.2. Efeito do genótipo <i>TPMT/ITPA</i> nas concentrações dos metabolitos TGN e MMPN em células da medula óssea em doentes tratados com uma dose única de 6-MP IV e em eritrócitos durante a fase de manutenção	80
Tabela 1.3. Efeito do genótipo de <i>TPMT/ITPA</i> na incidência de toxicidade, durante a fase de manutenção, de acordo com dois protocolos de tratamento diferentes.	81
Tabela 1.4. Mortalidade relacionada com o tratamento com ara-C nas diferentes fases de quimioterapia de acordo com o genótipo para <i>CDA A79C</i> .	93

Índice de Quadros

Secção I - Introdução

Quadro 1.1. Classificação da leucemia mieloide aguda segundo a OMS	4
Quadro 1.2. A classificação da leucemia mieloide aguda segundo o sistema FAB	5
Quadro 1.3. Classificação FAB da leucemia linfoblástica aguda	8
Quadro 1.4. Manifestações clínicas das leucemias agudas.	13
Quadro 1.5. Prognóstico da leucemia mieloide aguda de acordo com alguns factores de risco	16
Quadro 1.6. Prognóstico da leucemia linfoblástica aguda de acordo com três categorias de risco de recidiva.	17

Acrónimos

- 6- MP** – 6- Mercaptopurina
- 6- TG** – 6- Tioguanina
- 6-MMPN** – 6- Metilmercaptapurina (6-Methylmercaptapurine)
- 6-TGN** – Nucleótidos de 6- Tioguanina (*6-Thioguanine Nucleotide*)
- ABC** – Transportador de efluxo com domínio de ligação ao trifosfato de adenosina (*ATP-binding cassette*)
- ABCB1, MDR1** – (*Multi-drug resistance*)
- ABCG2, BCRP** – Proteína de Resistência ao Cancro da Mama (*Breast Cancer Resistance Protein*)
- AKR** – Aldo-ceto Redutase (*Aldo-Keto Reductase*)
- ALDH** – Aldeído Desidrogenase (*Aldehyde Dehydrogenase*)
- AR** – Artrite Reumatóide
- Ara-C** – Arabinofuranosil Citosina (*Arabinofuranosyl Cytidine*)
- Ara-CMP** – *5'-Monophosphate Cytosine Arabinoside*
- Ara-CTP** – *Arabinofuranosylcytosine Triphosphate*
- Ara-U** – *Arabinoside Uracil*
- ARNm** – ARN mensageiro
- ASR** – *Age Standardised Rate*
- ATP** – Trifosfato de Adenosina (*Adenosine Triphosphate*)
- ATRA** – Ácido All-Trans Retinóico (*All-Trans-Retinoic Acid*)
- AUC** – Área Sob a Curva (*Area Under The Curve*)
- AZA** – Azatioprina
- CAT** – Catalase
- CBR** – Carbonil Redutase (*Human Carbonyl Reductase*)
- CCG** – *Children's Cancer Group*
- CCND1** – Ciclina D1
- CDA** – Citidina Desaminase (*Cytidine Deaminase*)
- CNV** – Variação do Número de Cópias (*Copy-number variations*)
- COMT** – Catecol- O- Metiltransferase (*Catechol-O-Methyltransferase*)
- CVD** – Coagulação Vascular Disseminada
- DAMPA** – *4-amino-4-deoxy-N-methylpterotic acid*
- DCK** – Desoxicitidina Cinase (*Deoxycytidine kinase*)
- dCTP** – *Deoxycytidine Triphosphate*
- DFS** – Sobrevida Livre de Doença (*Disease-free survival*)
- DHF** – Dihidrofolato
- DHFR** – Dihidrofolato Redutase (*Dihydrofolate reductase*)
- DNR** – Daunorrubicina
- DOX** – Doxorrubicina
- DOXol** – Doxorrubicinol
- EFS** – Sobrevida Livre de Evento (*Event-free survival*)

FAB – Franco-Anglo-Americana

FPGs – *Folilpoliglutamato Sintetase (Folylpolyglutamyl synthase)*

G-CSF – *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

GGH – Gama Glutamil Hidrolase (*Gamma-Glutamyl Hydrolase*)

GI – Gastrointestinal

GPX – Glutaciona Peroxidase

GSTs – Glutaciona S-Tranferases (*Glutathione S-Transferases*)

HIF1 – *Hypoxia Inducible Factor*

HLA-DR – Antígenos de Leucócitos Humanos de classe II (*Human Leukocyte Antigens -DR*)

HR – Taxa de Risco (*Hazard Ratio*)

HTLV-I – Vírus Linfotrópico da célula T humana do tipo I (*Human T Lymphotropic Virus type I*)

IARC – Agência Internacional de Pesquisas no Cancro (*International Agency for Reserach on Cancer*)

IDA-DCTER – Idarrubicina, Dexametasona, Citarabina, Tioguanina, Etopósido e Daunorrubicina

IDA-FLAG – Idarrubicina, Fludarabina, Ara-C, G-CSF

IPO – Instituto Português de Oncologia

IT – Intratecal

ITPA – *Inosina Trifosfato Pirofosfatase (Inosine Triphosphate Pyrophosphatase)*

IV – Intravenoso

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LPA – Leucemia Promielocítica Aguda

miARN – micro ARN

MRT – Mortalidade Relacionada com o Tratamento

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato Redutase (*Methylenetetrahydrofolate Reductase*)

MTRR – (*Methionine Synthase Reductase*)

MTX – Metotrexato

MTX-PGS – (*Methotrexate polyglutamates*)

NADPH – Fosfato do Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NATs – N-Acetil Transferase (*N-acetyltransferase*)

NBD – Domínio de Ligação a Nucleótidos

NOS – Óxido Nítrico Sintases (*Nitric Acid Synthases*)

NQO – Desidrogenase Citosólica

OATP – Transportador de Aniões Orgânicos (*Organic Anion Transporter Protein*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – *Odds Ratio*

OS – Sobrevida Global (*Overall survival*)

PAS – Ácido Periódico de Schiff (*Periodic Acid Schiff*)

Pgp – Glicoproteína- P (*P-glycoprotein*)

RAR α – Recetor α do Ácido Retinóico

RISC – Complexo de silenciamento induzido no ARN

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
SLC19A1, RFC1 – Transportador de Solutos 19A1 (*Solute Carrier 19A1*)
SmIg – Imunoglobulina na superfície da membrana (*Surface membrane immunoglobulin*)
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Polimorfismos de um Único Nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*)
SOD – Superóxido Dismutase
SRS1 – Local de Reconhecimento do Substrato 1 (*Substrate Recognition Sites 1*)
SULTs – Sulfotransferases
TdGTP – Tiodesoxiguanosina trifosfato
TdT – Desoxinucleotidil-terminal Transferases (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*)
TGMP – Tioguanosina Monofosfato (*6-Thioguanine Monophosphate*)
THF – Tetrahidrofolato
TIMP – Tionosina Monofosfato (*Tionosine Monophosphate*)
TMD – Dominio Transmembranar
TOP2 – Topoisomerase 2
TPMT – Tiopurina S- Metiltransferase
TS – Timidilato Sintase (*Thymidylate Synthase*)
UDPGA – Uridina- 5'- difosfato – α - D-ácido glucurónico
UGTs – UDP-Glucoroniltransferases
VNTR – *Variable Number Tandem Repeat*
XO – Xantina Oxidase
MTIMF – 6-metiltioinosinato

Secção I - Introdução

1. Leucemias agudas

A primeira descrição de um caso de leucemia publicado na literatura médica data de 1827 contudo, apenas em 1945 Rudolf Virchow e John Hughes Bennett, em relatos distintos, descreveram esta condição patológica. O termo “leucemia” (do grego *leukos*, "branco"; *aima*, "sangue") foi atribuído por Virchow em 1856. Este afamado patologista alemão distinguiu leucemia de leucocitose e descreveu dois tipos: leucemia esplênica, associada com esplenomegalia, e leucemia linfática e classificou-os de acordo com a sua morfologia celular. Nos anos seguintes, a leucemia aguda foi descrita por Friedreich e em 1878 Neumann estabeleceu a existência de leucemia mieloide (Pui, CH., 2012). Mais tarde em 1889, Wilhelm Ebstein introduziu o termo “leucemias agudas” para diferenciar as leucemias fatais e de rápida progressão das formas crônicas (News Medical, s.d.).

Em 1891 Paul Ehrlich desenvolveu métodos de coloração que permitiram a diferenciação de leucócitos. As leucemias esplênica e mieloblástica foram reconhecidas como sendo a mesma doença originada a partir de um precursor mieloide. Por volta de 1913, a leucemia seria classificada como linfocítica crônica, mieloblástica crônica, linfocítica aguda, mieloblástica aguda e eritroleucemia. Estes avanços permitiram não só que a classificação das leucemias fosse redefinida, como lançaram luz acerca da natureza da hematopoiese. A prevalência de leucemias agudas durante a infância, especialmente entre 1 e 5 anos de idade, foi reconhecida em 1917.

O progresso na descrição das leucemias continuou paralelamente ao desenvolvimento de novas tecnologias como a microscopia eletrónica, análise cromossómica, imunofenotipagem e genotipagem molecular. Com a introdução de novas tecnologias foi possível associar muitas alterações cromossómicas com tipos específicos de leucemias agudas e a sua aplicação resultou em uma genotipagem molecular das células leucémicas não somente ao nível do diagnóstico como também ao nível do prognóstico, na deteção de células residuais de clones leucémicos. Além disto, também anticorpos monoclonais para antígenos na superfície de leucócitos foram desenvolvidos tornando possível a classificação imunofenotípica de células leucémicas.

A imunofenotipagem de células leucémicas com anticorpos monoclonais permitiu separar a linhagem linfóide em precursores B, células B e células T, ajudando, também, a classificar oito tipos de leucemias mielóides e contribuindo para identificar uma vasta variedade bifenotípica. A classificação genotípica por análise cromossómica, técnicas de reações de polimerização em cadeia (PCR) e hibridação *in situ* fluorescente permitiu, por sua vez, uma definição genética molecular das leucemias.

Durante os últimos 25 anos, surgiu a importância de caracterizar não só a doença mas também os doentes com leucemia através de características como a idade, género, etnia, dieta alimentar, estado socioeconómico, a resposta à terapêutica e polimorfismos genéticos. Em síntese, a história da leucemia dos últimos 150 anos ilustra o progresso na compreensão das leucemias paralelamente ao desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias (Pui, CH., 2012).

1.1. Classificação

As leucemias agudas são um grupo de doenças bastante heterogéneo com características clínicas, morfológicas, imunológicas e moleculares distintas, caracterizado pela transformação neoplásica maligna e proliferação descontrolada ao nível das células precursoras imaturas do sistema hematopoiético – **blastos**. Como consequência, ocorre a acumulação destas células na medula óssea e sangue periférico podendo estas migrar e invadir outros órgãos. O comprometimento da linha mieloide, dará origem a leucemia mieloide aguda (LMA) pelo contrário, se tal ocorrer na linha linfóide resultará em leucemia linfóide aguda (também designada de leucemia linfoblástica aguda) (LLA) (Walter, R. *et al.*, 2013; Chang, H. *et al.*, 2004).

Existem dois sistemas principais que são utilizados para a classificação dos subtipos de LMA e LLA. Um destes é o sistema convencional de classificação franco-anglo-americano (FAB), desenvolvido na década de 1970, com base em características morfológicas e citoquímicas das células leucémicas. No entanto, a importância da citogenética tornou-se evidente, e os conhecimentos nesta área, o reconhecimento da diversidade das alterações moleculares e a compreensão da biologia da doença levaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) a desenvolver uma nova classificação (Walter, R. *et al.*, 2013). A classificação da OMS inclui diferentes grupos biologicamente distintos com base no imunofenótipo, características clínicas, alterações citogenéticas e

moleculares além da morfologia, em contraste com a classificação FAB. A classificação da OMS foi a primeira classificação da leucemia a considerar as características genéticas juntamente com as características morfológicas para definir diferentes subconjuntos de leucemias e é, atualmente, a mais moderna classificação utilizada. Não obstante, ainda hoje grande parte da literatura recente e alguns estudos em curso utilizam a classificação FAB (Fauci, A. *et al.*, 2008).

1.1.1. Leucemia mieloide aguda

A LMA é classificada, em termos gerais, de acordo com a morfologia das células leucémicas, marcadores da superfície celular e citogenética.

A classificação da OMS foi a primeira classificação da LMA a incorporar uma componente genética, cromossômica e molecular. Segundo este sistema de classificação a LMA é subclassificada com base na presença ou na ausência de alterações genéticas específicas. A leucemia promielocítica aguda (LPA), por exemplo, é assim classificada com base na presença do rearranjo citogenético t (15;17) (q22, q12) ou do produto da translocação, PML / RAR α resultante da fusão do fator de transcrição (PML) no cromossoma 15 com o gene do recetor alfa do ácido retinóico (RAR α) no cromossoma 17. Os recentes avanços na biologia molecular mostraram que os vários subtipos de LMA comportam-se de forma diferente e, portanto, não devem ser tratados da mesma forma. Doses terapêuticas de ácido all-trans-retinóico têm sido utilizadas com sucesso para induzir a remissão de doentes com LPA. Assim, a classificação da OMS separa LPA de todos os outros tipos de LMA.

O imunofenótipo destas células pode ser estudado através de citometria de fluxo após a marcação das células com anticorpos monoclonais para os antígenos da superfície celular. Deste modo, poderá ser possível diferenciar a LMA da LLA assim como identificar alguns tipos de LMA através deste método. Por exemplo, a leucemia megacarioblástica aguda muitas vezes pode ser diagnosticada apenas através da expressão de um dos antígenos específicos de plaquetas, CD41 e / ou CD61. Por outro lado, a OMS leva também em consideração as características clínicas, identifica e classifica a LMA relacionada com fármacos como uma entidade separada e subclassifica este grupo com base nos tipos específicos de quimioterapia previamente recebida. Além disto, a LMA com displasia em várias linhagens é classificada com base

na presença ou na ausência de um antecedente de síndrome mielodisplásica. Essas características clínicas contribuem não apenas para a classificação mas também para o prognóstico de cada subtipo específico de LMA. Esta classificação pode ser observada no **quadro 1.1**. (Fauci, A. *et al.*, 2008).

Quadro 1.1 – Classificação da leucemia mieloide aguda segundo a OMS (Adaptado de Fauci, A. *et al.*, 2008).

Classificação Organização Mundial de Saúde (OMS)	
I.	LMA com recorrentes alterações genéticas LMA com t(8;21)(q22;q22);RUNX1/RUNX1T1 LMA com eosinófilos anormais na medula óssea [inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22);CBCF/MYH11] Leucemia Promielocítica aguda [LMA com t(15;17)(q22;q12)(LPM/RARA)e variantes] LMA com alterações 11q23
II.	LMA com displasia de várias linhagens: - após síndrome mielodisplásica ou síndrome mielodisplásica/desordem mieloproliferativa - sem antecedentes de síndrome mielodisplásica
III.	LMA e síndromes mielodisplásicas relacionadas com fármacos - relacionados com agentes alquilantes - relacionados com inibidores de topoisomerase II - Outros tipos
IV.	LMA não categorizada LMA minimamente diferenciada LMA sem maturação LMA com maturação Leucemia mielomonocítica aguda Leucemia monocítica e monoblástica aguda Leucemia eritróide aguda Leucemia megacarioblástica aguda Leucemia basófila aguda Sarcoma mielóide Panmielose aguda com mielofibrose

De acordo com o sistema de classificação FAB, a LMA é dividida em oito subtipos, segundo a morfologia e histoquímica das células leucémicas, conforme o descrito no **quadro 1.2**.

As células de LMA possuem cromatina nuclear finamente granular, nucléolos múltiplos e grânulos azurófilos citoplasmáticos. Os subtipos de M0 a M3 refletem graus crescentes de maturação e M4 e M5 possuem algum grau de diferenciação monocítica. A alteração genética mais comum na LMA-M1 é a translocação t(9;22)(q34;q11).

O subtipo M3, correspondente à LPA, possui blastos grandes com citoplasma abundante e o núcleo é, geralmente, irregular bilobado ou recortado com um nucléolo visível em cada lobo. O citoplasma possui grandes grânulos, são visíveis também

bastonetes de *Auer* distribuídos aleatoriamente no citoplasma mas não estão presentes em todos os casos. Acredita-se que a libertação de um grande número de grânulos promielocíticos contendo um pro-coagulante pode originar coagulação intravascular disseminada (CVD), sendo esta a complicação mais grave decorrente da LPA. A LMA-M3 com t (15,17) é geralmente caracterizada pela associação de marcadores linfoides, CD2 e CD19, com marcadores mieloides. Os subtipos M1-M4 contêm mieloperoxidase, enquanto que M4 e M5 têm a enzima monocítica esterase inespecífica. Alguns casos de M4 são caracterizados pelo aumento de eosinófilos na medula óssea e é assim classificada de LMA M4e. A eritroleucemia (M6) tem características da linhagem eritroide. A citoquímica dos eritroblastos apresenta reação com ácido periódico de *Schiff* (*periodic acid Schiff* - PAS) negativa, as células blásticas expressam uma variedade de antígenos da linha mieloide, como CD13 e CD33. Variantes de M6 podem ser detetadas pela expressão de glicoforina A e ausência de marcadores mieloides. A leucemia megacarioblástica (M7) é rara, ocorre como uma transformação da leucemia granulocítica crônica e da síndrome mielodisplásica. Não existe uma única alteração cromossômica relacionada com a LMA-M7, com a exceção de t (1,22) (q13;q13), encontrada quase exclusivamente em crianças com idade inferior aos 18 meses e sem síndrome de Down (Antica, M., 2011). Mais detalhes sobre os diferentes subtipos de LMA encontram-se no anexo A.

Quadro 1.2 - A Classificação da leucemia mieloide aguda segundo o sistema FAB
(Adaptado de Fauci, A. *et al.*, 2008).

Classificação FAB (Franco-anglo-americana)	Incidência
M0: Leucemia minimamente diferenciada	5%
M1: Leucemia mieloblástica sem maturação	20%
M2: Leucemia mieloblástica com maturação	30%
M3: Leucemia promielocítica hipergranular	10%
M4: Leucemia mielomonocítica	20%
M4Eo: Variante: aumento eosinófilos anormais na medula óssea	
M5: Leucemia monocítica	10%
M6: Eritroleucemia (doença de DiGuglielmo)	4%
M7: Leucemia megacarioblástica	1%

1.1.2. Leucemia linfoblástica aguda

Segundo a classificação FAB, a LLA pode ser dividida em FAB L1, FAB L2 e FAB L3 (**Quadro 1.3.**) de acordo com a ocorrência de características individuais e citológicas e o grau de heterogeneidade entre as células leucémicas. Estas características consistem no tamanho da célula, forma da cromatina nuclear, nucléolo, grau de basofilia no citoplasma e a presença de vacuolização citoplasmática.

- **LLA-L1:** Caracterizada por uma população de pequenas células homogêneas, com forma nuclear regular. Os conteúdos nucleares são raramente visíveis e o citoplasma é moderadamente basófilo. O tipo L1 de LLA é muito comum na infância, sendo que 74% destes casos ocorrem em crianças com idade igual ou inferior a 15 anos.

- **LLA-L2:** Caracterizada por uma população de grandes células heterogêneas com uma forma nuclear irregular. Um ou mais nucléolos grandes são visíveis, o citoplasma varia na cor e a membrana nuclear pode apresentar irregularidades. A LLA-L2 representa 27% de todos os doentes. Os blastos encontrados na LLA-L2 podem ser confundidos com os blastos presentes na LMA. Cerca de 66% dos casos de LLA em doentes acima dos 15 anos são do tipo LLA-L2.

- **LLA-L3:** Caracterizada pela existência de células grandes e homogêneas, de forma nuclear redonda ou oval. Possui um a três nucléolos proeminentes e citoplasma basófilo com vacúolos muitas vezes proeminentes, sendo estas citomorfologicamente idênticas às células do linfoma de Burkitt (Antica, M., 2011).

A OMS classifica a LLA de acordo com antígenos presentes na superfície celular, através de imunofenotipagem, envolvendo o uso de citometria de fluxo, capaz de identificar o estágio de diferenciação dos linfócitos B e T. Aproximadamente 80% a 85% da LLA infantil desenvolve-se a partir da proliferação monoclonal de precursores de células B (Hoffman, R. *et al.*, 2009). Este tipo de LLA, representa cerca de 75% dos casos em adultos e pode ser dividido nos seguintes subtipos:

a) Pró LLA-B (ou Pré-pré-LLA-B) expressa antígenos primitivos das células B, como os antígenos de leucócitos humanos de classe II (HLA-DR), desoxinucleotidil terminal transferase (TdT), CD19 e CD22, e por isso, acredita-se que representem um estado muito inicial dos linfócitos B. Representa aproximadamente 10% dos adultos com LLA.

b) LLA comum é caracterizada pela presença de CD10. Compreende mais de 50% dos casos de adultos com LLA.

c) Pré LLA-B é caracterizada pela expressão de imunoglobulina citoplasmática CD10, o que sugere um estado de diferenciação ligeiramente maior. Este subtipo da LLA é identificado em quase 10% dos casos em adultos.

d) LLA das células B maduras é encontrada em cerca de 4% dos casos de LLA em adultos. Os blastos expressam antígenos de superfície de células B maduras, incluindo imunoglobulina na superfície da membrana (SMIG +).

Cerca de 25% dos casos de LLA em adultos e 15% em crianças têm origem nos linfócitos T e expressam CD2, CD3 ou CD5. Ocorre com grande frequência em indivíduos do sexo masculino estando associado a elevada leucometria no momento do diagnóstico, massa mediastínica e envolvimento do sistema nervoso central (SNC). Antígenos mieloides, como CD13, CD14 ou CD33, podem ser observados na superfície de até 25% dos casos de LLA, e em alguns casos, mas não em todos, a co-expressão de marcadores mieloides em blastos de LLA foi associada a um mau prognóstico.

As alterações citogenéticas observadas com mais frequência na LLA adulta incluem a translocação cromossômica t (9;22) presente em 15 a 20% dos casos; t (8;14) uma translocação associada à variante L3 da LLA e t (1;19), uma translocação presente com frequência na LLA de pré-linfócitos B. Todas estas alterações genéticas sugerem um mau prognóstico. As translocações envolvendo os cromossomas 1 e 14, como t (1;14) (p33;q11) e t (1;14) (p32;q11) ocorrem em aproximadamente 3% dos casos de LLA infantil dos linfócitos T. Alterações genéticas no braço curto do cromossoma 12, t (12;21) (p13;q22), estão associadas ao imunofenótipo de precursores das células B e é a alteração genética mais frequente na LLA pediátrica, ocorrendo em 20% a 30% nesta faixa etária e em 3% dos adultos. Em cerca de 20% dos casos, as células leucêmicas

ganham cromossomas, os doentes com LLA hiperdiploide tendem a ter um melhor prognóstico (**Quadro 1.3.**) (Antica, M., 2011).

Quadro 1.3.-Classificação FAB da leucemia linfoblástica aguda (Adaptado de Fauci, A *et al.*, 2008).

Classificação da Leucemia Linfoblástica Aguda			
Subtipo Imunológico	% de Casos	Subtipo FAB	Alterações Citogenéticas
LLA pré-B	75	L1, L2	t(9;22), t(4;11), t(1;19)
LLA células B	20	L3	t(8;14), t(8;22), t(2;8)
LLA células T	5	L1,L2	14q11 ou 7q34

1.2. Epidemiologia

Embora a incidência global seja rara, a leucemia constitui a doença maligna mais comum na infância, correspondendo a 30% de todos os tipos de cancros diagnosticados, em crianças menores de 15 anos, em países industrializados. Dentro desta população, a LLA ocorre cerca de cinco vezes mais do que a LMA (Belson, M. *et al.*, 2007).

A LLA apresenta uma incidência anual, nos Estados Unidos da América e Europa, de 3,0-3,5 por 100 000 crianças dos 0-14,9 anos de idade (Schmiegelow, K. *et al.*, 2008) sendo o seu pico de incidência em crianças em torno dos 5 anos de idade. A LLA corresponde a cerca de 80 a 85% de todas as leucemias diagnosticadas em crianças e 15% em adultos. Cerca de dois terços de todos os adultos com LLA sobrevivem, pelo menos, cinco anos após o diagnóstico. A LLA pediátrica apresenta maiores taxas de sobrevivência do que em adultos, com mais de três quartos de todas as crianças com leucemia e mais de quatro quintos dos casos com LLA, a sobreviverem pelo menos cinco anos após o diagnóstico. A sobrevivência de crianças com LLA é uma das mais dramáticas histórias de sucesso da quimioterapia, que mostra uma melhoria notável devido a tratamentos inovadores, com a taxa de sobrevida em 5 anos em 1964, sendo apenas 3% passando para 57% em 1975-1977 e 87% em 1996-2002 (Wartenberg, D. *et al.*, 2008).

A LMA é a leucemia aguda mais comum em adultos e representa cerca de 80% dos casos nesta faixa etária. Raramente é diagnosticado antes dos 40 anos aumentando a

incidência progressivamente com a idade, sendo a média de idades dos doentes diagnosticados com LMA de 65 anos. Nos Estados Unidos e na Europa, a incidência têm-se mantido estável nos últimos anos correspondendo a 3 a 5 casos por 100.000 habitantes. Em contraste, a LMA representa 15 a 20% dos casos em doentes com menos de 15 anos de idade. Embora as taxas de sobrevivência tenham melhorado notavelmente neste grupo etário mais jovem, a LMA continua a ter a menor taxa de sobrevivência de todas as leucemias, tendo ainda um prognóstico muito pobre em doentes mais velhos (Deschler, B. *et al.*, 2006).

Tabela 1.1. Dados de incidência e mortalidade de leucemias para todas as idades. Os dados da prevalência dizem respeito à população adulta apenas e correspondem ao ano de 2008 (Adaptado de IARC-GLOBOCAN,2008).

Incidência		Mortalidade		Prevalência (5-anos)	
Número	ASR (W)	Número	ASR (W)	Número	Prop.
350434	5.0	257161	3.6	499874	10.2

ASR (*age-standardized rate*) (W) e proporções per 100,000 habitantes.

Segundo a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) a taxa de incidência padronizada (segundo a população europeia) – *Age-standardised rate* (ASR (E)) - de leucemias no ano de 2012 foi de 8.2 pessoas/100,000 hab. no território nacional. A taxa de incidência de leucemias foi superior no sexo masculino comparativamente ao sexo feminino, 9.8 *versus* 6.8 pessoas/100,000 hab. (IARC-EUCAN, 2012).

Tabela 1.2. Incidência, mortalidade e prevalência estimadas para ambos os sexos em Portugal no ano de 2012 (Adaptado de IARC-EUCAN, 2012).

	Incidência		Mortalidade		Prevalência		
	Número	Taxa ASR (E)	Número	Taxa	1-ano (prop.)	3-anos (prop.)	5-anos (prop.)
Homens	618	9.8	402	5.6	369	930	1377
Mulheres	506	6.8	359	3.8	305	767	1132
Ambos os sexos	1124	8.2	761	4.5	673	1696	2509

ASR (*age-standardised rate*) (E) per 100,000 habitantes.

Segundo dados de 2010 do registo oncológico do Instituto Português de Oncologia (IPO) do Porto em crianças com menos de 15 anos, as leucemias constituíram a patologia mais frequente, correspondendo a 40% dos tumores infantis, à semelhança do que se passa no resto da Europa. Verificou-se um pico de incidência de leucemias linfoides nas crianças na faixa etária de 1 a 9 anos de idade e de leucemias mieloides em adultos na faixa etária dos 60 aos 64 anos, pelo que estes dados estão de acordo com a epidemiologia mundial da doença (IPO-Porto, 2010).

1.3. Etiologia

A grande maioria dos casos de leucemias agudas é de causa desconhecida, sendo que somente um pequeno grupo de fatores de risco têm sido identificados como sendo responsáveis por um reduzido número de casos (WHO, 2009). As leucemias agudas, assim como outros tipos de neoplasias, resultam de uma combinação diversos fatores (Belson, M. *et al.*, 2007). As causas conhecidas incluem fatores genéticos/congénitos e fatores ambientais tais como exposição a radiação ionizante, produtos químicos ou fármacos (WHO, 2009; Belson, M. *et al.*, 2007).

Os indivíduos com alterações cromossómicas congénitas raras possuem um maior risco de desenvolver leucemias agudas. As crianças com síndrome de Down têm, aproximadamente, 10 a 20 vezes maior risco de desenvolver leucemia aguda em

comparação com crianças sem esta síndrome. Embora a maior parte das leucemias observadas em crianças seja linfóide, em crianças com síndrome de Down mais de 50% dos casos são mieloide; como tal, verifica-se que desde o nascimento até aos 4 anos de idade, a incidência da LMA (especialmente FAB M7) é muito maior do que LLA em crianças com síndrome de Down. Apesar disso, estes possuem duas vezes maiores taxas de cura relativamente a outras crianças com LMA quando sujeitos a quimioterapia. O cromossoma 21 extra introduz não apenas um aumento da vulnerabilidade como também uma melhor curabilidade (Pui, CH., 2012). Há também um risco aumentado de LLA e LMA associado com doenças hereditárias, tais como síndrome de Klinefelter, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, ataxia-telangiectasia e neurofibromatose. As crianças com distúrbios congênitos ao nível da granulopoiese e eritropoiese, como síndrome de Kostmann e anemia de Diamond-Blackfan, também estão em risco aumentado para desenvolver LMA (Hoffman, R. *et al.*, 2009).

No que diz respeito a fatores ambientais, a radiação ionizante é uma das poucas exposições para a qual a relação causal com leucemia infantil tem sido descrita, dependendo da dose e duração da exposição assim como da idade do indivíduo (Belson, M. *et al.*, 2007).

Apesar de os mecanismos bioquímicos específicos que relacionam a exposição a pesticidas ao desenvolvimento das leucemias pediátricas ainda não estarem totalmente estabelecidos, algumas evidências sugerem que pesticidas poderão promover a formação de alterações cromossômicas por alteração do equilíbrio na produção de radicais livres no organismo. Na verdade, estudos indicam que herbicidas e inseticidas induzem *stress* oxidativo e efeitos genotóxicos, outros demonstraram quebras e translocações cromossômicas em indivíduos expostos a agrotóxicos organofosforados. (Infante-Rivard, C. *et al.*, 2007; Ma, X. *et al.*, 2002).

O risco de desenvolver a doença pela exposição a estes compostos durante o período de gestação parece ser mais elevado do que o risco após o nascimento. Frequentemente o uso de pesticidas domésticos, durante o período pré-natal, tem sido relacionado com o aumento do risco de desenvolvimento de LLA. O embrião ou feto é especialmente sensível e suscetível a um ambiente carcinogéneo, pelo que existem evidências de que a LLA é iniciada no útero e tem sido mostrado que algumas translocações cromossômicas relacionadas com o desenvolvimento da LLA na infância

têm origem pré-natal. O risco pela exposição a inseticidas no início da vida parece ser mais significativo do que por exposições posteriores.

Estes estudos são importantes uma vez que ilustram o potencial dos pesticidas, mesmo aqueles de uso doméstico, em produzirem efeitos biológicos (Ma, X. *et al.*, 2002).

O risco para o desenvolvimento de LLA também poderá ser aumentado após a exposição a agentes químicos, tais como o benzeno ou outros agentes capazes de produzir aplasia da medula óssea, incluindo fármacos quimioterapêuticos. A LMA secundária poderá ocorrer após a exposição a agentes alquilantes, tais como ciclofosfamida, inibidores da topoisomerase II e, raramente, antibióticos antracíclicos usados para o tratamento de outras neoplasias precedentes.

Outro fator de risco ambiental possível para o desenvolvimento de leucemias, mas ainda não completamente esclarecido, será a exposição a campos eletromagnéticos de baixa frequência, potencialmente carcinogênicos para o ser humano.

Não existem evidências de uma etiologia viral, contudo algumas doenças infecciosas, durante o período de gestação e após o nascimento, têm sido vastamente associadas ao desenvolvimento de leucemia pediátrica, especialmente LLA (WHO, 2009). No entanto, resultados indiretos sugerem o envolvimento de vírus na patogênese de duas neoplasias linfóides. A infecção pelo vírus linfotrópico da célula T humana do tipo I (HTLV-I) tem mostrado ser um agente etiológico para a leucemia de células T em adultos (Hoffman, R. *et al.*, 2009). Identificar os fatores de risco constitui assim um passo importante na redução da incidência global da doença (Belson, M. *et al.*, 2007).

1.4. Diagnóstico

A apresentação clínica das leucemias agudas é uma consequência da redução da produção de células hematopoiéticas normais e da invasão de blastos leucêmicos em vários órgãos. Na maioria das vezes, os doentes apresentam sinais e sintomas não específicos, que podem começar de forma gradual ou abruptamente devido à presença de anemia, leucopenia e trombocitopenia (**Quadro 1.4.**). Metade dos doentes apresenta sintomas três meses antes de a doença ser diagnosticada, sendo que a maioria menciona astenia, fadiga e artralgia (entre crianças dores nas extremidades e articulações poderão

ser os únicos sintomas apresentados) no momento do diagnóstico (Fauci, A. *et al.*, 2008).

A presença de linfadenopatia, esplenomegalia, e/ou hepatomegalia no exame físico poderá ser observada em cerca de 20% dos doentes com LLA (NCCN, 2012), uma vez que células da LLA são mais infiltrativas em tecidos normais do que as da LMA. O aumento de linfonodos do fígado e do baço é frequentemente observado no diagnóstico. O aumento do timo é observado com frequência nos casos de LLA das células T (Hoffman, R. *et al.*, 2009). Uma hemostasia anormal (hemorragias clinicamente evidentes) e infeção são notados em, pelo menos, um terço dos casos de LMA. Manifestações no SNC (em 5 a 10% dos casos de LLA as células podem infiltrar-se nas leptomeninges), hiperplasias e hemorragias gengivais, assim como infiltrações na pele ou tecidos moles por blastos são características dos subtipos monocíticos da LMA e dos subtipos que possuem a alteração cromossómica 11q23.

Massas leucémicas extramedulares nos tecidos moles – designadas de sarcoma granulocítico ou cloromas - foram também observadas em doentes com LMA (Fauci, A. *et al.*, 2008).

Quadro 1.4.-Manifestações clínicas das leucemias agudas. No quadro estão descritos alguns dos sinais e sintomas (Adaptado de Fauci, A. *et al.*, 2008).

Manifestações Clínicas Sinais e Sintomas	
Síndrome anémica	Síndrome leucopénica
Fadiga e fraqueza	Febre
Palidez	Infeções frequentes
Anorexia e perda de peso	Sudorese
Taquicardia	Aftas
Cefaleias	Hepatoesplenomegalia
Vertigens	Linfadenopatia
Alopécia	
Síndrome Trombocitopénica	
Hemostasia anormal	
Manifestações hemorrágicas: epistaxe, hemorragia gengival, menorragia, melenas e hematoquesia.	
Equimoses espontâneas , púrpuras e petéquias	

Na identificação e investigação das leucemias agudas devem ser utilizados tanto os critérios morfológicos e citogenéticos como o recurso à imunofenotipagem, compondo assim a tríade clássica da abordagem multifacetada indispensável ao diagnóstico deste grupo de patologias.

O hemograma frequentemente revela anemia normocítica e normocrômica bem como trombocitopenia, na maioria dos casos abaixo de 100.000/ μ L embora também possam ser observadas contagens de plaquetas abaixo dos 50.000/ μ L. A leucometria é variável, sendo a contagem média de leucócitos cerca de 15.000/ μ L, observando-se em 20% dos doentes uma leucometria superior a 100.000/ μ L. Não obstante, 25 a 40% dos doentes são leucopénicos apresentando leucometria abaixo de 5.000/ μ L, sendo nestes casos rara ou ausente a presença de blastos. Nos casos de LLA com leucocitose, os linfoblastos são as células predominantes. Por outro lado, os indivíduos leucopénicos podem apresentar linfoblastos em pequeno número, situação denominada por alguns autores como “leucemia aleucémica” (Hoffman, R. *et al.*, 2009; Fauci, A. *et al.*, 2008). A classificação da OMS define leucemias agudas pela presença de $\geq 20\%$ de blastos na medula óssea ou sangue periférico, mas na verdade um diagnóstico da LMA pode ser feito com menos de 20% de blastos em doentes com as seguintes alterações genéticas: t (15;17), t (8;21), t (16;16) e inv (16) (NCCN, 2011).

O passo seguinte para a confirmação do diagnóstico é a realização de uma punção de sangue medular ou de uma biópsia à medula óssea. Em quase todos os doentes as descrições do mielograma incluem medula óssea hipercelular com intensa infiltração de blastos nos espaços adiposos e com substituição dos elementos medulares normais por células leucémicas. Pode haver fibrose medular em 10% a 15% dos casos. A diferenciação entre linfoblastos e mieloblastos é realizada através da morfologia, citoquímica e da imunofenotipagem. Este último é o método mais adequado para caracterizar o tipo de leucemia e o estadio de diferenciação dos blastos, através da utilização de marcadores mieloides e linfoides (B ou T). As reações citoquímicas são o complemento de diagnóstico das leucemias agudas mais antigo e estudam a composição química da célula, permitindo avaliar a presença de várias substâncias, sendo portanto um elo de união entre a morfologia e a bioquímica, que ainda hoje é utilizado na diferenciação das leucemias agudas e na distinção da LLA e LMA.

O material aspirado da medula óssea deve ser submetido a colorações citoquímicas como *Negro do Sudão*, mieloperoxidase, esterases e PAS. Este último, antes usado como marcador para a LLA, não tem atualmente muito valor de diagnóstico pela sua falta de especificidade. As colorações citoquímicas das peroxidases e *Negro do Sudão* são utilizadas na distinção de células de origem mieloide e linfoide. As células da linhagem mieloide são peroxidase positivas, enquanto que as linfóides são peroxidase negativas. Quando presente um elevado número de blastos, esta técnica torna-se segura para a diferenciação entre mieloblastos e linfoblastos. O padrão de coloração por *Negro do Sudão* corresponde ao das peroxidases, sendo positivo para as séries neutrofílicas e eosinofílicas, negativo para os linfócitos e fracamente positivo para os monócitos. A fosfatase ácida é positiva para a LLA, enquanto que a esterase específica é negativa (Antica, M., 2011; Hoffman, R. *et al.*, 2009). A diferenciação morfológica, imunofenotípica e citogenética dos subtipos de LMA podem ser novamente encontrados no anexo A.

1.5. Prognóstico

Os fatores intrínsecos à própria patologia assim como as características específicas de cada doente são determinantes para o prognóstico das leucemias agudas. Em particular, a idade, a contagem de leucócitos, subtipo citogenético/imunofenótipo e a probabilidade de alcançar uma remissão inicial completa bem como a duração desta, foram identificados como sendo fatores importantes na determinação do risco e avaliação do prognóstico de adultos e crianças com leucemias agudas (NCCN, 2011).

Os doentes com LMA mais jovens, com níveis menores de leucócitos no momento do diagnóstico, sem transtorno hematológico prévio ou com blastos com as translocações cromossômicas t (8;21), t (15;17) e inv (16) evoluem relativamente bem, enquanto que doentes mais velhos com altos níveis de leucócitos no momento do diagnóstico, com histórico de mielodisplasia prévia, com alterações nos cromossomas 5 ou 7 ou com alterações citogenéticas complexas, possuem uma evolução pior. As taxas de resposta completa e de sobrevida global são melhores para os subtipos LMA-M2, M3, e M4 (Antica, M., 2011; Hoffman, R. *et al.*, 2009). Taxas de remissões completas mais baixas foram observadas em doentes que tiveram anemia, leucopenia e/ou

trombocitopenia durante os três meses anteriores ao diagnóstico, quando comparados com aqueles sem esta história (Fauci, A. *et al.*, 2008). Alguns dos fatores de risco que influenciam o prognóstico podem ser observados no **quadro 1.5**.

Quadro 1.5.- Prognóstico da leucemia mieloide aguda de acordo com alguns factores de risco (Adaptado de Hoffman, R. *et al.*, 2009).

Prognóstico da Leucemia mielóide aguda		
Fatores de risco	Favorável	Desfavorável
Idade	< 55 anos	> 60 anos
Contagem de leucócitos	<25,000/ μ L	>100,000/ μ L
Subtipo OMS	LMA com translocação cromossômica t(8;21)	LMA com displasia em várias linhagens, LMA relacionada com a quimioterapia, leucemia megariocítica aguda, leucemia eritroide aguda, leucemia basófilica aguda
Tipo FAB	M3, M4Eo	M0, M5, M6, M7
Citogenética	t(15;17) t(8;21), inv(16)	Alterações nos cromossomas 5 e 7, 11q23, t(6;9) e alterações cromossômicas raras
Fenótipo	CD 34 + CD 56 +	CD 34-

Muitos fatores influenciam uma remissão completa, a sua duração e portanto a possibilidade de cura da LMA. Uma remissão completa é definida após a análise da medula óssea e do sangue periférico. A contagem de neutrófilos deverá ser superior a 1000/ μ L e a contagem de plaquetas superior a 100.000/ μ L. A concentração de hemoglobina não é considerada na determinação da remissão completa. A medula óssea deve apresentar mais de 20% de células maduras, menos de 5% de blastos e leucemia extramedular não deve estar presente. Os doentes que conseguem atingir uma remissão completa após um ciclo de quimioterapia de indução apresentam taxas de sobrevivência maiores do que aqueles que requerem vários ciclos (Fauci, A. *et al.*, 2008).

Os doentes com LLA com a translocação cromossômica t(9;22), hipodiploidia (menos de 44 cromossomas) e um nível elevado de leucócitos no momento do

diagnóstico, parecem ter um prognóstico pior. Por outro lado, crianças na faixa etária entre os 2 e os 10 anos de idade ou crianças com a translocação cromossômica t (12;21) e trissomias dos cromossomas 4, 10 e 17 são um grupo de baixo risco. A idade e a contagem de leucócitos inicial são fatores de prognóstico clinicamente importantes em doentes adultos com LLA, revelando que doentes acima dos 35 anos e elevados níveis de leucócitos no momento do diagnóstico apresentam uma diminuição da duração da remissão. Estas alterações citogenéticas poderão servir como fatores de prognóstico antes do início do tratamento e são importantes na determinação de categorias de risco de recidiva (**quadro 1.6.**) (Fauci, A. *et al.*, 2008; Hoffman, R. *et al.*, 2009).

Quadro.1.6.- Prognóstico da leucemia linfoblástica aguda de acordo com três categorias de risco de recidiva, definidas por alterações citogenéticas específicas em crianças e adultos (Adaptado de Hoffman, R. *et al.*, 2009).

Prognóstico da Leucemia linfoblástica aguda		
	Crianças	Adultos
Baixo risco	- Hiperdiploidia (trissomias dos cromossomas 4, 10 e 17) - t (12;21)/TEL-AML1	- Hiperdiploidia
Risco elevado	- t (1; 19)/E2X-PBX	
Risco muito elevado	-t (9;22)/BCR-ABL -11q23/MLL	- Hipodiploidia - t (9;22)(q34q11) - t (4;11)(q21, q23) - t (8; 14)(q24, q32)

2. Quimioterapia das leucemias agudas

Este capítulo enfoca os princípios responsáveis pelo desenvolvimento de uma moderna combinação de regimes de quimioterapia. Esta discussão é seguida por descrições das principais classes de fármacos quimioterapêuticos usadas no tratamento de leucemias agudas, os seus mecanismos de ação e algumas das suas características farmacocinéticas e toxicológicas.

Embora os regimes de tratamento específicos, seleção de medicamentos e doses difiram entre crianças e adolescentes e adultos, bem como entre os diferentes subtipos de leucemias agudas, os princípios básicos de tratamento são semelhantes. Os regimes de tratamento mais comuns empregues em doentes com LLA incluem algumas modificações ou variações na quimioterapia originalmente desenvolvida. De uma forma geral, as fases de tratamento podem ser em grande parte agrupadas em **indução**, **consolidação** e **manutenção**.

Todos os regimes de tratamento para a LLA incluem profilaxia e/ou tratamento de LLA no SNC. Na fase de indução elevadas doses, geralmente uma combinação de vários fármacos, são administradas com o objetivo de induzir a completa remissão, quando se inicia o regime terapêutico (NCCN, 2012).

O regime de indução da remissão da LLA baseia-se em combinações que incluem vincristina, antibióticos antracíclicos, como a doxorrubicina e a daunorrubicina e corticosteroides, prednisolona e dexametasona, com ou sem L-asparaginase e/ou ciclofosfamida. Antimetabolitos como o metotrexato (MTX), citarabina e/ou 6-mercaptopurina (6-MP) são muitas vezes incluídos nesta fase, principalmente, com o objetivo de profilaxia da LLA no SNC. O objetivo da profilaxia do SNC é eliminar as células leucémicas em locais que não podem ser imediatamente acedidos por quimioterapia sistémica devido à barreira hematoencefálica. Esta terapia dirigida para o SNC inclui irradiação craniana, administração intratecal (IT) de MTX, citarabina ou corticosteroides e/ou administração intravenosa (IV) de altas doses de MTX, citarabina, 6-MP e L-asparaginase. Este regime terapêutico é administrado ao longo do tratamento da LLA (NCCN, 2012; Rowe, J. *et al*, 2007).

O tratamento da LMA tem sido dividido em quimioterapia de indução e pós-remissão (ou consolidação), muitas das vezes baseada na idade do doente. Os regimes de indução padrão estão adaptados para doentes com idades inferiores a 60 anos e que não tenham antecedentes de doenças hematológicas, como a síndrome mielodisplásica, ou que não tenham realizado tratamentos relacionados com LMA secundária. Este tratamento, embora tenha sofrido algumas alterações nos últimos 25 anos, é baseado em administrações de citarabina e antibióticos antracíclicos como a idarrubicina ou daunorrubicina e ainda mitoxantrona.

Em doentes com função cardíaca comprometida serão administrados outros regimes que combinam fármacos não antracíclicos com citarabina. Após a obtenção da remissão na primeira fase do tratamento é importante que o doente esteja em condições de tolerar os ciclos de quimioterapia mais intensivos durante a fase de consolidação, para atingir um controlo da doença mais prolongado. Estima-se que doentes que não recebam a terapêutica de pós-remissão terão uma recaída nos 6 a 9 meses seguintes. A quimioterapia de indução para doentes com LMA considera como ponto crítico a idade acima dos 60 anos, isto é baseado na prevalência de factores citogenéticos não favoráveis, antecedentes de mielodisplasia, multirresistência aos fármacos e aumento co-morbilidade, que afetará a tolerância a tratamentos intensivos. Todos os doentes terão ainda terapêutica de suporte para situações decorrentes da própria doença, como a síndrome da lise celular, ou da própria quimioterapia.

Para a LPA, o regime terapêutico de indução inclui a administração de ácido all-trans retinoico e antibióticos antracíclicos, tanto na fase de indução como na de consolidação. Doentes aos quais não podem ser administrados antibióticos antracíclicos realizam ciclos de ácido all-trans retinoico (ATRA) e trióxido de arsénico até à remissão, ocorrendo após esta a avaliação da morfologia da medula óssea. A terapêutica de indução da remissão em doentes a que podem ser administrados antibióticos antracíclicos, receberão daunorrubicina e/ou idarubicina, ATRA e citarabina, sendo que na fase seguinte também poderá ser incluído trióxido de arsénico e mitoxantrona (NCCN, 2011). A quimioterapia de consolidação/ intensificação consiste em elevadas doses dos mesmos agentes terapêuticos usados na fase de indução ou de diferentes agentes com o objetivo de aumentar a taxa de cura ou a duração da remissão. A combinação de fármacos e a duração da terapêutica de

consolidação poderão variar amplamente entre protocolos e populações de doentes; não obstante, poderão consistir em uma combinação de fármacos semelhantes àqueles utilizados durante a fase de indução. Elevadas doses de MTX, citarabina, 6-MP e L-asparaginase fazem parte deste regime terapêutico, particularmente, incorporado na terapêutica de crianças com LLA (NCCN, 2012). Adicionalmente, também poderão ser administrados nesta etapa inibidores da topoisomerase II. O tratamento após a terapêutica de indução da remissão será mais bem sucedido se incluir ciclos intermitentes de consolidação, intensificação e re-indução antes de prosseguir para a fase de manutenção da quimioterapia (WHO, s.d.).

Os doentes com LMA acima dos 60 anos, além de doses *standard* de citarabina, doses de antraciclina como idaurubicina, daunorubicina ou mitoxantrona poderão ser administradas, dependendo da resposta do doente ao tratamento de indução da remissão anterior. Em doentes jovens, estratégias para a terapêutica de consolidação são baseadas no risco de recaída, sendo que os doentes de maior risco terão uma terapêutica mais agressiva (NCCN, 2011).

A quimioterapia de manutenção possui longa duração, baixas doses de fármacos antineoplásicos combinados ou sozinhos são administrados em doentes que tenham alcançado a completa remissão, com a intenção de impedir o reaparecimento e crescimento de células tumorais residuais após as fases anteriores. Esta fase é mais frequente na LLA. A maioria dos regimes de manutenção é baseada na administração de 6-MP diária e MTX semanal (com a adição de corticosteroides e vincristina) durante dois anos em adultos e dois a três anos em crianças. Esta terapêutica é omitida em doentes LLA-células B maduras, dado que as remissões a longo prazo ocorrem rapidamente com ciclos de curta duração de uma quimioterapia intensiva (NCCN,2012). Em contraste com a LLA pediátrica, a quimioterapia em adultos com LLA continua a ser insatisfatória, a taxa de sobrevivência a longo prazo não apresentou alterações significativas nas últimas duas décadas com uma sobrevida global em 5 anos de apenas 30 a 40% para doentes com idade inferior a 60 anos, menos de 15% para doentes com idades acima dos 60 anos e menos de 5% para doentes com mais de 70 anos (Rowe, J. *et al*, 2007).

2.1. Antimetabolitos

Os antimetabolitos foram a primeira classe de fármacos amplamente bem-sucedida no tratamento das leucemias agudas. Estes incluem os **anti-folatos** (como o MTX), análogos de **purinas**, tais como tiopurinas (6-MP, 6-tioguanina (6-TG) e azatioprina (AZA)), **pirimidinas** (fluoropirimidinas, tais como 5-fluorouracil, capecitabina e citarabina) (Brunton, L. *et al.*, 2007). Dos fármacos referidos anteriormente, apenas o MTX, 6-MP e citarabina serão descritos, uma vez, que estes são os antimetabolitos clássicos utilizados na terapêutica das leucemias agudas.

2.1.1. Antifolato- Metotrexato

2.1.1.1. Mecanismo de acção

O MTX é um análogo do ácido fólico muito utilizado na leucemia linfoblástica aguda pediátrica sendo habitualmente administrado por via oral, intramuscular, intratecal ou como infusão intravenosa. A farmacocinética e farmacodinâmica do MTX mostram grande variabilidade independentemente da sua via de administração. Exerce a sua ação principal na via dos folatos pela inibição reversível competitiva da enzima dihidrofolato-reductase (DHFR), responsável pela conversão de dihidrofolato (DHF), produto da reação da timidilato sintase (TS), a tetrahydrofolato (THF). Ao inibir a formação de folatos reduzidos, este fármaco limita a quantidade de THF disponível para a biossíntese de purinas e timidilato e conseqüentemente de ADN, sendo deste modo um fármaco específico para a fase S do ciclo celular (Brunton, L. *et al.*, 2007).

O MTX entra, inicialmente, nas células tumorais através do transportador de folatos reduzidos, o transportador de solutos 19A1 (*Solute Carrier*, SLC19A1), enquanto que a saída através da membrana celular é mediada por vários transportadores de efluxo com domínio de ligação ao trifosfato de adenosina (*ATP-binding cassette*, ABC) (Mikkelsen, TS. *et al.*, 2011).

Nas **tabelas 2.1. e 2.2.** serão apresentados alguns dos transportadores de influxo e efluxo envolvidos na farmacodinâmica e farmacocinética do MTX.

Tabela 2.1. Transportadores de influxo responsáveis pela entrada do MTX nos enterócitos, células renais e hepatócitos (Adaptado de (Mikkelsen, TS. *et al.*, 2011).

Transportadores de Influxo	
Enterócito	SLC19A1; SLC46A1; SLC01A2
Célula renal	SLC 22 A6; SLC 22 A8
Hepatócito	SLC 19 A1; SLC0 1B1; SLC01B3

Tabela 2.2. Transportadores de efluxo responsáveis pela saída do MTX nos enterócitos, células renais e hepatócitos (Adaptado de Mikkelsen, TS. *et al.*, 2011).

Transportadores de Efluxo	
Enterócito	ABCC2; ABCB1; ABCG2; ABCC1; ABCC3
Célula renal	ABCC4; ABCC2 ; ABCG2
Hepatócito	ABCC3; ABCC4; ABCC2 ; ABCB1

Uma vez dentro das células, concentrações de MTX livre são metabolizadas a derivados poliglutamatos (MTX-PGs) através da adição de resíduos de glutamato ao fármaco pela ação da enzima folilpoliglutamato sintetase (FPGS). A adição de uma longa cadeia poliglutâmica lateral converte o fármaco de uma forma que facilmente seria eliminada do interior da célula para uma forma que permite ao fármaco ficar retido durante um maior tempo dentro desta. Estes derivados não só inibem a DHFR como também a TS. Os níveis MTX-PGs são sustentados no interior das células durante mais tempo do que os de MTX, uma vez que a degradação de MTXPGs depende da atividade da enzima lisossomal gama-glutamil hidrólase (GGH), que catalisa a remoção de poliglutamatos (Mikkelsen, TS. *et al.*, 2011).

2.1.1.2. Farmacocinética

O MTX possui uma ligação à albumina plasmática de cerca de 50%. A sua absorção oral depende da dose. É bem absorvido a baixas doses ($< 30\text{mg/m}^2$), sendo

que a sua biodisponibilidade depende destas (possui uma biodisponibilidade de cerca de 60% a baixas doses) . Cerca de 10% do fármaco é metabolizado na flora intestinal no seu metabolito inativo, *4-amino-4-deoxy-N-methylpteroic acid* (DAMPA), pela enzima carboxipeptidase. Também a nível hepático o MTX é convertido a 7-OH-MTX pela enzima aldeído oxidase hepática (Mikkelsen, TS. *et al.*, 2011).

O tempo de meia-vida do MTX para baixas doses é de 3-10h e para doses mais elevadas é de 8-15h. Atinge a concentração máxima no plasma quando administrado oralmente após 1 a 2h e quando administrado pela via IM após 30 a 60 min. A sua excreção ocorre preferencialmente pela via renal, sendo que cerca de 44% a 100% da dose administrada é eliminada na urina após a administração oral. Com administração intravenosa, 80% a 90% da dose administrada é excretada inalterada na urina após 24 horas. Existe também excreção biliar equivalente a 10% ou menos da dose administrada (Mikkelsen, TS. *et al.*, 2011; Brunton, L. *et al.*, 2007).

2.1.2. Análogos de purinas

2.1.2.1. Mecanismo de ação

A 6-MP e a 6-TG são análogos das bases purínicas, adenina e hipoxantina. Os fármacos tiopurínicos, como a 6-MP, são amplamente utilizados no tratamento de leucemias agudas (Brunton, L. *et al.*, 2007). Como pró-fármacos inativos, a 6-MP e 6-TG requerem a ativação intracelular, catalisada por várias enzimas, para exercer citotoxicidade.

O transporte de 6-MP para dentro da célula envolve os transportadores de influxo SLC28A2, SLC28A3, SLC29A1 e SLC29A2. Após a absorção, a 6-MP é convertida em tiososina monofosfato (TIMP) pela enzima hipoxantina-guanina fosforribosil-transferase (HPRT1), com 5-fosfo-D-ribose-1-pirofosfato (PRPP), como o dador de fosforibosil. De um modo semelhante, a 6-TG pode ser convertida em tioguanosina monofosfato (TGMP). A TIMP pode ser convertida em TGMP em duas etapas: na primeira tioxantosina monofosfato (TXMP) é formado pela ação da enzima desidrogenase monofosfato de inositol (IMPDH), na segunda etapa é formada TGMP pela ação da enzima guanosina monofosfato sintetase (GMP). Subsequentemente,

TGMP pode ser convertida em nucleótidos tioguanina difosfatados (TGDP) e trifosfatados (TGTP). A 6-MP compete com a hipoxantina e a guanina pela ligação à enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (HGPRTase), sendo, então, convertida por esta em ácido tioinosínico. Por sua vez, este nucleótido intracelular inibe várias reações que envolvem o ácido inosínico (IMP), incluindo a conversão de IMP em ácido xantílico (XMP) e a conversão de IMP em ácido adenílico (AMP) pela via da adenilossuccinato (SAMP). Por outro lado, a 6-metiltioinosinato (MTIMF) é formada pela metilação da TIMP. Tanto a TIMP como MTIMF inibem a enzima glutamina-5-fosforibosilpirofosfato amidotransferase, enzima da via de síntese de ribonucleotídeos purínicos. Os efeitos citotóxicos de medicamentos tiopurínicos são alcançados através da incorporação de tio-desoxiguanosina-trifosfato (TdGTP) no ADN e de tioguanosina trifosfato (TGTP) no ARN. A incorporação de TdGTP inibe a função de várias enzimas envolvidas na replicação e reparação do ADN, consequentemente resulta em quebras na cadeia, *cross-links* ADN-proteína e trocas de cromatídeos. Estes fármacos exercem também a sua ação citotóxica através da inibição da síntese de novas purinas por nucleótidos metilmercaptopurina (MeMMP).

Esta via que leva à síntese de metabolitos ativos está em concorrência com as vias de inativação catalisadas pelas enzimas xantina oxidase (XO) e tiopurina S-metiltransferase polimórfica (TPMT), as quais levam à formação de metabolitos metilados inativos. Os metabolitos inactivos resultantes destes processos metabólicos saem da célula através dos transportadores ABCC4 e ABCC5 (Zara, G. *et al.*, 2010).

2.1.2.2. Farmacocinética

A eliminação da 6-MP ocorre predominantemente por excreção renal. Após a administração oral de ³⁵S-6-MP, a urina contém 6-MP intacta, ácido tioúrico (formado pela oxidação direta da xantina oxidase) e 6-tiopurinas metiladas (Zara, G. *et al.*, 2010). A absorção oral da 6-MP é incompleta (uma média de 50% da dose administrada, aproximadamente) e variável. Os factores que influenciam a absorção ainda não estão claramente descritos. A 6-MP é pouco penetrável no SNC. A ligação a proteínas plasmáticas é em média cerca de 19% em um intervalo de concentração de 10 a 50

$\mu\text{g/mL}$, concentração apenas alcançada pela administração intravenosa de 6-MP com doses superiores a 5 a 10 mg/kg.

Após atingir o pico máximo de concentração no plasma (2h após a administração oral), os níveis plasmáticos diminuem seguindo uma cinética de eliminação trifásica com uma meia-vida inicial de cerca de 45 minutos, uma meia-vida intermediária de 2,5 horas e uma meia-vida terminal de aproximadamente 10 horas (Brunton, L., *et al.*, 2007).

2.1.3. Análogos de pirimidinas

2.1.3.1. Mecanismo de ação

A citarabina, conhecida também pela designação de arabinofuranosil citidina (Ara-C), é um análogo da 2'-deoxicitidina, sendo o antimetabolito mais importante usado no tratamento da LMA na fase de indução da remissão. Nas crianças e nos adultos com LLA e LMA com translocação t(4;11), altas doses de Ara-C são efetivas (Brunton, L. *et al.*, 2007).

Duas importantes famílias de proteínas transportadoras de nucleósidos humanos foram identificadas como tendo um importante papel na entrada de Ara-C na célula: hENT1 – hENT4 também conhecidos como SLC29A1 – SLC29A4 e hCNT1 – hCNT3 conhecidos por SLC28A1 – SLC28A3 (Cai, J. *et al.*, 2008). O transportador hENT1/SLC29A1, o mesmo utilizado pelos nucleósidos fisiológicos, tem sido considerado o principal responsável pela absorção celular de Ara-C.

Uma vez dentro da célula, o fármaco é metabolizado para a sua forma ativa, através da sua conversão para o nucleótido 5'-monofosfato (Ara-CMP) através da enzima desoxicitidina cinase (CDK). Por sua vez, o Ara-CMP poderá reagir com nucleótidos cinases para formar nucleotídeos de difosfato e trifosfato, Ara-CDP e Ara-CTP, respectivamente (Brunton, L. *et al.*, 2007). Ara-CTP compete com o substrato fisiológico desoxicitidina 5'-trifosfato (dCTP) pela incorporação nas cadeias de ADN. As bases de poliarabinonucleotídios não podem empilhar-se normalmente nas cadeias de ADN tal como as bases de polidesoxinucleotídios. Assim, desta forma os resíduos de Ara-CMP incorporados inibem a ADN polimerase alfa tanto na replicação

semiconservativa do ADN, na fase S do ciclo celular, como também durante a sua reparação através de um efeito no ADN polimerase. Por outro lado, a Ara-C é convertida intracelularmente em AraCDP-colina, um análogo da CDP-colina fisiológica, que inibe a síntese de glicoproteínas e glicolípidos da membrana celular. O Ara-CMP inibe a transferência de galactose, N-acetilglicosamina e ácido siálico para glicoproteínas da superfície celular, o que pode alterar a estrutura, antigenicidade e a função da membrana celular (Brunton, L. *et al.*, 2007). Ara-C e Ara-CMP podem ser convertidos nas suas formas inativas, Ara-U e Ara-UMP, pela ação das enzimas citidina desaminase (CDA) e desoxicitidilato desaminase (DCTD), respetivamente (Fig.2.1.) (Lamba, J. *et al.*, 2009).

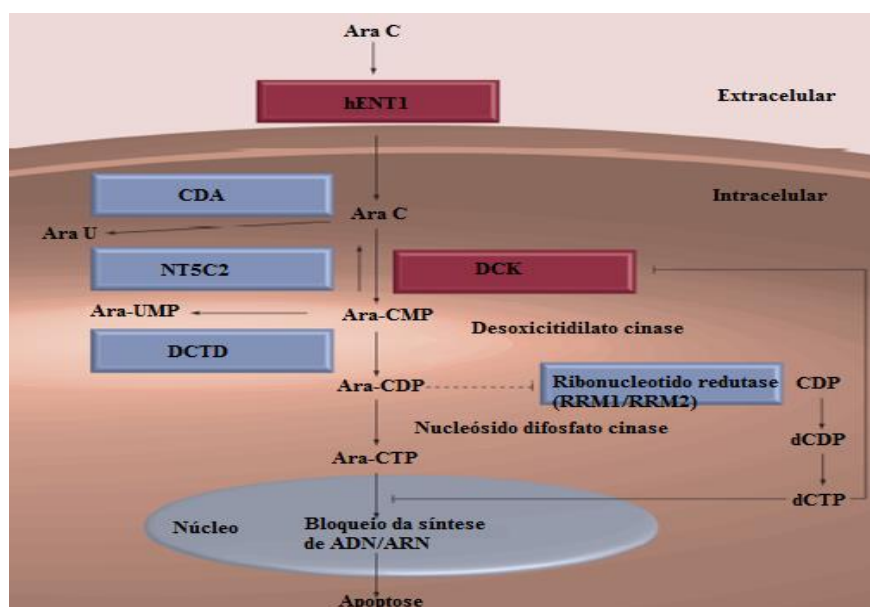


Figura 2.1. Vias metabólicas envolvendo o fármaco Ara-C (Adaptado de Lamba, J. *et al.*, 2009).

2.1.3.2. Farmacocinética

Dada a elevada concentração de CDA na mucosa gastrointestinal e no fígado, apenas cerca de 20% do fármaco atinge a circulação após a administração oral de Ara-C, pelo que esta não é administrada por esta via. Após a administração intravenosa verifica-se uma rápida fase de desaparecimento do fármaco com um tempo de meia-vida de 10 minutos, seguida de uma fase mais lenta de eliminação com um tempo de meia-

vida de cerca de 2 horas e 30 minutos. Uma quantidade inferior a 10% da dose administrada é excretada de modo inalterado na urina sob a forma de metabolito inativo, Ara-U, 12 a 24h após a administração. Após a administração IT (uma dose de 50 mg/m²), ocorre pouca desaminação de fármaco cuja concentração máxima atingida declina lentamente com um tempo de meia-vida de cerca de 3,4 horas. A ligação da Ara-C a proteínas plasmáticas é de cerca de 13% (Brunton, L. *et al.*, 2007).

2.2. Citotóxicos que interferem com a tubulina

A vincristina é um alcaloide purificado a partir da planta *Vinca rosea* Linn (pervinco) pertencente à família *Apocynaceae* muito utilizada na fase de indução da remissão na LLA pediátrica e adultos (Dennison, J. *et al.*, 2006) Torna-se particularmente importante quando utilizada em regime “CHOP”, ou seja, em conjunto com ciclofosfamida, doxorrubicina e prednisolona. Este fármaco liga-se especificamente à β -tubulina e bloqueia a sua polimerização com a α -tubulina, impedindo a formação dos microtúbulos. Consequentemente, devido ausência de um fuso mitótico intacto, os cromossomas duplicados não se poderão alinhar ao longo da placa de divisão, resultando em um bloqueio da mitose em metáfase (**Fig.2.2.**) (Brunton, L. *et al.*, 2007).

A exposição das células a este tipo de fármacos resulta na indução das proteínas supressoras de tumores, p53 e p21, e em uma rápida alteração na atividade de proteínas cinases. Estas proteínas são direta ou indiretamente responsáveis pela fosforilação de *B-cell lymphoma protein 2* (Bcl-2), resultando na inativação da função deste. A perda da função de Bcl-2 em conjunto com o aumento de p53 e p21 leva as células à apoptose (**Fig.2.2.**).

A vincristina poderá ainda interferir com o metabolismo de aminoácidos, bem como com a respiração celular e biossíntese de ácidos nucleicos e de lípidos. Dados obtidos de ensaios *in vitro* revelam que o CYP 3A4 bem como o CYP3A5 estão envolvidos na metabolização a nível hepático da vincristina.

Os transportadores de efluxo responsáveis pela saída do fármaco da célula são o ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC10 e *RalA-binding protein 1* (RALBP1), os quais foram associados à resistência a esta classe de fármacos (PharmaGKB, 2011).

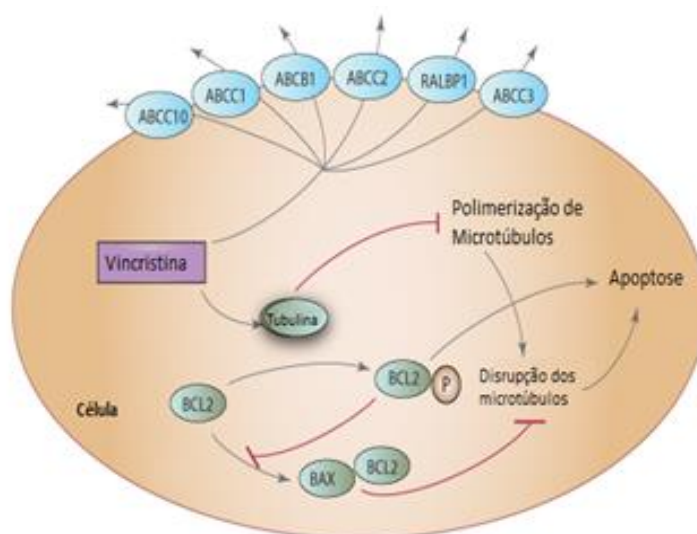


Figura 2.2. Mecanismo de ação da vincristina dentro da célula tumoral (Adaptado de PharmaGKB, 2011).

O número de estudos que investigam a farmacocinética clínica dos alcaloides da vinca é inferior ao de outros fármacos anti-tumorais, muito provavelmente devido às dificuldades analíticas causadas pelas baixas doses administradas. Os alcaloides da vinca são caracterizados pelo seu elevado volume de distribuição total, a sua rápida depuração no plasma e um tempo de meia-vida terminal elevado. Possuem uma ligação às proteínas plasmáticas de cerca 75%. A sua principal via de eliminação é a excreção fecal (PharmaGKB, 2011).

2.3. Antibióticos Antracíclicos

As primeiras antraciclina foram isoladas a partir do fungo *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, nos inícios dos anos 60, as quais foram designadas de doxorubicina (DOX) e daunorrubicina (DNR) (Minotti, G. *et al.*, 2004). Os antibióticos antracíclicos possuem uma estrutura de anel tetraciclina com um glícido, daunosamina, fixado por uma ligação glicosídica, todos os agentes citotóxicos desta classe possuem componentes quinona e hidroquinona em anéis adjacentes. A única diferença entre as moléculas de DOX e DNR é que a primeira possui na região terminal da cadeia lateral

um álcool primário, ao contrário da DNR que termina com um grupo metilo. Esta pequena diferença entre os dois fármacos terá consequências nos seus espectros de atividade. A idarrubicina é um análogo da DNR, sendo o seu espectro de atividade superior a esta devido, muito possivelmente, à sua lipofilicidade e absorção celular aumentadas (Brunton, L. *et al.*, 2007).

2.3.1. Vias metabólicas

Julga-se que a DOX entra na célula através do transportador de influxo SLC22A16 ou por difusão simples (Minotti, G. *et al.*, 2004). Existem três principais vias metabólicas no metabolismo desta antraciclina no interior da célula tumoral. Dois electrões reduzem a DOX a um álcool secundário, doxorubicinol (DOXol), sendo esta a principal via metabólica. Este metabolito DOXol é menos antineoplásico que a DOX mas mais cardiotoxico, pelo que a taxa individual desta reação pode afetar o efeito antitumoral e o risco de insuficiência cardíaca induzida pela DOX. Existem várias enzimas que podem realizar esta reação e a sua respetiva concentração é diferente em diferentes tipos de células. A AKR1A, um membro da superfamília aldo-ceto reductase (AKR), é considerada a mais importante no tecido cardíaco enquanto que a enzima carbonil reductase 1 (CBR1) é a principal enzima metabólica no fígado. CBR3 e AKR1C3 também têm um papel na formação de DOXol.

A segunda via metabólica da DOX corresponde a uma redução da DOX em um electrão, ficando esta reação ao cargo de várias oxidoreductases para formar o radical DOX-semiquinona. A re-oxidação do radical DOX-semiquinona a DOX, conduz à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e peróxido de hidrogénio. ROS, causador de *stress* oxidativo, poderá ser desativado pelas enzimas glutatona peroxidase (GPX1), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD1). Considera-se que são estas espécies reativas de oxigénio as responsáveis pelos efeitos cardiotoxicos da DOX (Thorn, C. *et al.* 2011).

2.3.2. Mecanismo de ação

Os mecanismos responsáveis pelos efeitos anti-proliferativos e citotóxicos dos antibióticos antracíclicos como a DOX e a DNR têm sido objeto de considerável

controvérsia. Nestes mecanismos incluem-se a intercalação e alquilação do ADN levando à inibição da sua síntese pela interferência com a separação da dupla hélice e com a atividade da helicase, a formação de radicais livres e efeitos diretos na membrana celular, inibição da topoisomerase II e consequentemente indução da apoptose.

Julga-se que a entrada da DOX no núcleo celular ocorre através da ligação a proteossomas, o fármaco liga-se à subunidade 20S do proteossoma formando um complexo DOX-proteossoma que entra no núcleo através de poros nucleares. De seguida o fármaco dissocia-se do proteossoma e liga-se à molécula de ADN, com a qual possui maior afinidade. Alguns estudos mostram que a interação DNA-DOX está relacionada com inibição da topoisomerase II mas não com a topoisomerase I.

As topoisomerasas modificam a topologia do ADN sem alterar a estrutura e sequência dos desoxinucleótidos. Podem causar quebras transientes na cadeia simples de ADN (topoisomerase I) e em ambas as cadeias (topoisomerase II), sendo que após alterar o estado de torção da hélice, as cadeias retornam à sua estrutura original. Esta atividade confere um papel importante às topoisomerasas, sendo que o superenrolamento da dupla hélice de ADN é modulado de acordo com a fase do ciclo celular e o seu estado da transcrição. As antraciclina atuam pela estabilização de um intermediário da reação, em que as cadeias de ADN são cortadas e covalentemente ligadas a tirosinas, impedindo desta forma o encerramento das cadeias e o retorno à estrutura original da dupla hélice. Os danos causados no ADN mediados pela ação das antraciclina na topoisomerase II são seguidos de paragem do crescimento celular nas fases G1 e G2 e consequentemente apoptose.

Estes antibióticos antracíclicos também poderão interagir com as membranas celulares produzindo peróxidos lipídicos e alterando as suas funções, o que pode desempenhar um importante papel quer na sua ação citotóxica, quer na sua cardiotoxicidade (Minotti, G. *et al.*, 2004).

A mitoxantrona, uma antracenediona utilizada para induzir remissão na LMA em adultos, possui mecanismos de ação semelhantes aos da DOX, DNR e seus análogos (Brunton, L. *et al.*, 2007).

A saída destes fármacos da célula realiza-se através dos transportadores ABCC1, ABCC2, ABCG2, RALBP1 e ABCB1 (Thorn, CF. *et al.*, 2011).

2.3.3. Farmacocinética

A daunorrubicina, doxorubicina e idarrubicina bem como a mitoxantrona são administradas por via intravenosa e depuradas do organismo, maioritariamente, por metabolismo hepático e excreção biliar. A curva de desaparecimento da doxorubicina é multifásica com meias-vidas de eliminação de 3h e de cerca de 30 horas e possui uma ligação a proteínas plasmáticas de cerca de 70%. A idaunorrubicina é metabolizada primariamente a idarrubicinol, que se acumula no plasma e que se assemelha ao composto original quanto à sua atividade. Possui meia-vida de cerca de 15h e o seu metabolito ativo, idarrubicinol tem meia-vida de cerca de 40 horas. O fármaco é eliminado predominantemente por via biliar em menor extensão pela via renal na forma de idarubicinol. Possui uma ligação a proteínas plasmáticas de cerca de 97%.

A daunorrubicina e a mitoxantrona possuem ligação as proteínas plasmáticas de 97% e 78% e um tempo de meia-vida de 18,5 horas e 75horas, respetivamente (Brunton, L. *et al.*, 2007).

2.4. Reações Adversas

É difícil prever exatamente quais os efeitos adversos decorrentes da quimioterapia, diferentes indivíduos reagem ao tratamento de diferentes formas. Por outro lado, as reações adversas variam de acordo com a dose e com a duração dos ciclos de quimioterapia. Neste capítulo serão descritos os efeitos adversos mais comuns da quimioterapia das leucemias agudas.

Um dos efeitos adversos mais comuns à maioria dos fármacos consiste na depressão da medula óssea acompanhada de leucopenia, trombocitopenia e anemia potencialmente grave. A mielosupressão prolongada poderá ocorrer em doentes que apresentem excreção tardia do fármaco, pelo que será um factor limitante da dose deste. Como consequência da depressão da medula óssea devido ao tratamento existe um risco acrescido de hemorragias e de infeções potencialmente fatais. Ao contrário do que ocorre com os antagonistas do ácido fólico, a depressão da medula óssea pela 6-MP desenvolve-se gradualmente. A leucopenia decorrente da administração de doxorubicina atinge o seu valor mínimo durante a segunda semana de quimioterapia enquanto que a trombocitopenia e a anemia seguem um padrão semelhante mas menos

pronunciadas. Outro efeito adverso comum em doses de quimioterapia são distúrbios gastrointestinais. Em cerca de 25% dos doentes adultos em que é administrada 6-MP observam-se náuseas, vômitos e anorexia, sendo que estas manifestações são mais frequentes nos adultos do que em crianças. Outras manifestações que poderão ocorrer são a alteração da flora intestinal, gengivites e úlceras gástricas ou intestinais. A 6-MP é menos tóxica para o sistema gastrointestinal do que os antagonistas do ácido fólico, contudo distúrbios gástricos poderão ocorrer, bem como hepatotoxicidade. Estes efeitos adversos são mais frequentes em adultos do que em crianças e mais prováveis em elevadas doses. Obstipação grave acompanhada de dor abdominal poderá ocorrer pela administração de altas doses de vincristina, contudo, poderão ser evitadas através de medidas profiláticas com terapêutica adequada. Para além da toxicidade hematológica e gastrointestinal, foram também relatadas manifestações dermatológicas como dermatite, *rash*, rubor facial e hiperpigmentação. A alopecia é um efeito adverso muito comum, contudo reversível, à maioria dos fármacos, ocorrendo em 20% a 60% dos doentes algumas semanas após o início do tratamento (WHO, s.d.).

Lise tumoral e consequentemente hiperuricemia são frequentes quando a 6-MP e Ara-C são administradas em doses elevadas. O clínico deverá monitorizar os níveis sanguíneos de ácido úrico do doente e estar alerta para o uso de medidas farmacológicas e de suporte necessárias. Efeitos adversos decorrentes de altas doses de MTX, como falha renal, por uma inadequada hidratação ou alcalinização da urina poderão ocorrer (Brunton, L. *et al.*, 2007).

Altas doses de Ara-C poderão ser responsáveis, ainda, por cardiomegalia, cardiomiopatia, hiperbilirrubinémia, neuropatia periférica (motora e sensitiva). A toxicidade clínica dos alcaloides da vinca é, maioritariamente, neurológica. A neurotoxicidade depende da dose e da administração concomitante de outros fármacos neurotóxicos ou da irradiação da medula espinal. Estas manifestações mais graves poderão ser evitadas ou revertidas com suspensão do fármaco ou redução da sua dose (Brunton, L. *et al.*, 2007; WHO, s.d.).

No que diz respeito aos antibióticos antracíclicos, uma característica singular destes é a miocardiopatia, podendo esta ser de dois tipos: alterações electrocardiográficas, incluindo o intervalo QT e onda T bem como arritmias e a toxicidade cumulativa crónica relacionada com a dose, manifestando-se através de uma

insuficiência cardíaca congestiva, a qual não responde a digitálicos. Enquanto que as primeiras são de breve duração e raramente constituem um problema grave, as segundas possuem uma taxa de mortalidade que ultrapassa os 50%. Tanto na população adulta como na população pediátrica pode ocorrer cardiotoxicidade de início tardio, com instalação de insuficiência cardíaca congestiva vários anos após o tratamento (Minotti, G. *et al.*, 2004; Brunton, L. *et al.*, 2007; Thorn, C. *et al.*, 2011).

3. Princípios gerais da Farmacogenómica

Os recentes avanços na pesquisa genómica lançaram luz sobre o papel crucial das variantes genéticas, envolvendo principalmente os genes que codificam enzimas responsáveis pela metabolização de fármacos, transportadores e alvos terapêuticos, na condução a diferentes respostas interindividuais à terapêutica, em termos de eficácia e segurança. Neste capítulo serão descritos alguns dos princípios básicos da farmacogenómica incluindo factores relevantes para a disponibilidade de fármacos – enzimas de metabolização de fase I e de fase II bem como transportadores.

3.1. Enzimas de fase I

3.1.1. Citocromo P450

A biotransformação de fármacos poderá ser dividida, de um modo geral, em duas fases. As reações de fase I transformam o fármaco em metabolitos polares pela adição de grupos funcionais como – OH, –NH, –NH₂, e – SH. Estas reações incluem N- e O-desalquilação e hidroxilação aromática e alifática. As enzimas mais importantes nesta fase são as do citocromo P450 (Jancova, P. *et al*, 2010).

A família dos citocromos P450 (também designado por CYP ou P450) é a mais importante família de enzimas responsável pela metabolização de uma larga quantidade de substratos de estruturas similares, tanto compostos endógenos como xenobióticos. Consistindo numa superfamília de hemoproteínas, os citocromos P450 podem ser encontrados em todo o tipo de organismos, localiza-se em vários tecidos com particular relevância nas células hepáticas e podem ser encontrados no interior delas tanto no reticulo endoplasmático como associado à membrana da mitocôndria (Wang, J.F. *et al.*, 2009). As enzimas encontradas na mitocôndria estão envolvidas, normalmente, na síntese e metabolismo de compostos endógenos, enquanto que aquelas presentes no reticulo endoplasmático metabolizam, preferencialmente, compostos exógenos.

Alguns fármacos são excretados de forma inalterada na urina e nas fezes sem sofrer qualquer tipo de reação metabólica no fígado, contudo a maioria possui um

metabolismo complexo em que estão envolvidas diversas enzimas, entre as quais os citocromos P450. Esta superfamília é capaz de catalisar uma grande variedade de reações químicas, nomeadamente oxidações, desidrogenações e isomerizações, tendo sido identificados 57 CYPs, organizados em 18 famílias e 43 subfamílias (Preissner, S. *et al.*, 2009). Enzimas da mesma família possuem 40% de homologia na sua sequência de aminoácidos enquanto que enzimas da mesma subfamília apresentam 55%. CYPs das famílias 1, 2 e 3 são da maior importância uma vez que metabolizam mais de 90% de todos os fármacos. De entre todas as famílias de CYPs, a mais abundante é CYP3A, com o CYP3A4 e CYP3A5 a serem as enzimas chave desta família. O CYP 3A4 é o CYP3A dominante no fígado e no intestino, sendo que 24 alelos diferentes (*1-*24) foram identificados para esta enzima (Cheok, M. *et al.*, 2006a). O CYP 3A4 é responsável pela metabolização de mais de 50% dos fármacos, pelo que polimorfismos nestas enzimas poderão resultar em importantes manifestações clínicas (Wang, J.F. *et al.*, 2009).

O conhecimento da estrutura e função destas enzimas têm representado um grande desafio desde que foram descobertas no início dos anos 60. Desde a identificação da primeira estrutura tridimensional de um CYP bacteriano mais de 70 estruturas de CYPs foram descritas. Uma vez que todas os CYPs conhecidos de mamíferos estão associados à membrana, quer no retículo endoplasmático ou na membrana interna das mitocôndrias, torna-se complexo o estudo estrutural por cristalografia de raio-X. No entanto, estudos recentes conseguiram revelar as estruturas 3D de vários CYPs de mamíferos através deste método.

A estrutura primária destas enzimas é muito divergente, uma vez que estas evoluíram de modo a catalisar o metabolismo de numerosas moléculas estruturalmente diversas. Apesar de uma estrutura primária diversificada, as enzimas do citocromo P450 em muitos organismos e famílias diferentes apresentam um elevado grau de conservação tanto ao nível da estrutura secundária como terciária (**Figura 3.1.**). A estrutura global compreende doze hélices designadas de A a L, “*loops*” e um grupo prostético comum, uma protoporfirina contendo ferro (grupo heme), ligada a um grupo tiolato de uma cisteína da apoproteína. O grupo heme está localizado entre as hélices I e L. As variações no posicionamento de elementos da estrutura secundária dos CYPs bem

como o tamanho dos “*loops*” contribuem para a grande diversidade de estruturas no centro ativo, resultando na especificidade de substrato.

As regiões mais importantes para a compreensão da especificidade entre CYPs são pequenos segmentos de proteínas em contacto com os substratos correspondentes ao “*loop*” entre as hélices B e C posicionado sobre o grupo heme, descrito como o local de reconhecimento do substrato 1 (SRS1), à hélice I sobre o grupo heme (SRS4), à região N-terminal rica em folhas β (SRS5 em β 3) e à região final das folhas β (SRS6 em β 4). Por outro lado, as variações na sequência e comprimento do “*loop*” são observadas entre as hélices F e G (SRS2 e SRS3).

A hélice I poderá servir como ponto de referência quando olhamos para a estrutura global do CYP. Com aproximadamente 30 aminoácidos, localiza-se no centro da molécula acima do grupo heme e contém um par de resíduos de tirosina (ou serina) e asparagina (ou glutamina) altamente conservados, essenciais para a reação catalítica da monooxigenase (Sugimoto, H. *et al.*, 2012).

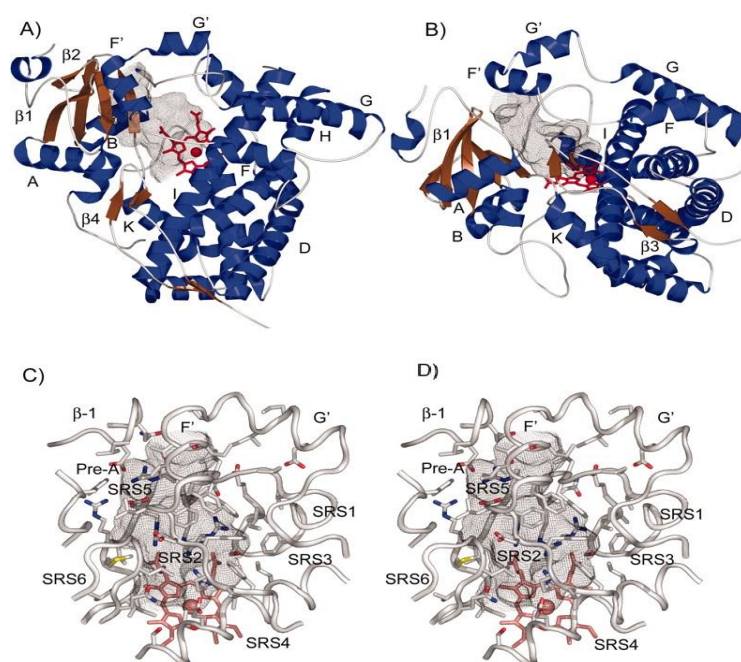


Figura 3.1.- Estruturas secundária e terciária do citocromo microsomal humano P450 3A4 determinadas por cristalografia de raios-X (resolução 2.05-Å). A e B correspondem à vista distal e lateral, respetivamente. Podem-se observar a azul as hélices alfa, a castanho as folhas beta e o grupo heme a vermelho. C e D correspondem a uma vista ampliada dos sítios ativos do CYP 3A4. (Adaptado de Yano, J. K. *et al.*, 2004).

A variabilidade dos genes que codificam enzimas que metabolizam fármacos, como os citocromos P450, muitas vezes afecta o resultado destes na terapêutica de forma muito significativa, neste sentido, polimorfismos nestes genes desempenham um papel muito importante neste aspeto. De acordo com esta variabilidade as populações podem ser classificadas em três fenótipos principais:

- os metabolizadores ultra-rápidos (*ultra-rapid metabolizers*, UM), com mais de dois genes ativos que codificam para um determinado CYP;
- os metabolizadores rápidos (*extensive metabolizers*, EM), que transportam dois genes funcionais;
- os metabolizadores lentos (*poor metabolizers*, PM), com falta de uma enzima funcional devido a genes mutados ou deletados.

Além disso, poderá ocorrer um fenótipo mais subtil designado de

- metabolizadores intermediários (IM), geralmente transportando um alelo funcional e um mutado ou ainda, dois alelos parcialmente mutados.

No que diz respeito à influência de genes polimórficos na biodisponibilidade de fármacos e na sua ação torna-se evidente que genes que codificam enzimas metabolizadoras desempenham um papel proeminente devido à sua influência na eliminação dos fármacos, afetando o desempenho destes na terapêutica de muitas doenças. De uma forma geral, estima-se que 20% a 25% de todas as terapêuticas farmacológicas são influenciadas por polimorfismos afetando a ação dos fármacos, assim sendo, polimorfismos em CYPs desempenham um papel crítico uma vez que estas enzimas são responsáveis por cerca de 80% de todo o metabolismo de fase I de fármacos, o que faz com que o campo da farmacogenética de CYPs seja de grande importância na prática clínica (Ingelman-Sundberg, M. *et al.*, 2007).

3.1.1.1. Aspetos moleculares dos polimorfismos genéticos do CYP P450

Os genes de CYPs humanos são altamente polimórficos, sendo que, atualmente, estão determinados mais de 350 alelos funcionalmente diferentes, isto é, variantes de genes que afetam a sua função e que também podem afetar a atividade dos seus produtos. Os polimorfismos funcionais podem consistir em deleções, duplicações ou

mutações pontuais criando produtos de genes inativos, como por exemplo, pequenas inserções ou deleções que causam alterações do quadro de leitura do gene. Para além destes, também poderão ocorrer alterações na sequência de aminoácidos, que poderão modificar a especificidade para o substrato, e mutações em intrões criando situações de *splicing* alternativo. Outro aspeto importante nos polimorfismos de *CYP* é a variação do número de cópias (CNV), estes segmentos de ADN, com cerca de 1 kb, possuem um número de cópias variável de um dos alelos de um gene funcional em comparação com o genoma de referência, o que poderá ter consequências fenotípicas dramáticas como o aumento no metabolismo de fármacos e, conseqüentemente, ausência da resposta terapêutica na dose normal bem como a perturbação da regulação génica de longo alcance. Ao contrário do que se pensou inicialmente, este fenómeno é muito comum no genoma humano, tendo sido identificados um total de 1447 CNV, abrangendo 360Mb (cerca de 12% do genoma), alguns dos quais correspondentes a enzimas metabolizadoras de fármacos.

A variabilidade interindividual da expressão de *CYP* poderá também ser justificada por alterações na regulação da expressão do gene. Um exemplo, corresponde à regulação por miARNs, uma família de ARNs não codificantes, que têm como alvo o ARNm. Aqueles controlam a expressão do gene ligando-se à região 3'-UTR do ARNm, o que leva à formação de um complexo de ribonucleoproteína designado complexo de silenciamento induzido no ARN (RISC) que orienta o reconhecimento e repressão da tradução ou degradação de ARNs alvo. Assim a regulação por miARN é potenciada em genes que contenham regiões 3'-UTR longas, sendo exemplos disto os *CYP2B6* e *CYP3A4* envolvidos no metabolismo da ciclofosfamida, entre outros. Deste modo, alterações genéticas nos locais de ligação do mARN alvo ou no precursor de miARN, poderão contribuir para uma variabilidade na expressão do *CYP*.

Para além dos miARNs, a metilação do ADN também corresponde um meio de regular a expressão do gene, podendo esta ser feita através de dois mecanismos: a metilação de genes promotores impedindo a ligação de alguns factores de transcrição aos seus sítios de ligação e mecanismos de metilação do ADN envolvendo mudanças na conformação da cromatina impedindo a expressão do gene.

Além dos factores genéticos, o controlo epigenético de *CYP* poderá também desempenhar um papel crucial para perceber a regulação da expressão destas enzimas,

especialmente naquelas que exibem variação interindividual, mas para as quais nenhuma variante genética na região do promotor ou em regiões codificantes foram identificadas (Ingelman-Sundgerg, M. *et al.*, 2007).

3.1.2. Aldeído desidrogenase

A enzima aldeído desidrogenase (ALDH) é responsável por catalisar a oxidação irreversível de aldeídos alifáticos e aromáticos aos seus ácidos carboxílicos correspondentes, tendo NAD- (P)⁺ como cofator. Estas enzimas estão envolvidas na oxidação de compostos endógenos bem como de inúmeros xenobióticos. As ALDH são expressas num vasta gama de tecidos, e têm sido classificadas em três classes, as ALDH de classe 1 citosólicas, ALDH de classe 2 mitocondriais e ALDH de classe 3 expressas em alguns tipos de tumores (Crabb, D.W. *et al.*, 2004). Estas enzimas, principalmente ALDH1A1 e ALDH3A1, são responsáveis pela via de destoxificação de compostos activos derivados do metabolismo da ciclofosfamida (aldofosfamida) bem como compostos inativos mas tóxicos para o organismo (acroleína), pelo que o estudo de variantes genéticas nos genes que codificam estas enzimas são de grande importância (Gervasini, G. *et al.*, 2012; Pinto, N. *et al.*, 2009).

3.2. Enzimas de fase II

As enzimas de fase II desempenham um papel importante na biotransformação de compostos endógenos e exogéneos, da mesma forma que as enzimas de fase I, tornando-os em compostos hidrofílicos e portanto, mais facilmente excretáveis pelo organismo. Estas enzimas são responsáveis por realizar reações de conjugação tais como, sulfatação, acetilação, metilação, glucuronidação e conjugação com glutathione e aminoácidos. As enzimas de fase II responsáveis pelo metabolismo de fármacos são, principalmente transferases: UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), sulfotransferases (SULTs), N-acetiltransferases (NATs), glutathione S-transferases (GSTs) e diversas metiltransferases, nomeadamente a tiopurina S-metiltransferase (TPMT) e catecol O-metiltransferase (COMT). Deste grupo destacam-se as enzimas UGTs, GSTs e TPMT

envolvidas no metabolismo dos fármacos usados na terapêutica das leucemias agudas. Ao contrário do que acontece com os citocromos P450, as enzimas de fase II têm sido alvo de uma menor atenção, uma vez que interações entre fármacos envolvendo estas enzimas são relativamente raras. Não obstante, uma capacidade de metabolização reduzida destas enzimas poderá levar ao aparecimento de efeitos adversos (Jancova, P. *et al.*, 2010).

3.2.1. UDP- Glucuronosiltransferases

A formação de compostos conjugados é a via de destoxificação mais importante no metabolismo de fármacos de fase II. Aproximadamente 40 a 70% de todos os fármacos são sujeitos a reações de glucuronidação por UGTs. Estas pertencem à superfamília de enzimas ligadas à membrana celular capazes de catalisar a formação de uma ligação entre um grupo nucleófilo com uridina-5'difosfo- α -D-acido glucurónico (UDPGA) (**Figura 3.2.**). Todas as UGTs são capazes de conjugar UDPGA com álcoois alifáticos, fenóis, ácidos carboxílicos e aminas (Jancova, P. *et al.*, 2010).

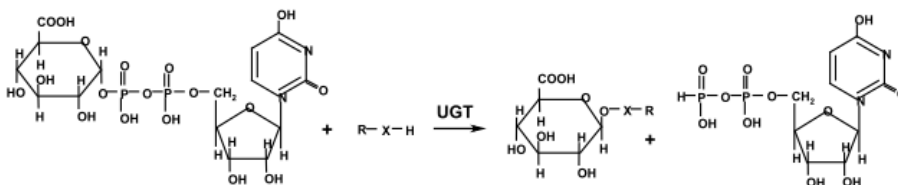


Figura 3.2. Reação de conjugação de UDPGA com um substrato nucleófilo catalisado pela UGT levando à formação de β -D-glucuronido e uridina difosfato (Adaptado de Jancova, P. *et al.*, 2010).

No Homem quatro famílias de UGTs foram identificadas: UGT1 e UGT2, dividida na subfamília 2A e 2B, UGT3 e UGT8. Enquanto as duas primeiras intervêm no metabolismo de compostos endógenos e xenobióticos, a UGT8 tem um papel importante de biossíntese ao nível do sistema nervoso. As enzimas de cada família partilham, no mínimo, 40% de homologia na sua sequência de ADN enquanto que enzimas de cada subfamília partilham cerca de 60%. Recentemente foram identificadas vinte e duas UGTs pertencentes às famílias 1,2,3 e 8, sendo que a maioria encontra-se amplamente distribuída pelos tecidos, estando localizadas preferencialmente no fígado.

As enzimas UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7 e 2B15 são consideradas as mais importantes enzimas de metabolização de fármacos no fígado, enquanto que a UGT1A7, 1A8 e 1A10 são expressas principalmente no trato gastrointestinal, pelo que serão particularmente importantes na biodisponibilidade oral de fármacos. Geralmente, as UGTs estão ligadas ao retículo endoplasmático ficando o seu sitio de ligação ao substrato exposto para o lúmen (Jancova, P. *et al.*, 2010).

3.2.2. Glutathione S-transferases

A glutathione S-transferase (GST), uma das mais importantes enzimas de destoxificação de fase II, está envolvida no metabolismo de xenobióticos assim como bem como na proteção de celular contra o *stress* oxidativo. Esta família de enzimas é responsável por catalisar a formação de conjugados tioéteres entre xenobióticos e glutathione (**Figura 3.3.**). GSTs podem catalisar uma série de reações incluindo substituições nucleófilas aromáticas, isomerizações, redução de hiperperóxidos e conjugação de diversos compostos hidrofóbicos e eletrofílicos com glutathione reduzida, assumindo uma papel essencial na destoxificação de epóxidos derivados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs). A maior função biológica das GSTs consiste na defesa contra eletrófilos reativos e tóxicos como as espécies reativas de oxigénio, radicais superóxido e peróxido de hidrogénio, que se originam a partir de processos metabólicos celulares normais, muitos dos quais formados pelas reações oxidativas catalisadas por citocromos P450.

Foram identificadas duas superfamílias de GST, uma superfamília de GST solúveis dividida em oito classes: Alfa (α), Kappa (κ), Mu (μ), Pi (π), Sigma (σ), Teta (θ) e Zeta (ζ) sendo que no Homem as enzimas GSTs pertencem as classes alfa (A1-A4), Um (M1-M5), Pi (P1), Kappa (K1) e Teta (T1 e T2). Estas estão presentes no citoplasma celular, principalmente podendo encontrar-se também no núcleo ou na mitocôndria. A outra superfamília de GST, proteínas associadas à membrana, está envolvida no metabolismo do ácido araquidónico. Ambas as superfamílias de GSTs estão amplamente distribuídas por vários órgãos como fígado, rins, cérebro e pâncreas (Jancova, P. *et al.*, 2010).

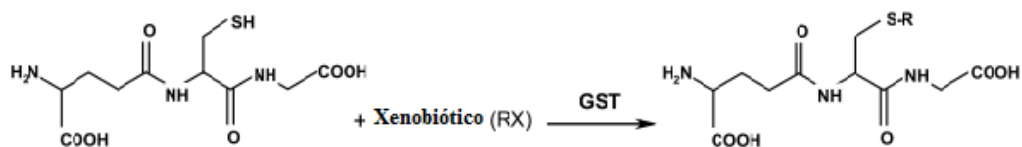


Figura 3.3. Formação de glutationa-S-conjugada (Adaptado de Jancova, P. *et al.*, 2010).

3.2.3. Tiopurina S-metiltransferase

A tiopurina S-metiltransferase (TPMT), uma enzima citosólica dependente de S-adenosil L-metionina, catalisa a S-metilação de fármacos tiopurínicos citotóxicos e imunossupressores como 6-MP, 6-TG e azatioprina (AZA) bem como outros compostos aromáticos heterocíclicos (Wang, L. *et al.*, 2010). A TPMT encontra-se em elevadas concentrações no fígado e rins e em níveis mais baixos no cérebro e pulmões. Os níveis de actividade da TPMT nos tecidos são altamente regulados por polimorfismos genéticos (Jancova, P. *et al.*, 2010), estes têm tido um forte impacto clínico devido à sua forte associação com a variação interindividual na toxicidade e eficácia da terapêutica com fármacos tiopurínicos (Alves, S. *et al.*, 2000). Com um papel crucial no tratamento das leucemias agudas, as tiopurinas são pró-fármacos que requerem a bioactivação pela enzima hipoxantina fosforibosiltransferase para formar nucleotídeos 6-tioguanina. Este processo de activação está em competição com a via de inactivação que consiste em duas reacções: conversão metabólica pela TPMT que leva à formação de metabolitos metilados inactivos e oxidação catalisada pela xantina oxidase (**Fig.3.4.**) (Jancova, P. *et al.*, 2010). A via da metilação é de extrema importância nos tecidos hematopoiéticos uma vez que a enzima xantina oxidase não se encontra expressa nestes tecidos pelo que a TPMT é a principal via de inactivação de fármacos tiopurínicos (Lennard, L *et al.*, 1987). Assim, a actividade comprometida desta enzima poderá causar uma acumulação de nucleotídeos tiopurínicos e manifestações de citotoxicidade (Jancova, P. *et al.*, 2010).

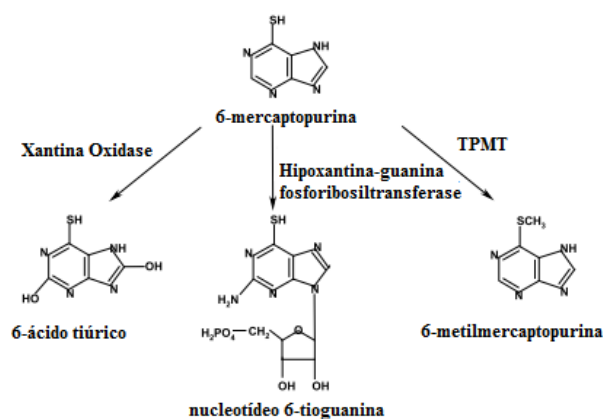


Figura 3.4. Esquema simplificado do metabolismo da 6-mercaptopurina (Adaptado de Jancova, P. *et al* 2010).

O gene *TPMT* possui 34kb de comprimento e consiste em 10 exões (**Fig.3.5**). Até hoje, um total de cerca de 28 alelos, obtidos como o resultado de polimorfismos genéticos, foi identificado, a maioria dos quais está associada com a diminuição da atividade da enzima (Wang, L. *et al* 2010).

A *TPMT*3A* e *TPMT*3C*, os alelos mutados mais frequentes, possuem uma distribuição a nível mundial bastante distinta. *TPMT*3A* representa de 60 a 89% de todos os alelos mutados nas populações de descendência europeia, seguido do *TPMT*3C* que compreende 5 a 15% dos alelos mutados. Dentro da população africana e asiática o alelo *TPMT*3A* está ausente e o alelo *TPMT*3C* é quase o único alelo mutado (Alves, S. *et al.*, 2004). Contudo, em algumas populações africanas, como em Moçambicanos, foi também identificado o alelo *TPMT*8* (Alves, S. *et al* 2004; Wang, L. *et al.*, 2010). Em termos moleculares, os alelos *TPMT*3A* e *TPMT*3C* são idênticos, ambos compartilham uma substituição $\text{A} \rightarrow \text{G}$ na posição 719 do exão 10 e, além disso, a *TPMT*3A* contém uma transição $\text{G} \rightarrow \text{A}$ na posição 460 no exão 7 (**Fig.3.5**). A variante *TPMT*3A* é um haplótipo resultado do *linkage disequilibrium* entre *TPMT*3C* e *TPMT*3B* (G460A). Na população portuguesa a distribuição alélica para *TPMT* está de acordo com o descrito para as populações caucasianas, ou seja, o alelo *TPMT*3A* representa o alelo mutado predominante (Alves, S. *et al.*, 2004).

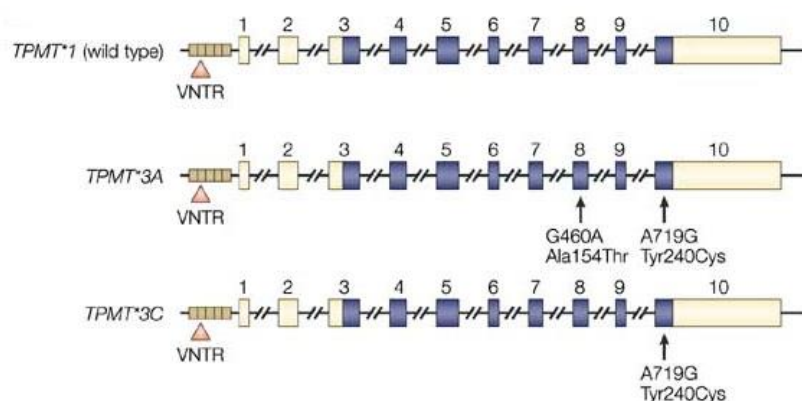


Figura 3.5. Representação esquemática do alelo *wild-type* para o gene da TPMT, TPMT*1, bem como dois dos alelos variantes para a baixa atividade enzimática. Os retângulos a roxo representam os exões que codificam a ORF, os brancos representam as sequências ou porções não codificantes. Os polimorfismos nos alelos variantes estão também representados. Todos os exões estão numerados de 1 a 10. (Adaptado de Weinshilboum, R *et al.*, 2004).

3.3. Transportadores

3.3.1. Transportadores de Influxo

Os transportadores de soluto (*solute-carrier*, SLC) pertencem a uma superfamília de transportadores que inclui transportadores passivos, simporte (co-transporte) e antiporte (contra-transporte), e podem localizar-se em todas as membranas celulares bem como nas membranas de organelos. Atualmente estão identificadas 55 famílias de transportadores SLC designadas de SLC1 a SLC20 e de SLC22 a SLC47. A família de transportadores de aniões orgânicos SLC21, originalmente designada desta forma, é atualmente designada de SLCO da qual fazem parte seis subfamílias altamente divergentes. Cerca de 20 a 25% de homologia na sequência de aminoácidos é partilhada pelos membros pertencentes à mesma família e de acordo com esta assim será a especificidade ao substrato. Estes transportadores são capazes de transportar através das membranas substratos tão diversos como catiões e aniões orgânicos, aminoácidos e oligopéptidos, glucose, sais biliares e aniões orgânicos, iões metálicos, vitaminas e cofatores, neurotransmissores, lípidos e prostaglandinas, nucleósidos e nucleótidos assim como diversos fármacos.

As quatro das seis subfamílias SLCO (também designados por transportadores de aniões orgânicos, OATPs) estão envolvidas no transporte de aniões orgânicos em células epiteliais. A subfamília SLCO1, com quatro membros, está envolvida no

transporte de fármacos, assim como os membros das subfamílias SLCO5 e SLCO6 (He, L. *et al.*, 2008). Dos onze transportadores humanos, OATP1B1, OATP1B3 e OATP2B1 estão expressos na membrana sinusoidal dos hepatócitos e podem facilitar a entrada para o fígado dos fármacos seus substratos. OATP1A2 é expresso na membrana dos enterócitos e na barreira hematoencefálica, potencialmente mediando o transporte de fármacos nestes locais. A variabilidade genética em genes que codificam transportadores OATP pode resultar em diferenças interindividuais na farmacocinética. Por exemplo, um SNP no gene *SLCO1B1* poderá diminuir a capacidade da proteína exercer a sua função de transporte ativo de diversos fármacos, para o interior dos hepatócitos, resultando em um aumento das concentrações plasmáticas de fármaco e consequentemente risco de toxicidade. Para além deste transportador, também o OATP1A2, 1B3 e 2B1 têm um papel importante na farmacocinética de vários fármacos (Kalliokoski, A. *et al.*, 2009).

3.3.2. Transportadores de Efluxo

Os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) constituem uma das maiores superfamílias de proteínas. Com uma estrutura e função relativamente conservadas, usam a energia da hidrólise de ATP para transportar uma vasta variedade de moléculas através da membrana celular. Atualmente, estão identificados 48 membros nesta família de transportadores que, com base na sua homologia estrutural, foram subdivididos em sete famílias, designadas de A a G. Estes transportadores participam em inúmeros processos celulares incluindo metabolismo, transporte de compostos exógenos e endógenos, como lípidos e aniões orgânicos, e exibem diferentes propriedades catalíticas entre si, como especificidade de substrato e modo de transporte. Os transportadores ABC estão localizados na membrana plasmática e nas membranas de organelos como complexo de Golgi, retículo endoplasmático e mitocôndria (Lin, T. *et al.*, 2006).

A estrutura básica destas proteínas é definida por quatro domínios, dois domínios transmembranares (TMDs ou MSDs) e dois domínios de ligação a nucleótidos (NBDs). Estes transportadores podem apresentar-se em uma só cadeia polipeptídica (*full transporters*) ou em duas proteínas separadas (*half transporters*), que funcionam como

homo- ou heterodímeros, pelo que requerem dimerização para se tornarem funcionais. Os TMDs contêm cadeias peptídicas que formam seis hélices- α transmembranares por domínio, em um total de doze hélices nos *full transporters* (**Fig.3.6.**) (Glavinas, H. *et al.*, 2004; Lin, T. *et al.*, 2006).

Quando comparadas as várias subfamílias de transportadores ABC, uma das maiores diferenças entre elas é a presença de uma extensão N-terminal adicional no domínio transmembranar (TMD0) em alguns membros da subfamília ABCC. Um dos transportadores mais bem estudados é a P-glicoproteína (P-gp) de resistência a vários fármacos (*multidrug resistance*, MDR1) também conhecida por ABCB1, uma enzima glicosilada associada à membrana celular, caracterizada por duas metades idênticas cada qual com um NBD, capaz de transportar para fora da célula um vasto número de fármacos, entre os quais antibióticos antracíclicos, vincristina e vinblastina. (Lin, T. *et al.*, 2006).

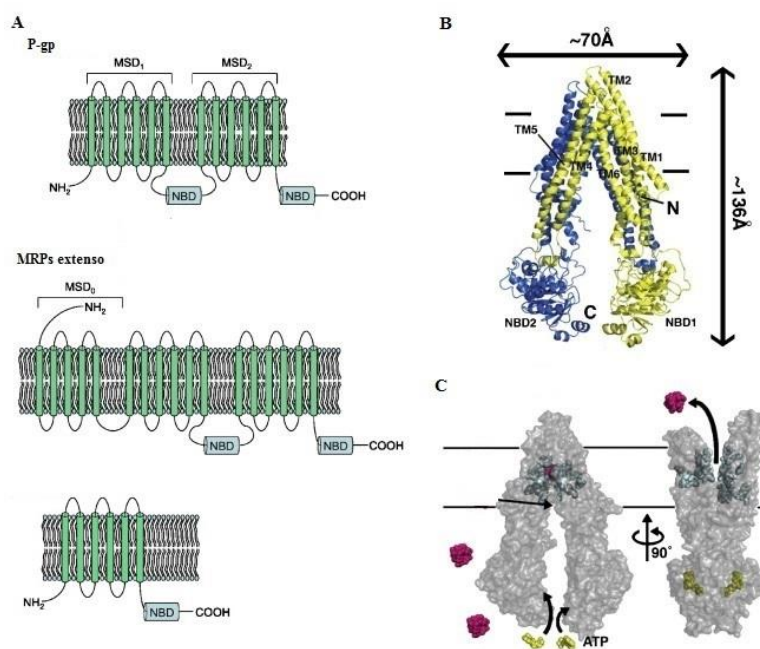


Figura 3.6. Topologia de transportadores ABC e modelo do mecanismo de transporte. (A) Estão representados os dois domínios transmembranares (MSDs ou TMs) e os domínios de ligação ao substrato (NBDs) para o P-gp. Alguns membros da família MRP (ABCC) possuem uma extensão N-terminal adicional (MSD₀). Está também representado um *half transporter*. (B) Estrutura da P-gp mostrando os seus domínios transmembranares (TMs) e NBDs. (C) Mecanismo de transporte mostrando a mudança conformacional como resultado da ligação do ATP (Adaptado de Fukuda, Y. *et al.*, 2012).

A P-gp foi o primeiro transportador ABC responsável pela resistência a fármacos a ser descoberto e é, ainda, o mais vastamente estudado (Glavinas, H. *et al.*, 2004). Esta

P-gp foi identificada como causa da diminuição intracelular de diversos fármacos, pela saída ativa destes da célula. A deleção do gene *ABCB1* não foi identificada, contudo, variantes não funcionais foram observadas em diversos indivíduos. Muitas destas variantes têm sido estudadas pela sua potencial influência na expressão e função de muitos transportadores. Foram identificados 1279 SNPs no gene *ABCB1*, 62 dos quais estão na região codificante (Hodges, L. *et al.*, 2011).

O gene *ABCB1* é vastamente expresso em tecidos normais com função de excreção como o fígado, rim e intestino, assim como é capaz de exercer funções de barreira como na barreira hematoencefálica. A expressão do *ABCB1* protege ativamente as células contra a morte celular, uma vez que ao transportar para fora da célula compostos endógenos e exógenos, reduz no organismo a quantidade de substâncias potencialmente nocivas. Por outro lado esta função de proteção da célula poderá causar resistência a diversos fármacos (Lin, T. *et al.*, 2006).

Outro membro da família de transportadores ABC bem estudado é ABCG2 (também designado de MXR/BCRP1/ABCP), um *half-transporter*. Ao contrário de outros *half-transporters* que se encontram localizados nas membranas de organelos intracelulares, o ABCG2 é expresso exclusivamente na membrana plasmática tanto em tecidos normais como em tecidos tumorais, pelo que foi determinada a sua associação com a resistência a alguns fármacos usados no tratamento do cancro. A subfamília C de transportadores ABC (ABCC) possui 12 membros, em que nove pertencem ao grupo de *multiresistance protein* (MRPs), MRP1-MRP9 ou ABCC1-ABCC6 e ABCC10-ABCC12, sendo os MRP1-MRP6 os que se encontram mais bem caracterizados. Os membros da subfamília MRP para além de serem importantes no transporte de substâncias fisiológicas, são também importantes no transporte de aniões orgânicos tóxicos. Os quatro maiores transportadores ABC, ABCB1/P-gp/MDR1, ABCC2/cMOAT/MRP2, ABCG2/BCRP/MXR e ABCC4/MRP4, têm sido encontrados na membrana apical dos enterócitos pelo que terão um papel importante na absorção intestinal de fármacos e consequentemente na resistência da célula a estes. Por outro lado, estes transportadores constituem o principal grupo de proteínas responsáveis pela resistência aos fármacos usados no tratamento de cancro (Glavinas, H. *et al.*, 2004).

Secção II - A Influência da
farmacogenómica na terapêutica
das leucemias agudas

1. Farmacogenómica na terapêutica das leucemias agudas

Depois de mais de 50 anos de pesquisas nas áreas da farmacogenómica e da farmacogenética, observa-se que diferenças genéticas entre indivíduos podem explicar alguma da variabilidade observada na farmacocinética, eficácia e toxicidade de alguns fármacos. Embora muitos estudos relacionem diferentes respostas farmacológicas com a variabilidade genética, a maioria daqueles aplicam-se à população adulta pelo que a atenção dada à população pediátrica tem sido muito menor. Os doentes pediátricos constituem um grupo vulnerável uma vez que apresentam diferenças decorrentes das diferentes fases de desenvolvimento (Russo, R. *et al*, 2011). A quimioterapia, neste caso, pode causar significativos efeitos adversos ou, por outro lado, alguns doentes poderão apresentar resistência ao tratamento. Assim, o aperfeiçoamento na terapêutica das leucemias agudas é urgente. A ação dos fármacos é influenciada pela interação de muitos produtos de genes que determinam a farmacocinética e farmacodinâmica da quimioterapia. O objetivo da farmacogenómica é estudar os determinantes genómicos relevantes para a resposta ao fármaco, seleccioná-los bem como às suas dosagens de acordo com o perfil genético de cada paciente e da sua capacidade para metabolizar, eliminar e responder a fármacos específicos (Kager, L. *et al* 2009). A aplicação destes princípios no tratamento do cancro tem em vista não somente a obtenção de benefício a partir de abordagens personalizadas de tratamento mas também de prevenção.

Apesar da quantidade considerável de novos fármacos concebidos com base em um conhecimento das alterações moleculares do cancro, uma grande lacuna entre o conhecimento de farmacogenómica e a sua aplicação clínica ainda persiste (Savonarola, A. *et al*, 2012). A eficácia da quimioterapia em doentes com leucemias agudas tem aumentado significativamente nos últimos 20 anos e, como tal, o foco de pesquisa tem sido lentamente alterado de modo a reduzir a toxicidade associada aos fármacos e aumentar as taxas de cura. Assim, uma vez que a quimioterapia envolve ainda um número reduzido de fármacos de elevado perfil tóxico, um elevado número de polimorfismos genéticos, nomeadamente polimorfismos em um único nucleótido (SNP) têm sido identificados, tendo-se verificado que estes podem assumir um papel fulcral na farmacocinética e farmacodinâmica destes fármacos (Gervasini, G. *et al*, 2012). Aqueles

poderão ter a capacidade de mediar respostas diferenciais dos doentes aos fármacos sendo deste modo excelentes alvos de estudo. Tais genes envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica incluem aqueles que são responsáveis pela absorção, excreção, transporte, metabolismo celular e alvos terapêuticos. Polimorfismos nestes genes podem, teoricamente, levar a uma maior ou menor dose de fármaco e conseqüentemente afetar a eficácia ou a toxicidade. Alternativamente, mudanças nos alvos terapêuticos poderão diminuir ou intensificar a resposta celular ao fármaco ou aos seus metabolitos ativos e igualmente afetar a toxicidade ou eficácia. Deste modo, numerosos estudos têm investigado as alterações genéticas nestes genes e o seu papel na resposta dos doentes à quimioterapia (Meeke, N.D. *et al*, 2000).

Neste capítulo, serão abordados alguns dos polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo, transporte ou alvos terapêuticos em alguns dos fármacos usados na quimioterapia das leucemias agudas com um especial destaque para os polimorfismos que podem ser utilizados na prática clínica, a fim de reduzir a ocorrência de efeitos adversos graves (Gervasini, G. *et al*, 2012) e proporcionar a informação necessária para o desenvolvimento de uma terapêutica personalizada para estes doentes (Innocenti, F. *et al*, 2011).

1.1. A Farmacogenômica na terapêutica com metotrexato

1.1.1. Polimorfismos nos genes envolvidos na via dos folatos.

Polimorfismos no gene *MTHFR*

De todos os genes envolvidos na via dos folatos, as variações genéticas no gene *MTHFR* tem sido as mais extensivamente estudadas. A *MTHFR* é a enzima chave para o metabolismo e homeostasia dos folatos, estando envolvida na remetilação da homocisteína essencial para a metilação do ADN. Uma diminuição na atividade desta enzima, pela presença de SNPs por exemplo, poderá levar a uma maior quantidade de substrato para a enzima TS, e assim aumentar a síntese de ADN, o que resultará em uma menor atividade antileucémica. Em alternativa, a redução da conversão de 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato pode conduzir à inibição de reações de metilação (Hung, L. *et al*, 2008), o que levará a alterações na quantidade de folatos

reduzidos e a hiperhomocisteinemia, afetando tanto a eficácia como a toxicidade de fármacos antifolato, como o MTX.

Pelo menos quinze polimorfismos foram identificados no *MTHFR*, no entanto, a maioria dos estudos foca-se apenas em dois deles que se julgam importantes a nível clínico (Gervasini, G. *et al.*, 2009). Um deles corresponde à transição 677C> T, a qual causa uma substituição de uma alanina por uma valina no codão 222 (Ala222Val), e que parece estar associada a uma redução de 30 a 60% na atividade da enzima, o outro corresponde à transição de 1298C> A, que origina a substituição de um ácido glutâmico por uma alanina no codão 429 (Glu429Ala) (D'Angelo, V. *et al.*, 2011). Vários estudos têm mostrado um aumento da toxicidade do MTX e o aumento do risco de recidiva em doentes com o alelo variante para *MTHFR* C677T, tanto em adultos como em crianças com LLA (Gervasini, G. *et al.*, 2009).

Segundo D'Angelo *et al.* portadores de polimorfismos funcionais no *MTHFR* revelaram diferentes graus de toxicidade, quando comparadas duas doses diferentes (2 g/m² em doentes de baixo risco e 5 g/m² em doentes de alto risco ou com LLA das células B) administradas durante a fase de consolidação. Especialmente no grupo que recebeu doses mais baixas, doentes homozigóticos 677TT apresentaram um risco doze vezes superior (*Odds ratio* (OR) de 12,2; Intervalo de confiança para 95% (IC 95%) de 2.54-58.9; *P* =0.001) de desenvolver toxicidade em relação a outros genótipos, o que poderá estar associado a uma menor atividade da *MTHFR*. Contudo, a toxicidade global foi mais evidente no grupo que recebeu doses mais elevadas. No que diz respeito a diferentes tipos de toxicidade, doentes portadores do genótipo 677TT no grupo que recebeu doses menores de MTX, apresentaram um risco 13 vezes superior (OR=13,44; IC 95% =2,21-81,77; *P*=0,002) de desenvolver toxicidade não hematológica comparativamente a outros genótipos.

De acordo com os investigadores, julga-se que tal se deve ao aumento agudo nos níveis de homocisteína logo após a administração de MTX, ao fato de polimorfismos no *MTHFR* também causarem um aumento dos níveis de homocisteína e por último de a homocisteína parecer ter um papel relevante na hepatotoxicidade. Neste estudo não foram obtidos dados significativos que associassem a toxicidade do MTX com o polimorfismo 1298C> A. Quando foi avaliada a relação entre polimorfismos neste gene e o risco de recaída, este estudo mostrou que o polimorfismo *MTHFR* 677C> T apresentava um maior risco da ocorrência de eventos adversos, quando todo o grupo foi

estratificado de acordo com os genótipos ($P = 0,008$). Não foram encontradas diferenças significativas para os doentes estratificados de acordo com o polimorfismo *MTHFR* 1298A> C ($P = 0,7$), como mostra a **tabela 1.1**. Em detalhe, o genótipo 677TT foi associado a um maior risco de recidiva quando comparado com outros genótipos (OR= 2.9; IC 95% = 1.23-6.9; $P=0.01$)

Tabela 1.1. Número de casos de doentes com e sem recaída da doença em função do genótipo de *MTHFR* para os polimorfismos 677C> T e 1298A> C (Adaptado de D'Angelo, V. *et al.*, 2011).

Genótipo <i>MTHFR</i>	Número total de casos n = 151	Número de indivíduos sem recaída (%)	Número de indivíduos com recaída (%)	P
677CC	48	32(66,6)	16(33,3)	0,008
677CT	71	55(77,5)	16(22,5)	
677TT	32	15(46,8)	17(53,1)	
1298AA	43	30(69,7)	13(30,2)	0,7
1298AC	83	54(65)	29(35)	
1298CC	25	18(72)	7(28)	

Os valores entre parêntesis representam a percentagem de indivíduos do grupo total (n=151).

Estes investigadores observaram também que os portadores do genótipo 677TT apresentaram uma sobrevida livre de doença em 7 anos (*Disease-free survival*, DFS) e uma sobrevida global em 7 anos (*Overall survival*, OS) menor do que os portadores do alelo 677C, (63.7% vs 36.2%) e (76% vs 48%), respetivamente, como mostra a **figura 1.1**. (D'Angelo, V. *et al.*, 2011).

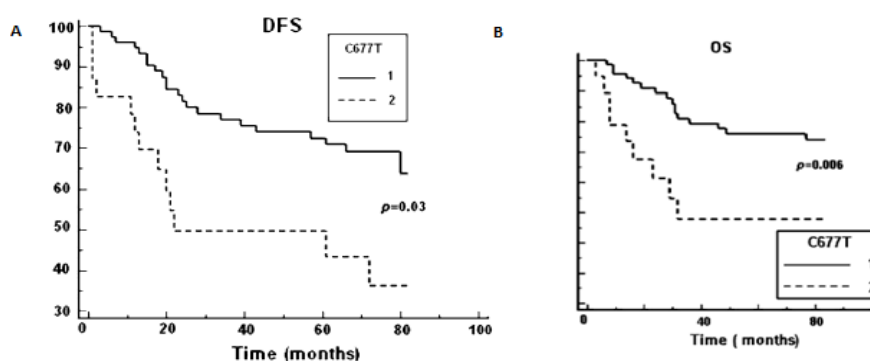


Figura 1.1. Gráfico A- Análise por Kaplan –Meier comparando as curvas de sobrevida livre de doença (*disease-free survival*, DFS) em 7 anos de *follow-up* para os diferentes genótipos de *MTHFR* 677C>T. A **curva 1** representa os portadores dos genótipos 677CC e 677CT e a **curva 2** os portadores do genótipo 677TT. **Gráfico B-** Análise por Kaplan –Meier comparando as curvas de sobrevida global (*overall survival*, OS) em 7 anos de *follow-up* para os diferentes genótipos de *MTHFR* 677C>T. A **curva 1** representa os portadores dos genótipos 677CC e 677CT e a **curva 2** os portadores do genótipo 677TT (D'Angelo, V. *et al.*, 2011).

Também de acordo com estes resultados está um estudo desenvolvido por Aplenc *et al.*, onde se observou uma associação entre este SNP e o risco de recaída em 520 crianças com LLA (Aplenc, R. *et al.* 2005). A par destes estudos está Ongaro *et al.* que observaram que o genótipo 677TT conferia uma menor probabilidade de sobrevivência em adultos com LLA sujeitos a quimioterapia de manutenção (Ongaro, A. *et al.* 2009). Usando linfoblastos provenientes de doentes com LLA que sofriam de toxicidade, Taub *et al.* observaram que os doentes com o genótipo 677TT exibiram uma maior sensibilidade ao MTX *in vitro* quando comparados aos doentes com outros genótipos (Taub, J.W. *et al.* 2002).

Não obstante, estes resultados parecem estar em oposição a estudos onde a variante 677C> T não aumentou o risco de toxicidade do MTX em crianças com LLA. Por sua vez Aplenc *et al.*, também reportou que 677C> T não foi associado a toxicidade numa *cohort* de doentes com LLA (Aplenc, R. *et al.* 2005).

Estes estudos analisaram os efeitos de MTX em dosagens de manutenção, pelo que os resultados podem ser influenciados por efeitos tóxicos cumulativos de vários fármacos, bem como baixas doses de MTX (D'Angelo, V. *et al.*, 2011).

Os resultados dos estudos sobre o impacto da variante 1298C>A sobre a toxicidade e eficácia relacionada com MTX têm sido ainda mais inconsistentes do que aqueles sobre 677C> T. Uma recente meta-análise realizada por Yang *et al.*, bem como uma perceção geral da literatura desenvolvida por Gervasini, *et al.*, levam a pensar que 677C> T é o único SNP que desempenha um papel clinicamente significativo, embora existam resultados contraditórios (Huang, L *et al.*, 2008; Kantar, M. *et al.*, 2009; Gervasini, G. *et al.*, 2009; Yang, L. *et al.*, 2012).

Segundo Gervasini, *et al.*, o uso de diferentes protocolos de tratamento entre os estudos, o uso de pequenas e não homogêneas populações de paciente, a inclusão de diferentes etnias, fatores ambientais como a dieta, a existência de interação entre SNPs e, sobretudo, a heterogeneidade dos parâmetros de eficácia podem ser razões por trás das inconsistências mencionadas (Gervasini, G. *et al.*, 2009).

Polimorfismos no gene *MTRR*

O polimorfismo 66A>G no gene *MTRR* foi descrito pela primeira vez por Wilson *et al.* embora a sua função na modulação dos níveis de homocisteína seja ainda controversa (Wilson, A. *et al.*, 1999).

Com base neste dado, de Jonge *et al.* conduziram um estudo que pretendia averiguar de que modo polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo de folatos, afetariam a sensibilidade *in vitro* de linfoblastos ao MTX. Assim, o estudo consistiu em analisar, entre vários polimorfismos, o SNP 66A> G no gene *MTRR* em uma amostra de 157 doentes pediátricos. De Jonge *et al.* descreveram pela primeira vez este polimorfismo como um determinante farmacogenético na eficácia do MTX e com os resultados obtidos foi possível verificar que este polimorfismo foi responsável por uma menor sensibilidade ao MTX *in vitro* (De Jonge, R. *et al.*, 2005).

Mais tarde o mesmo grupo desenvolveu um estudo envolvendo uma *cohort* de 81 crianças com LLA tratadas com altas doses de MTX. Os doentes foram classificados como sendo de alto e baixo risco, pelo que as doses de MTX administradas foram de quatro ciclos de 3g/m² a cada duas semanas e 2g/m² todas as semanas durante três semanas, respetivamente. A ocorrência de efeitos adversos foi estudada relativamente aos diferentes genótipos. Segundo Hung *et al.*, um número significativamente maior de doentes com os genótipos *MTRR* 66AG e 66GG apresentaram mucosite oral, um dos efeitos adversos mais comuns provocados por MTX, quando comparado com doentes com o genótipo *wild-type* ($P=0,018$). A função desta enzima é manter em níveis adequados a metilcobalamina, um cofator responsável por catalisar a remetilização de homocisteína para metionina, pelo que polimorfismos no *MTRR* poderão alterar a atividade da enzima, o que consequentemente resultará em uma alteração na distribuição de folatos. De acordo com estes autores, o efeito exato de polimorfismos neste gene sobre a atividade da enzima são desconhecidos pelo que a sua associação com os efeitos adversos provocados pelo MTX permanece especulativa.

Em contraste com os resultados acima descritos, neste estudo observou-se também que doentes de alto risco, portadores do genótipo *MTRR* 66AG apresentavam uma recuperação mais rápida dos níveis plaquetários comparativamente aos portadores do genótipo *wild-type* (*MTRR* 66AA) ($P=0,004$), embora isso não se tenha refletido em um menor grau de toxicidade. Segundo os próprios autores, este último achado gera dúvidas em relação à sua relevância clínica, uma vez que esta associação apenas foi observada para genótipos heterozigóticos. Por outro lado, os resultados obtidos neste estudo estão em contraste com o estudo anteriormente descrito conduzido pelo mesmo grupo de investigadores, pelo que estes sugerem que seja necessário mais estudos para correlacionar este polimorfismo, a citotoxicidade nas células leucémicas e a ocorrência

de efeitos adversos, bem como estudos adicionais acerca do papel deste polimorfismo na mudança de atividade da enzima. Assim, uma vez que este foi um estudo retrospectivo com uma pequena amostra de doentes, será necessário no futuro uma confirmação destes resultados em um estudo prospetivo, incluindo um maior número de doentes e correlacionando múltiplas variáveis como a idade, sexo e níveis tóxicos de MTX (Hung, L. *et al.*, 2008).

Para além deste, muitos outros estudos não têm encontrado uma associação entre este polimorfismo e os efeitos adversos observados em doentes pediátricos com LLA a receber MTX.

As razões para as discrepâncias observadas poderão dever-se às limitações já descritas. Dado todos estes estudos contraditórios, sobretudo com resultados negativos, é muito provável que o impacto clínico do SNP *MTRR* 66A> G, a existir, deverá ser mais significativo em associação com outros polimorfismos (Gervasini, G. *et al.*, 2009).

Polimorfismos no gene *DHFR*

A enzima *DHFR*, como foi referido anteriormente, é o principal alvo terapêutico do MTX pois este atua na enzima inibindo-a competitivamente o que resulta em uma alteração da regeneração de THF a partir de DHF e conseqüentemente em um bloqueio na síntese de purinas e pirimidinas.

Diversos estudos indicam que um aumento da expressão de *DHFR* poderá conferir um fenótipo de resistência ao MTX. Isto sugere portanto, que polimorfismos, particularmente aqueles que se encontram nas regiões reguladoras do gene, poderão afetar a expressão do *DHFR* e modular a resposta ao MTX. Tanto em estudos clínicos, como em estudos experimentais observou-se uma alteração dos níveis de *DHFR* e/ou uma diminuição da formação do complexo *DHFR*-MTX em doentes que apresentaram recaída da doença (Gervasini, G. *et al.*, 2009).

De acordo com estes dados, Dulucq *et al.* analisaram o impacto de polimorfismos na região do promotor do gene, numa região até 2kb a montante do local do início da transcrição, através da associação de polimorfismos individuais, haplótipos e do polimorfismo ins/del de 19-bp com a eficácia do tratamento da LLA.

Este estudo envolveu 277 crianças diagnosticadas com LLA, que receberam altas doses de MTX (4 g/m²) durante a fase de indução e uma dose semanal de 30 a 45

mg/m² durante as fases de consolidação (doentes de risco *standard*) e manutenção (em todos os doentes).

A associação do genótipo/haplótipos com a eficácia do tratamento foi avaliada em todos os doentes através da análise de sobrevida livre de evento (*Event-free survival*, EFS), DFS e OS. Estes investigadores observaram a presença de quinze polimorfismos no promotor do gene, um dos quais uma mutação ins/del de 19-pb, como pode ser observado na **figura 1.2**.

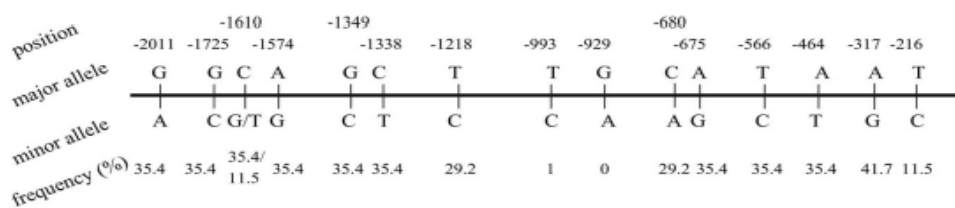


Figura 1.2. Polimorfismos no promotor do gene *DHFR* com as respectivas frequências alelicas mínimas (Dulucq, S. *et al.*, 2008).

Dulucq *et al.* verificaram que três variantes na região do promotor (-1610C>G/T, -680C>A e -317A>G) apresentaram influência na eficácia do tratamento: indivíduos homocigóticos para os alelos -317A e -1610C apresentaram uma menor EFS ($P= 0,03$ e $P= 0,02$, respetivamente) (**Figura 1.3.**), enquanto que a presença do alelo -1610T foi associada a uma melhor EFS ($P=0,05$). Resultados semelhantes foram observados para aqueles dois locais polimórficos no que diz respeito a DFS e uma tendência semelhante foi observada para OS apesar de nenhuma associação ter sido significativa para este.

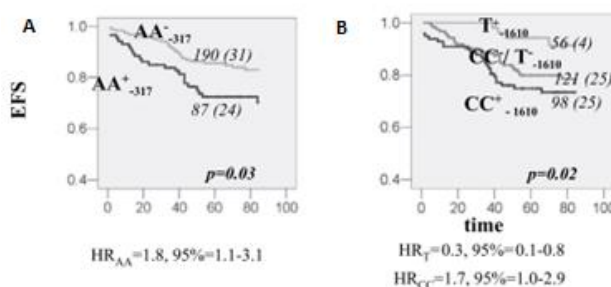


Figura 1.3. A sobrevida livre de evento (*event-free survival*, EFS) para os doentes com LLA de acordo com o genótipo para *DHFR*. **Gráfico A-** Curvas de EFS para os doentes que apresentam ou não o genótipo *DHFR* -317AA. **Gráfico B -** Curvas de EFS de acordo com os genótipos para o polimorfismo -1610C> T. As taxas de Risco (*Hazard rate*,HR), com intervalo de confiança para 95%, associada a cada genótipo são apresentadas assim como o valor de P (Dulucq, S. *et al.*, 2008).

Todas as variantes observadas no promotor foram organizadas em cinco haplótipos. Estes investigadores estudaram também se haplótipos específicos, principalmente aqueles contendo os alelos -610T, -1610C e -317C estavam associados com a falta de eficácia do tratamento. Os resultados revelaram que o haplótipo *1 (*1a e *1b) apresentava os alelos -317A e -1610C enquanto que o haplótipo *5 apenas o alelo -317A. Pelo contrário, o haplótipo *4 era o único com o alelo -1610T. Os portadores do haplótipo *1 apresentaram uma EFS reduzida ao passo que aqueles com o haplótipo *4 apresentaram uma melhor EFS, como se pode observar pela **figura 1.4**.

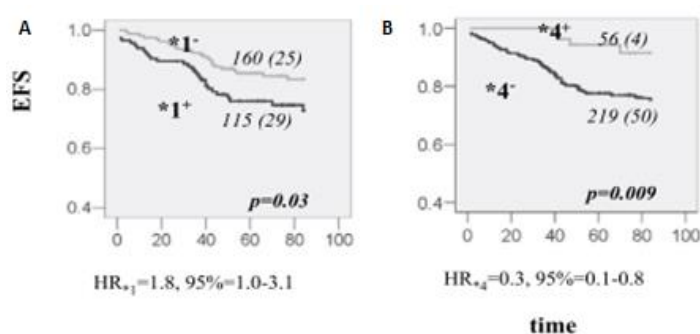


Figura 1.4. A sobrevida livre de evento (*event-free survival*, EFS) para os doentes com LLA de acordo com o genótipo para *DHFR*. Gráfico A- EFS para doentes que são portadores ou não de *DHFR* haplótipo *1. Gráfico B- EFS para doentes que são portadores ou não de *DHFR* haplótipo *4. As taxas de risco (HR), com intervalo de confiança para 95%, associada a cada genótipo são apresentadas assim como o valor de *P* (Dulucq, S. *et al.*, 2008).

Nenhuma diferença na EFS foi observada em portadores do haplotipo *5. Segundo os autores, o efeito do haplótipo *1 parece ser devido, principalmente, ao subtipo *1a. Polimorfismos e haplótipos na região do promotor do gene não foram associados com toxicidade.

De modo a definir, em termos funcionais, as consequências destas variantes e os haplótipos derivados, Dulucq *et al.* realizaram uma análise quantitativa de ARNm e um ensaio funcional com um gene *repórter*. Através deste último método e usando três diferentes linhas celulares, os investigadores observaram uma transcrição 1,5 a 2 vezes superior nos portadores dos haplótipos *1 e *5 quando comparado com os restantes ($P < 0,01$).

Os resultados da análise quantitativa de ARNm revelaram diferentes níveis deste em genótipos do polimorfismo -1610C> G/T, com níveis mais elevados no genótipo -1610CC ($P = 0,001$). Entre os portadores do haplótipo *1, indivíduos com os pares de

haplótipos *1*1 e *1*3 apresentaram níveis mais elevados de ARNm ($P=0,008$) quando comparado com os portadores dos restantes pares de haplótipos, **figura 1.5**.

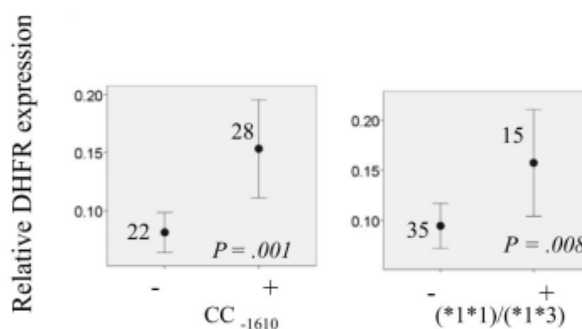


Figura 1.5. Transcrição de acordo com os genótipos e haplótipos de *DHFR*. Níveis ARNm de acordo com a presença ou ausência do genótipo *DHFR* -1610CC e dos pares de haplótipos *1*1 e *1*3. O valor médio de expressão para um intervalo de confiança de 95%, o número de indivíduos assim como o valor P estão representados (Dulucq, S. *et al.*, 2008).

Assim, ao contrário do que seria esperado os resultados revelaram uma maior transcrição associada ao haplótipo *5 no ensaio do gene *repórter*, apesar de os portadores deste haplótipo não apresentarem alterações nos níveis de ARNm e na EFS. Os subtipos *5a e *5b apresentam polimorfismos idênticos, não podendo ser diferenciados no ensaio do gene *repórter*. A análise da frequência de haplótipos sugere que apenas o *5b, um haplótipo raro, está associado com a risco de recaída o que possivelmente, segundo estes investigadores, poderá explicar o porquê da associação com os níveis de ARNm e com a EFS não ter sido visível, quando todos os portadores do haplótipo *5 foram analisados em conjunto. Por outro lado, outros mecanismos poderão regular de forma diferente os haplótipos *5a e *5b, inclusive outros polimorfismos ou mecanismos epigenéticos poderão desempenhar um papel importante nesse aspeto. Também é possível que esta regulação desigual entre *5a e *5b possa dever-se às linhas celulares usados no ensaio do gene *repórter*, explicando as diferenças na atividade transcripcional observadas.

Para Dulucq *et al.*, uma análise adicional seria necessária para perceber a potencial diferença no funcionamento dos subtipos *5a e *5b, ainda que a relevância de *5b em relação a outras variantes capazes de desencadear uma recaída da doença, provavelmente permaneceria baixa dada a sua menor frequência.

Por último foi avaliado o efeito combinado de *DHFR* com os genes *TS* e ciclina D1 (*CCND1*). O haplótipo *1, associado com o aumento da transcrição *in vitro* e *in vivo* e

com a redução de EFS, foi avaliado para o seu efeito conjunto com *CCND1* 870AA e *TS* 3R3R, os quais revelaram serem capazes de reduzir EFS no mesmo grupo de doentes. A redução de EFS foi proporcional a estes genótipos ($P < 0,001$) e o risco de recaída aumentou em indivíduos portadores dos três genótipos de risco (Taxa de risco (*Hazard rate*, HR) de 8,0; IC95%: 2,7-23,5). Não houve associação entre os parâmetros de toxicidade estudados e o aumento do número de genótipos de risco (Dulucq, S. *et al.*, 2008).

Para além desta região reguladora do *DHFR*, o gene possui também um promotor principal, responsável por controlar a transcrição de ARNm codificante, no local de iniciação da transcrição deste. Existe, pelo contrário, um outro local de início da transcrição de um ARN não codificante. Assim, esta região localizada entre os locais de início da transcrição do ARN não codificante e do ARNm codificante (~400pb), parece apresentar uma dupla função, correspondendo simultaneamente a ARN não codificante e à principal região reguladora de *DHFR* (**Figura 1.6.**).

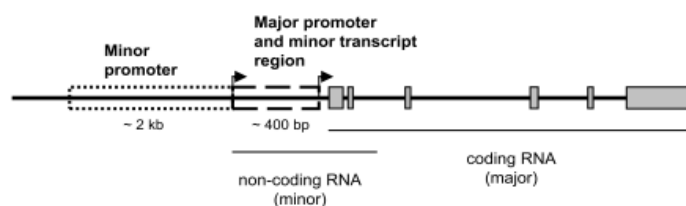


Figura 1.6. Organização do gene *DHFR* humano. Este apresenta um ARN menor (que não codifica) e um ARN maior (codificante). A região de interesse fica localizada entre os locais de início da transcrição da maior e menor região a ser transcrita, indicado por setas (Al-Shakfa, F. *et al.*, 2009).

Perante estes últimos dados, um estudo posterior conduzido pelo mesmo grupo de investigadores pretendeu estudar polimorfismos nesta região e analisar a associação entre estes, derivados haplótipos e a expressão de *DHFR* com a eficácia do tratamento da LLA. Foi estudada também a relação entre polimorfismos nesta região e os polimorfismos descritos no estudo anterior.

Al-Shakfa *et al.*, identificaram seis polimorfismos nesta região reguladora de 400 pb, cinco SNPs e um polimorfismo constituído por uma ins/del de 9 pb na posição 63 e um número variável de 9 pb na posição 91, como mostra a **figura 1.7A.**

De modo a definir a relação entre os polimorfismos estudados anteriormente, os três tagSNPs (-1610C> G/T; -680C> A; -317A> G) foram também incluídos na análise.

Todos os polimorfismos, presentes nas duas regiões reguladoras, foram organizados em oito haplótipos comuns. Três dos haplótipos anteriormente identificados (*3-*5) não sofreram qualquer alteração com a inclusão de polimorfismos do promotor principal. Pelo contrário, o haplótipo *1 identificado anteriormente foi agora dividido em cinco subtipos de *1a a *1e, **figura 1.7B**.

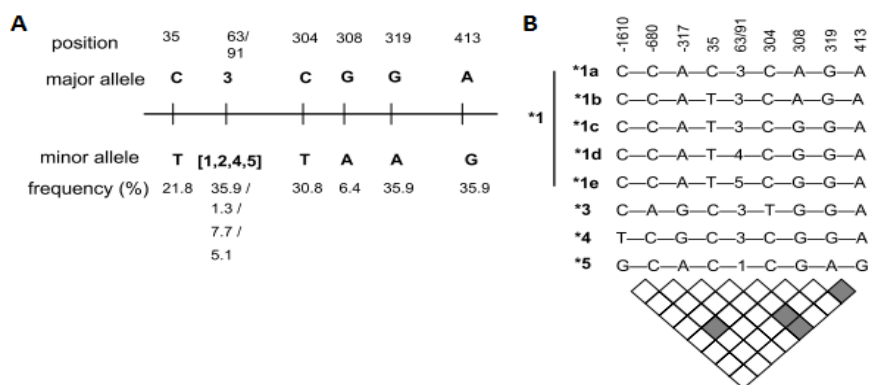


Figura 1.7. A: Polimorfismos localizados na região do promotor, até 400-bp a *upstream* do local do início da transcrição do ARN codificante. A frequência alélica em controlos (39 indivíduos saudáveis) é também mostrada. **B:** Haplótipos derivados dos nove polimorfismos no promotor (incluindo os três tagSNPs previamente identificados no estudo anterior no promotor menor, posições -1610; -680 e -317) e os seis polimorfismos analisados neste estudo no promotor principal (Al-Shakfa, F. *et al.*, 2009).

Três polimorfismos foram identificados na região do promotor principal (nas seguintes *loci* 35, 308 e um polimorfismo ins/del nas posições 63/91), os quais foram genotipados em doentes com LLA e analisados para a sua associação com a eficácia do tratamento. Uma diferença na frequência foi observada apenas no locus 308 ($P=0,009$). Os indivíduos portadores do alelo 308A (genótipos 308GA e 308AA) apresentaram uma menor EFS comparativamente com os portadores do genótipo 308GG ($P=0,02$).

Uma vez que no estudo anterior o haplótipo *1 foi associado significativamente à falta de eficácia do tratamento, neste estudo a inclusão de polimorfismos do promotor principal levou a cinco subtipos do haplótipo *1, sendo que estes foram estudados relativamente a sua associação com EFS.

Os investigadores verificaram que indivíduos portadores do subtipo *1b distinguiram-se dos restantes pela sua associação com um baixo EFS ($P=0,01$). O alelo 308A estava presente em ambos os subtipos, *1a e *1b. A sua presença neste último, muito possivelmente explica a associação observada entre este haplótipo e o baixo EFS. Esta associação foi apenas observada em doentes de alto risco.

Quando se analisou esta associação incluindo outros fatores de prognóstico, o HR para este haplótipo foi de 3,0 (IC 95%: 1,5-6,0). Resultados semelhantes foram obtidos para DFS ($P=0,007$) e OS ($P=0,08$). Posteriormente, foi realizada uma análise em uma *cohort* de doentes de modo a validar aqueles resultados, confirmando-se esta associação ($P=0,02$ para EFS; $P=0,02$ para DFS e $P=0,001$ para OS).

Os polimorfismos no *DHFR* ou haplótipos que foram associados com a falta de eficácia do tratamento, não foram associados com a toxicidade relacionada com a quimioterapia. Dado a baixa EFS em indivíduos portadores do haplótipo *1b, Al-Shakfa *et al.*, avaliaram se os níveis de ARNm variavam entre os portadores dos diferentes subtipos do haplótipo *1. Elevados níveis de ARNm foram encontrados em portadores do haplótipo *1b ($P=0,005$) e não em portadores dos restantes haplótipos (**Figura 1.8.**) (Al-Shakfa, F. *et al.*, 2009).

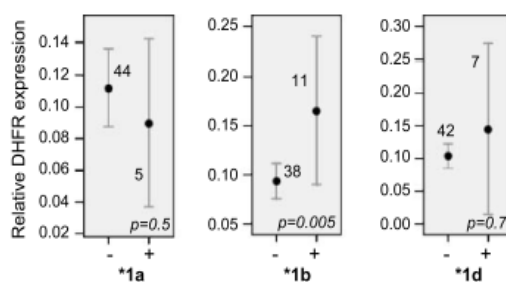


Figura 1.8. Subtipos do haplótipo *1 em relação aos níveis de ARNm. Os níveis médios de ARNm, com um intervalo de confiança de 95%, são dados para os indivíduos que são ou não portadores dos subtipos *1a, *1b e *1d do haplótipo *1. O número de portadores dos subtipos *1c e *1e foram insuficientes para a sua inclusão nesta análise (Al-Shakfa, F. *et al.*, 2009).

Vários estudos têm sugerido que o ARN não codificante poderá ter um papel na repressão do *DHFR*. Blume *et al.*, mostraram que o ARN não codificante pode ser capaz de sequestrar seletivamente fatores de transcrição impedindo deste modo a sua ligação ao principal promotor do gene e assim a montagem do complexo do início da transcrição (Blume, S.W. *et al.*, 2003) Posteriormente Martinov *et al.*, também observaram que a repressão é assegurada pela formação de um complexo estável entre o ARN não codificante e o promotor do gene (muito provavelmente por alteração da conformação do ARNm), pela interação direta do ARN não codificante com o fator de transcrição IIB e pela dissociação do complexo de pré iniciação do promotor principal. Assim, polimorfismos que afetem a função deste ARN não codificante, poderá resultar em um aumento dos níveis de ARNm (Martianov, I. *et al.*, 2007). De acordo com estes dados, e dado que o controlo da transcrição por este ARN envolve mudanças

conformacionais no ARNm, Al-Shakfa *et al.*, realizam também uma análise por *ARNfold*, usando a sequência dos cinco subtipos do haplótipo *1. Foi possível aos investigadores, observar mudanças na estrutura para o haplótipo *1b, todavia nenhuma diferença foi observada para outros subtipos, o que vai de encontro com os resultados anteriores. Por outro lado, polimorfismos no promotor principal do gene podem também diretamente alterar os locais de ligação dos fatores de transcrição, o que só por si afetará os níveis de ARNm (Al-Shakfa, F. *et al.*, 2009).

Os polimorfismos no gene *DFHR* foram também estudados por Ongaro *et al.*, em 122 doentes adultos com LLA tratados com MTX durante a fase de manutenção. Este estudo pretendeu avaliar a possível associação entre o genótipo e toxicidade (hematológica e não hematológica). Estes investigadores observaram que uma deleção de 19-pb no intrão 1 aumentou significativamente o risco de hepatotoxicidade (OR=4,57; IC 95%: 1,01-20,77). Sendo que esta toxicidade foi 2,07 e 4,57 maior em doentes o genótipo heterozigótico (WD) e homozigótico (DD), respetivamente quando comparado com os doentes com genótipo *wild-type* (WW). Quando comparados todos os portadores do alelo deletado (WD+DD), o risco de desenvolver toxicidade hepática aumentou cerca de 2,42 vezes ($P=0,052$). Estes investigadores analisaram também o efeito combinado deste polimorfismo no *DHFR* e *MTHFR* 677C> T, ambos associados com hepatotoxicidade. De facto, quando consideraram a presença de pelo menos um alelo polimórfico para ambos os polimorfismos, isto é CT/TT-WD/DD em relação ao duplo *wild-type* CC-WW, o risco de desenvolver toxicidade hepática excedeu o risco encontrado para cada polimorfismo separadamente (OR= 6,82; $P= 0,018$).

Muitas têm sido as evidências acerca do papel chave da DHFR na resposta de doentes com LLA ao MTX: níveis elevados da proteína têm sido encontrados em blastos da mesma forma, em linfoblastos de doentes com LLA das células T, de pior prognóstico, foram observados elevados níveis de DHFR relativamente a doentes com LLA das células B ou a doentes que respondem ao MTX.

Todavia, em comparação com outros genes envolvidos na via dos folatos como *MTHFR*, os polimorfismos do *DHFR* têm atraído uma menor atenção. Além disso, como os estudos recentes têm mostrado, o efeito de polimorfismos neste gene é provavelmente modulado pela ocorrência de outros polimorfismos em genes envolvidos na mesma via, tais como *TS*. Esta é uma possibilidade que precisa de ser explorada usando para isso conjuntos mais amplos de genes e *cohorts* maiores de doentes. Além

disso, dados acerca de outras patologias são necessários para elucidar totalmente o papel destes polimorfismos (Ongaro, A. *et al.* 2009).

Polimorfismos no gene *TS*

Um dos mecanismos de ação do MTX é a inibição da enzima timidilato sintase, indiretamente através da redução de cofatores essenciais à via dos folatos e diretamente através de MTX-poliglutamatos. A descoberta de diferentes polimorfismos no gene *TS*, correlacionados com alterações na expressão deste, sugere que estas variantes possam estar envolvidas na variabilidade interindividual da resposta aos fármacos que interferem com a atividade da proteína (Gervasini, G. *et al.*, 2009).

Uma sequência repetida em *tandem* (ou seja, uma ao lado da outra) foi identificada no “*enhancer*” da região 5’-UTR. Este polimorfismo contém múltiplas cópias de uma sequência de ADN de 28-bp, sendo os alelos de duas (2R) e três (3R) repetições os mais frequentes. Este “*variable number tandem repeat*” (VNTR) parece funcionar como um potenciador da transcrição, pelo que as consequências clínicas deste polimorfismo têm sido descritas por inúmeros estudos. Um aumento da expressão de *TS* associado com o alelo 3R foi observado *in vitro*. Estes resultados foram confirmados posteriormente na prática clínica, quando se observaram elevados níveis de ARNm e *TS* em doentes homozigóticos para o alelo 3R comparativamente aos indivíduos portadores de 2R. Pelo contrário, os investigadores observaram que estes últimos estariam mais propensos a desenvolver efeitos adversos. Em outro estudo, realizado em doentes com artrite reumatoide a receber MTX, os investigadores observaram que indivíduos 3R/3R necessitavam de doses maiores deste fármaco comparativamente a indivíduos homozigóticos para o alelo 2R.

Um segundo polimorfismo neste gene trata-se de uma substituição de um G por um C, na segunda unidade de repetição do alelo 3R (3RC e 3RG), sendo responsável pela alteração do local de ligação de um “*upstream stimulatory factor*”-USF, afetando desta forma a transcrição. Foi observado, *in vitro*, que o alelo 3RC exibe uma atividade transcripcional e tradução similares ao alelo 2R. Por último, observou-se uma deleção de 6-bp, na região 3’-UTR. Uma análise desta, *in vitro*, indicou a sua associação com a diminuição da estabilidade do ARNm (Krajinovic, M. *et al.*, 2005; Gervasini, G. *et al.*, 2009).

Krajinovic *et al.*, mostraram em estudos prévios, em uma população pediátrica com LLA, que indivíduos homozigóticos 3R/3R apresentavam uma menor EFS (OR = 4,1; IC 95%: 1,9-9,0; $P=0,001$), relativamente aos restantes genótipos e que este genótipo estava relacionado significativamente com a falta de eficácia do tratamento.

Em um estudo posterior envolvendo um maior número de doentes ($n= 259$) e um maior tempo de *follow-up* destes, o mesmo grupo de investigadores analisou o impacto destes três polimorfismos na EFS de doentes com LLA. Estes foram categorizados em dois grupos: aqueles que tiveram recaída ou morreram devido à doença, definidos como tendo um evento, e aqueles que não o apresentaram.

Krajinovic *et al.*, observaram que indivíduos homozigóticos para o alelo 3R foram encontrados com uma maior frequência no grupo de doentes que apresentaram um evento. Este genótipo apresentou, portanto, uma menor EFS em 5 anos após o tratamento comparativamente com os restantes ($P=0,006$). Como esperado, o risco de sofrer um evento foi superior nestes doentes do que nos portadores dos genótipos 2R/2R e 2R/3R (HR = 2,1; IC 95%: 1,2 – 3,7; $P = 0,006$). Estes investigadores não encontraram nenhuma associação com a OS.

Partindo do princípio que a substituição G por C poderá modular o efeito da variante 3R, estes investigadores analisaram a associação entre as três variantes (2R, 3RC e 3RG) e EFS no mesmo grupo de doentes. Todos os subgrupos 3R (3RC/3RC, 3RC/3RG e 3RG/3RG) estavam presentes em uma maior frequência no grupo de doentes que apresentaram um evento. Como esperado, os doentes com o genótipo 3RG/3RG apresentavam pior eficácia do tratamento, com uma EFS menor ($P= 0,003$). Todavia, os três subgrupos 3R/3R contribuíram para um maior risco de evento, não havendo uma diferença significativa entre eles. Assim, ao contrário do que seria de esperar a probabilidade de EFS em portadores de 3RC/3RG e 3RC/3RC também foi reduzida comparativamente com os portadores 2R e não diferiram significativamente. Portanto, o genótipo 3RC/3RC não apresentou a mesma taxa de resposta que 2R/2R, não seguindo o padrão que fora observado *in vitro*.

Krajinovic *et al.*, avaliaram ainda o efeito combinado dos polimorfismos VNTR e 6-bp+/. Um *linkage disequilibrium* foi observado ($P=0,002$) e quatro haplótipos possíveis (2R6 bp +, 2R6 bp -, 3R6 bp + e 3R6 bp -) foram descritos. Dado o efeito oposto de 3R e 6bp- nas concentrações de ARNm, seria expectável que esta deleção antagonizasse o efeito do alelo 3R ou acentuasse o do 2R. De facto, estes investigadores

observaram que haplótipo 2R6 bp- apresentou uma menor frequência no grupo em que se observou um evento ($P=0,04$). Pelo contrário, estes investigadores observaram que indivíduos homocigóticos 3R/3R com pelo menos um alelo 6bp+ (3R/3R 6 bp+/6 bp+ e 3R/3R 6 bp+/6 bp-) encontravam-se com uma maior frequência entre crianças que apresentaram um evento comparativamente com as que não apresentavam (36,6% vs 17,2%), o que está de acordo com os resultados de estudos anteriores. Curiosamente, frequências similares (3,8% vs 3,4%) foram encontradas entre os dois grupos nos doentes com o genótipo 3R/3R 6bp-/6bp-. Ainda uma redução de 57% da EFS foi observada em doentes 3R/3R com o alelo 6bp+ comparativamente com 63%, quando todos os portadores do genótipo 3R/3R foram considerados em conjunto.

Por último, os investigadores analisaram o efeito combinado dos três polimorfismos, o que resultou em seis haplótipos. Estes observaram uma menor frequência de 2R6bp- entre crianças que manifestaram um evento, conforme o esperado. O haplótipo 3RC6 bp+ apresentou uma maior frequência em crianças que registaram evento ($P= 0,04$). Não foi observada nenhuma associação significativa entre os polimorfismos VNTR e 6-bp+/-, analisados separadamente ou combinados, e a redução da dose de MTX (Krajinovic, M. *et al.*, 2005).

Polimorfismos no gene *TS* foram também estudados por Ongaro *et al.*, em 122 doentes adultos com LLA tratados com MTX durante a fase de manutenção. Este estudo pretendeu avaliar a possível associação entre o genótipo e toxicidade (hematológica e não hematológica) bem como o seu efeito na sobrevivência, em dois anos de *follow-up*. Curiosamente, estes investigadores observaram que anemia foi significativamente mais frequente em doentes com o genótipo 3R3R ($P = 0,003$) do que nos portadores 2R2R, com aqueles a revelar um risco 8,5 vezes superior. Quando comparados todos os portadores do alelo 3R (2R3R 3 R3R) com os doentes com o genótipo 2R2R, o risco aumentado foi estatisticamente significativo (OR= 4,50; $P = 0,025$) (Ongaro, A. *et al.* 2009).

Costea *et al.*, observaram que um SNP no gene *CCND1*, cujo produto é responsável por modular os níveis de TS, poderá ter um impacto no resultado do tratamento com MTX. Este polimorfismo é uma transição silenciosa 870A> G originando um *splicing* alternativo do ARNm, o que resulta em uma proteína CCND1 com um tempo de meia-vida maior. A mudança na regulação mediada por CCND1 pode levar a um aumento da expressão de *TS* e conseqüentemente à diminuição da sensibilidade das células ao MTX.

Assim, estes investigadores observaram que doentes com LLA que eram homozigóticos para a variante 870A do *CCND1* apresentavam uma menor EFS ($P = 0,006$) em relação aos portadores da variante 870G. Este impacto foi ainda mais evidente em indivíduos que são igualmente homozigóticos para o genótipo *TS* 3R/3R ($P < 0,00005$). Esta combinação terá, portanto, um maior impacto no resultado da terapêutica do que apenas o genótipo 3R/3R (Costea, I. *et al.*, 2003).

Existem, no entanto, alguns exemplos de resultados negativos, tais como os obtidos por Kishi *et al.* e Pakakasama *et al.*, os quais não confirmaram uma associação entre polimorfismos no *TS* e a toxicidade relacionada com MTX (Kishi, S. *et al.*; 2007 Pakakasama, S. *et al.*, 2007).

Outros polimorfismos neste gene ou em outros genes da via dos folatos poderão explicar esta discrepância. Mais estudos são necessários para a compreensão do efeito conjunto dos polimorfismos no ARNm *TS* e na proteína assim como o envolvimento de mecanismo de controlo na regulação da expressão da *TS* (Gervasini, G. *et al.*, 2009).

1.1.2. Polimorfismos nos genes envolvidos no transporte de metotrexato.

Polimorfismos no gene *SLC19A1* (*RFC1*)

A entrada de folatos para o interior da célula é mediada por uma proteína transportadora de folatos reduzidos (*RFC1*), codificada pelo gene *SLC19A1*. O *RFC1* transporta também ativamente para dentro da célula agentes quimioterapêuticos, como o MTX. O *SLC19A1*, presente no cromossoma 21, é altamente polimórfico, pelo que o impacto clínico de variantes neste gene tem sido vastamente estudado.

A variante mais estudada neste gene consiste em um SNP 80 G > A, um polimorfismo não sinónimo no éxon 2, que resulta em uma substituição na proteína de uma histidina por uma arginina. A variante G, tem sido correlacionada com menores níveis de folatos no plasma e níveis mais elevados de homocisteína em pessoas saudáveis. Dado que o MTX afecta a homeostasia da homocisteína e folatos, é possível que o polimorfismo *SLC19A1* 80 G > A possa modular a eficácia do tratamento com MTX. Por outro lado, a alteração da entrada de MTX para o interior da célula poderá

afetar os níveis plasmáticos de fármaco e assim dificultar a eficácia e promover a toxicidade (Gervasini, G. *et al.*, 2009; Gregers, J. *et al.*, 2010).

Muitos estudos neste polimorfismo têm, contudo, apresentado alguns resultados contraditórios. Enquanto Whetstine *et al.* não encontraram quaisquer diferenças significativas entre variantes neste gene e a entrada de MTX em células transfectadas, Baslund *et al.* demonstraram um aumento do influxo de MTX em indivíduos saudáveis com o genótipo *SLC19A1* 80AA. Dada a localização do gene *SLC19A1*, parece existir uma ligação entre o número de cópias do cromossoma 21 e o risco de toxicidade após o tratamento com MTX. Os doentes com síndrome de Down apresentam uma maior toxicidade relacionada com o tratamento, por outro lado doentes com LLA pré-B hiperdiplóide com três ou quatro cópias do cromossoma apresentaram maiores níveis intracelulares de MTX bem como uma taxa de recaída inferior comparativamente a doentes não hiperdiplóides, indicando que a elevada expressão deste gene terá um papel fulcral na acumulação de MTX no interior da célula (Whetstine, J.R. *et al.*, 2001; Baslund, B. *et al.*, 2008; Gregers, J. *et al.*, 2010).

Um estudo retrospectivo que pretendia avaliar a associação entre este polimorfismo e os níveis plasmáticos de MTX, em 204 crianças com LLA, foi desenvolvido por Laverdière *et al.* Estes doentes foram tratados com altas doses de MTX (4 g/m^2) durante a fase de indução (doses IT de 6-12 mg foram administradas também, de acordo com a idade) e uma dose semanal de 30 mg/m^2 durante a fase de manutenção. As crianças que apresentaram recaída ou morte decorrente da doença foram definidas como tendo tido um evento. Os resultados obtidos por este grupo de investigadores revelaram que os portadores do alelo 80A apresentavam, além de um risco de evento maior comparativamente aos doentes com genótipo 80GG (OR= 3,0; IC 95%: 1,1-8,1; $P=0,03$), um pior prognóstico ($P=0,04$). A taxa de risco para doentes portadores do alelo variante 80A manteve o seu significado estatístico na presença de outros fatores de prognóstico. Quando estes investigadores analisaram a influência deste polimorfismo nos níveis plasmáticos de MTX, verificaram que doentes com o genótipo 80AA apresentavam maiores níveis plasmáticos de MTX comparativamente a outros genótipos ($P=0,004$). Contudo estes investigadores não encontraram qualquer associação entre os níveis plasmáticos de MTX e o prognóstico da doença ($P=0,6$).

Apesar destes resultados os investigadores sugerem que este polimorfismo poderá ajudar a prever o prognóstico da doença. Segundo estes, é possível que a alteração de

um aminoácido no primeiro domínio transmembranar (TMD1) do RFC1 causado por este polimorfismo, possa levar a uma alteração no transporte, tal como foi observado *in vitro* em linhas celulares resistentes ao MTX. Os portadores do alelo 80A poderão ter menor afinidade para o MTX (e presumivelmente, níveis plasmáticos de MTX mais elevados como foi observado neste estudo) e uma maior afinidade para outros substratos folatos (como observado em outros estudos) (Laverdière, C. *et al.*, 2002).

Em um estudo, conduzido por Kishi *et al.*, os investigadores pretenderam avaliar a toxicidade (GI, hepática, neurológica, assim como infeções) associada ao tratamento da LLA durante três fases de tratamento, assim como analisar a sua relação com 16 polimorfismos em genes envolvidos na farmacodinâmica destes fármacos. Para tal, o estudo envolveu 240 doentes com LLA, os quais foram prospectivamente distribuídos por dois grupos de tratamento com base no risco de recaída (baixo risco ou risco elevado / intermediário).

Estes investigadores observaram que infeções associadas a *SLC19A1* 80AA ou 80AG foram significativas durante a fase de indução (OR= 3,3; IC 95%; $P= 0,024$) enquanto que nas fases de consolidação e manutenção doentes com o alelo 80A exibiram um aumento substancial de toxicidade GI (OR= 10,4; IC 95%; $P= 0,025$ e OR= 2,0; IC 95%; $P= 0,033$, respetivamente). Este polimorfismo revelou neste estudo um interesse particular na medida em que foi relacionado com toxicidade em mais do que uma fase do tratamento bem como esteve relacionado com mais de um tipo de toxicidade. Embora nos estudos anteriores se tenha verificado uma associação entre o genótipo 80AA e maiores concentrações plasmáticas de MTX comparativamente aos restantes genótipos, os resultados obtidos por Kishi *et al.*, não estão de acordo com aqueles resultados (Kishi, S. *et al.*, 2007).

Em um estudo mais recente desenvolvido por Gregers *et al.*, onde se pretendia avaliar a influência desta variante no risco de recaída e na toxicidade em 500 crianças com LLA sujeitas a altas doses de MTX, pelo contrário os investigadores observaram que o risco de desenvolver um evento foi inferior (50%) em doentes homocigóticos para o alelo 80A do que naqueles com o genótipo 80AG ou 80GG (HR= 0,5; IC 95%: 0.25-1.00; $P = 0,046$).

Estes investigadores estudaram também a interação entre variantes neste gene e o número de cópias do cromossoma 21. Para tal, os doentes foram divididos em dois grupos de acordo com o número de cópias: um com número de cópias normal e o outro

com um maior número. Entre os doentes com 2 cópias deste cromossoma, os portadores de *SLC19A1* 80AA apresentaram menos 64% de risco de apresentar recaída comparativamente com os doentes com as variantes 80GA e 80GG (HR=0,36; IC 95%: 0.13-0.99; $P=0,048$). Os doentes com mais de duas cópias não apresentaram quaisquer diferenças significativas no risco de recaída entre os vários genótipos ($P=0,80$).

Enquanto estes resultados estão em conformidade com o estudo conduzido por Baslund *et al.*, em que a variante 80A parece tornar o transporte de MTX mais eficiente, os resultados clínicos observados por Gregers *et al.*, estão no entanto em contraste com o estudo desenvolvido por Laverdière *et al.* Segundo os autores as razões para estas discrepâncias de resultados poderão estar relacionadas com as diferenças entre os protocolos de quimioterapia utilizados nos dois estudos. Outro factor que também poderá ter contribuído para os diferentes resultados foi o tamanho da amostra de doentes (duas vezes superior no estudo desenvolvido por Gregers *et al.*) bem como o tempo de *follow-up*, o que segundo Gregers *et al.* é importante uma vez que as recidivas em doentes com LLA de baixo risco tendem a ser tardias.

Em uma *cohort* de 182 crianças a receberem altas doses de MTX, estes investigadores observaram que doentes de baixo risco apresentavam um maior grau de toxicidade ao nível da medula óssea (menores níveis de plaquetas ($P= 0,004/0,002$) e hemoglobina ($P=0,004/0,001$)) em doentes com o genótipo 80AA comparado com os genótipos GA/GG. No entanto, os níveis de alanina aminotransferase foram significativamente mais elevados em doentes com o genótipo 80GG comparativamente com os portadores dos genótipos 80GA e 80AA ($P= 0,030/0,049$), revelando assim um maior grau de toxicidade hepática associada ao alelo 80G (Gregers, J. *et al.*, 2010).

Pakakasama *et al.*, realizaram um estudo em que pretendiam avaliar a influência de polimorfismos na via dos folatos na toxicidade observada em crianças com LLA após a administração de altas doses de MTX. O estudo foi conduzido em 76 doentes (a maioria destes diagnosticados com LLA das células B) os quais receberam dois ciclos de MTX ($1,5\text{g}/\text{m}^2$, IV-24h) e 6-MP oral durante 14 dias ($60\text{ mg}/\text{m}^2$ /dia), durante a fase de consolidação. Os resultados obtidos por estes investigadores não apoiaram aqueles observados nos estudos descritos anteriormente. Não foram observadas diferenças entre os doentes portadores dos alelos 80G e 80A. Este polimorfismo não alterou o risco de mucosite oral, mielosupressão ou neutropenia febril. Segundo estes investigadores, embora o MTX entre na célula através do RFC1, concentrações extracelulares mais

elevadas podem entrar na célula por difusão passiva sem o recurso ao transportador. Portanto, alterações funcionais neste poderão não alterar o efeito farmacológico ou toxicidade de elevadas doses de MTX (Pakakasama, S. *et al.*, 2007).

Também Ongaro *et al.*, não encontraram qualquer associação significativa entre este polimorfismo e toxicidade associada ao MTX. Estudos *in vitro* em células de LMA- M6 não mostraram quaisquer diferenças no transporte de MTX entre os alelos 80G e 80A) (Ongaro, A. *et al.* 2009).

Embora alguns destes estudos revelem um papel potencial deste polimorfismo na variabilidade farmacocinética e toxicidade ao MTX, há que ter em consideração outros factores que possam influenciar associações genótipo/fenótipo como as funções renal e hepática, outros polimorfismos nos genes da via dos folatos, o regime de leucovorina administrado assim como efeitos indiretos do transportador sob a via dos folatos.

Estudos adicionais são necessários para explicar o mecanismo subjacente na relação entre polimorfismos no *SLC19A1*, a eficácia do tratamento e o prognóstico da doença. Segundo Gregers *et al.* seria importante a realização de um estudo prospetivo para a avaliação dos níveis intracelulares de MTX e da capacidade de ligação dos substratos ao transportador em doentes com e sem o alelo variante 80A. Da mesma forma que seria importante avaliar o impacto relativo deste polimorfismo no tratamento da LLA em relação a outras variantes relevantes à resposta ao MTX (Gervasini, G. *et al.*, 2009; Gregers, J. *et al.*, 2010).

Polimorfismos no gene *SLCO1B1*

O gene *SLCO1B1*, localizado no cromossoma 12 e responsável por codificar para um transportador de aniões orgânicos (OATP1B1), tem também sido alvo de estudos farmacogenéticos. Este transportador, localizado na membrana sinusoidal dos hepatócitos, é responsável pela entrada de substratos a partir do sangue sinusoidal, resultando na sua excreção a partir deste (excreção via biliar). A presença deste transportador também foi observada na membrana dos enterócitos (Kalliokoski, A. *et al.*, 2009; Gervasini, G. *et al.*, 2009)

Um estudo recente, conduzido por Treviño *et al.*, pretendeu analisar em todo o genoma cerca de 500.568 SNPs de modo a identificar de que forma estes afetariam a

biodisponibilidade plasmática de MTX. Assim, o estudo envolveu 434 crianças com LLA a receber elevadas concentrações de MTX (de 2 a 5g/m²). Os SNPs foram também validados em uma *cohort* independente de 206 doentes neste estudo.

Os resultados obtidos por estes investigadores permitiram verificar que a variação genética mais forte associada com a farmacocinética e farmacodinâmica do MTX residiu no gene *SLCO1B1*. Os diferentes genótipos no *SLCO1B1* foram associados com a variabilidade na depuração plasmática de MTX em três regimes de tratamento diferentes, depois do ajuste de acordo com a idade, sexo, etnia, função renal e regime de tratamento. Segundo Treviño *et al.*, as associações mais significativas foram obtidas para dois polimorfismos existentes no intrão 14, rs11045879 ($P=1,7\times 10^{-10}$) e rs4149081 ($P=1,7\times 10^{-9}$), os quais estavam em *linkage disequilibrium* um com o outro ($r^2=1$) e com um polimorfismo funcional, 521T> C (rs4149056 $r^2> 0,84$). O alelo 521C foi relacionado, neste estudo, com uma menor depuração plasmática de MTX (maior exposição sistêmica ao MTX), como pode ser observado na **figura 1.9**. Estes resultados são consistentes com estudos anteriores, que observaram uma maior concentração plasmática de substratos do *SLCO1B1* em indivíduos portadores do alelo 521C do que em indivíduos homocigóticos para 521T.

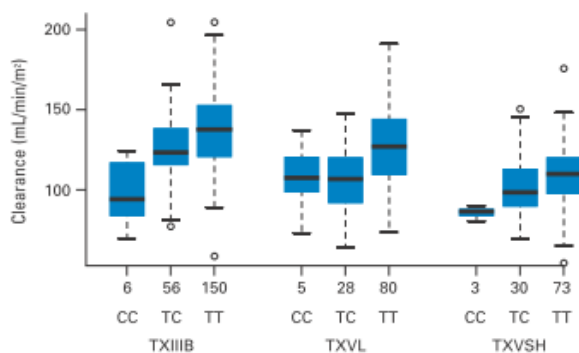


Figura 1.9. Diferentes genótipos para o polimorfismo *SLCO1B1* rs11045879 associados com a depuração plasmática de metotrexato em doentes sujeitos a três regimes de quimioterapia diferentes. Os números abaixo de cada gráfico de caixa indicam o tamanho da amostra para cada genótipo (Treviño L. *et al.*, 2009).

No entanto, segundo estes autores, a maioria dos polimorfismos no *SLCO1B1* associados com a depuração plasmática do MTX encontram-se localizados em regiões não codificantes, sugerindo que múltiplos mecanismos poderão afetar a função do gene, nomeadamente ao nível da transcrição e de processos pós-transcrição (*splicing* e

tradução do ARNm). Além disto, SNPs em regiões não codificantes poderão estar em *linkage* com SNPs em regiões codificantes, pelo que nos sugerem que a função de *SLCO1B1* pode ser afetada por vários polimorfismos diferentes.

No mesmo estudo, os investigadores pretenderam também associar polimorfismos no gene *SLCO1B1* com a toxicidade GI, e verificaram que mucosite e infeções foram os efeitos adversos mais comuns observados durante as fases de consolidação e manutenção em um dos regimes de tratamento.

O alelo rs11045879T (OR = 16,4; IC 95 %: 8,7 -26,7; $P= 0,004$) e rs4149081G (OR=15.3; 95% CI, 7,9 – 24,6; $P = 0.03$) foram cada um deles associado com toxicidade GI durante a fase de consolidação, como pode ser observado na **figura 1.10**. Os dois polimorfismos foram também associados com a toxicidade GI na fase de manutenção, no entanto não foi observado em nenhum dos ensaios qualquer associação entre polimorfismos neste gene e infeções.

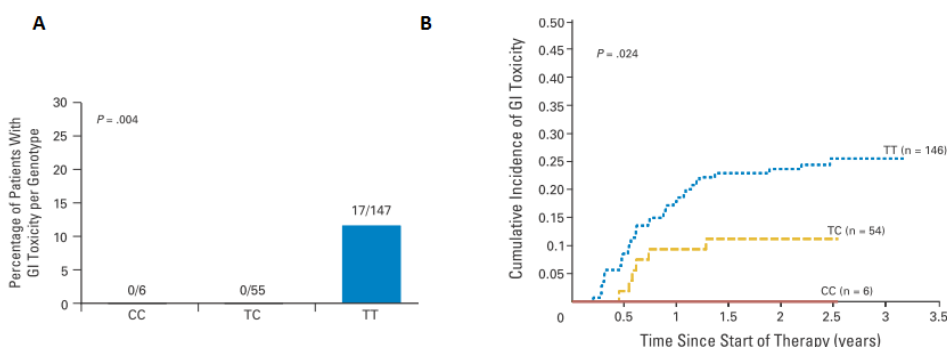


Figura 1.10. Associação do polimorfismo rs11045879 no gene *SLCO1B1* 79 com toxicidade GI. A- Gráfico da percentagem de doente que manifestaram toxicidade GI durante as duas semanas de quimioterapia de consolidação em função dos diferentes genótipos para o polimorfismo rs11045879 no gene *SLCO1B1* 79. Os números acima de cada barra representam o número de doentes que apresentaram toxicidade *versus* aqueles que não apresentaram, para cada genótipo específico. B- Curvas da incidência cumulativa da toxicidade em função do tempo de tratamento para os diferentes genótipos diferentes genótipos do polimorfismo *SLCO1B1* 79 rs11045879 (Treviño L. *et al.*, 2009).

Os resultados mostraram que os alelos que foram associados a uma menor concentração plasmática de MTX foram também associados com o aumento da toxicidade GI. Assim, este achado é consistente com o descrito anteriormente, que maiores concentrações de MTX no trato GI, pela entrada do fármaco nos enterócitos, estão relacionadas com toxicidade GI. Segundos os investigadores, o facto de

polimorfismos no *SLCO1B1* não terem sido associados com outro tipo de toxicidade, nomeadamente infeções, demonstra que as concentrações GI de MTX são determinantes principalmente para a sua toxicidade GI, e apresentam uma menor importância para outro tipo de toxicidade. Uma vez que a 6-MP foi também administrada durante a fase de consolidação, a toxicidade (particularmente infeções) pode ser devida em parte à 6-MP, uma vez que a toxicidade GI está mais relacionada com MTX do que com a administração de tiopurinas (Treviño L. *et al.*, 2009). Mais estudos acerca do papel deste gene devem ser realizados no futuro, de modo a estabelecer de que forma *SLCO1B1* afecta a ocorrência de reações adversas decorrentes da administração de MTX.

A figura seguinte (**figura 1.11**) mostra uma visão geral do mecanismo de ação do MTX na via dos folatos, sendo mostrados os principais genes envolvidos assim como os principais polimorfismos que têm sido relacionados com a ocorrência de toxicidade relacionada com a administração deste fármaco.

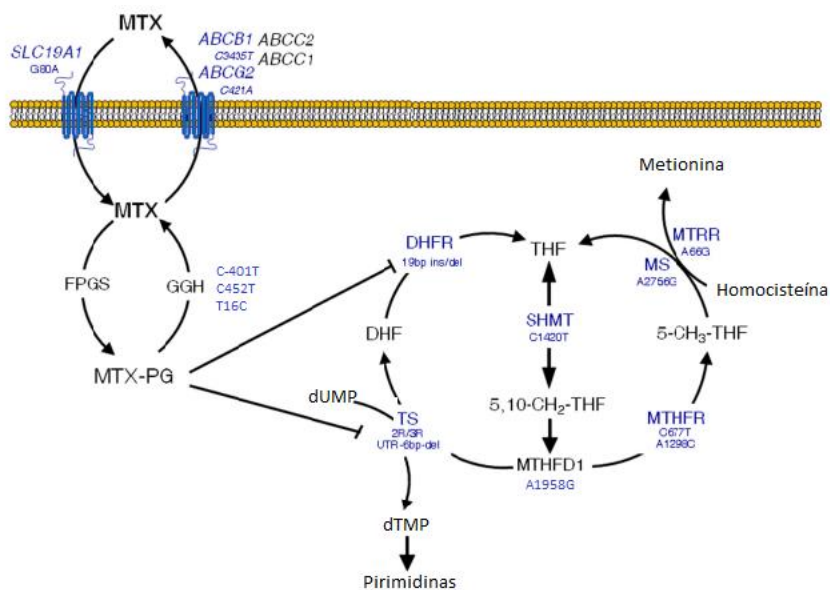


Figura 1.11. Mecanismo de ação do MTX na via metabólica dos folatos. Os polimorfismos mais relevantes clinicamente são mostrados bem como os principais genes envolvidos (Adaptado de Gervasini, G. *et al.*, 2012).

1.2. A Farmacogenómica na terapêutica com tiopurinas

1.2.1. Polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo de tiopurinas

Polimorfismos no gene *TPMT*

Atualmente, todos os protocolos de quimioterapia para a LLA incluem tiopurinas como a 6-MP, a qual é administrada diariamente durante a fase de manutenção da terapêutica, embora em alguns protocolos de quimioterapia, possa ser utilizada em outras fases. Como foi referido anteriormente neste trabalho, a enzima TPMT exerce um papel fulcral na inativação da 6-MP ou dos seus metabolitos. A atividade polimórfica do gene *TPMT* foi inicialmente observada em doadores de sangue, e rapidamente foram identificados os polimorfismos responsáveis pela variabilidade interindividual observada na resposta a tiopurinas. Estudos realizados envolvendo famílias permitiu demonstrar que o genótipo da TPMT é hereditário, tratando-se de um caso de codominância autossomal (Wang, L. *et al.*, 2010; Donnan, J. *et al.*, 2011).

Os alelos *TPMT**2, *3A, *3B e *3C têm sido intensamente estudados no que diz respeito às suas implicações clínicas e mecanismos moleculares. Foi demonstrado que a variante *TPMT**2, um SNP 238G> C (Ala80Pro), é responsável por uma redução de cem vezes na atividade enzimática da proteína comparativamente à sua versão normal, apesar de os níveis de expressão de ARNm serem semelhantes no alelo *wild-type* e no alelo variante. Tai *et al.* demonstraram que o aumento da degradação de aloenzimas codificadas pelos alelos *TPMT**2 e *3A representa o mecanismo para a diminuição dos níveis de proteína e a atividade catalítica da TPMT (Tai H. *et al.*, 1997). Estudos posteriores realizados por Wang *et al.*, demonstraram que a rápida degradação de *TPMT**3A envolve *chaperones* moleculares, como as *heat shock proteins* hsp70 e hsp90 e, que *TPMT**3A pode também formar agressomas intracelulares, contribuindo ambos os processos para os baixos níveis de proteína e de atividade enzimática observados nos tecidos de indivíduos com estes alelos (Wang, L. *et al.*, 2010).

Cerca de 90% dos indivíduos que são portadores de dois alelos *wild-type* apresentam uma elevada atividade da TPMT, 10% herda um alelo *wild-type* e um alelo variante, apresentando estes indivíduos uma atividade enzimática intermédia. Apenas

cerca de 0,3%, portadores de dois alelos variantes, apresentam baixa ou nenhuma atividade da TPMT (Cheok, M. *et al.*, 2006b). Até há pouco tempo, não existia nenhuma explicação molecular para o fenótipo de atividade ultrarápida, no entanto este, presente em 1 a 2% dos caucasianos, parece dever-se a uma repetição de três nucleótidos (GCC) bastante polimórfica presente no promotor do gene (Roberts, R. *et al.*, 2008).

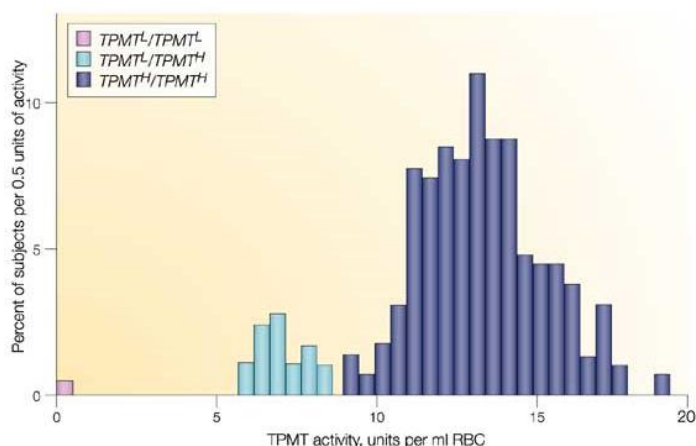


Figura 1.12. Histograma da distribuição da frequência da atividade da enzima TPMT em eritrócitos. Presumíveis genótipos no *locus* de *TPMT* são mostrados. $TPMT^L$ e $TPMT^H$ são designações para os alelos que resultam em baixa e elevada atividade da enzima, respectivamente (Adaptado de Weinshilboum, R. *et al.*, 2004).

A ligação entre polimorfismos genéticos no *TPMT* e a ocorrência de toxicidade relacionada com a administração de tiopurinas é um dos casos mais bem estudados na farmacogenética do cancro. De facto, muitos estudos acerca da influência destes polimorfismos na resposta à terapêutica têm sido realizados nas últimas décadas, como se poderá observar pelos resultados na tabela em anexo. Diversos estudos têm demonstrado que, em doentes com LLA tratados com 6-MP, os níveis de atividade da TPMT em eritrócitos estão inversamente correlacionados com os níveis de 6-TGNs nestas células. Uma diminuição na atividade enzimática permite que mais fármaco fique disponível para a formação de 6-TGNs resultando na sua acumulação e consequentemente na ocorrência de toxicidade. Quando estes doentes são tratados com doses *standard* de tiopurinas, aqueles com baixa atividade de TPMT poderão acumular excessivas concentrações de metabolitos tóxicos nas células sanguíneas desenvolvendo severos efeitos adversos como mielotoxicidade (**Figura 1.13.**) (Wang, L. *et al.*, 2010).

Os doentes com alelos não funcionais poderão receber menores doses de tiopurinas: 35% a 50% e 10% das doses *standard*, para doentes que são, respetivamente, homozigóticos e heterozigóticos para os alelos variantes (Cheok, M, *et al.*, 2006b; Wang, L. *et al.*, 2006).

Por outro lado, doentes com LLA com concentrações de 6-TGNs baixas e portanto uma atividade da TPMT elevada apresentam uma taxa de recaída da doença superior. Assim, polimorfismos genéticos neste gene são um fator significativo, responsável por graves reações adversas em doentes tratados com tiopurinas, e poderão também contribuir para a variação individual na eficácia terapêutica (Stanulla, M. *et al.*, 2005).

O gene *TPMT* tornou-se um dos poucos exemplos na área da farmacogenética a ser “traduzido” para a prática clínica (Wang, L. *et al.*, 2010).

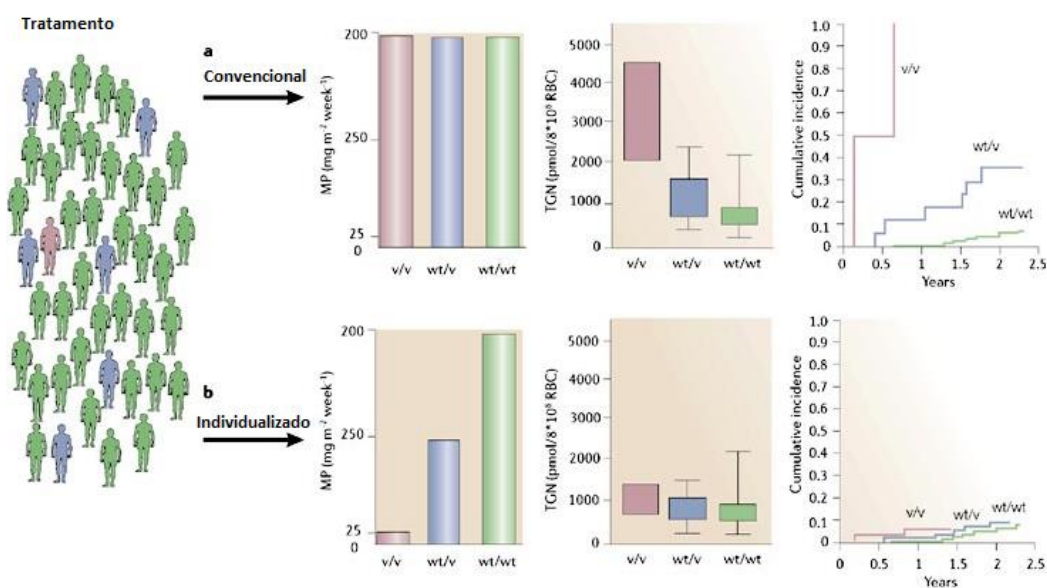


Figura 1.13. Quando a 6-MP é administrada em uma *cohort* de doentes, doses desta poderão ser administradas uniformemente em todos os doentes ou individualizadas de acordo com o genótipo de *TPMT*. Quando doses convencionais de 6-MP são administradas (a), doentes que são homozigóticos para o alelo variante (v/v) apresentam uma maior exposição sistêmica ao fármaco do que heterozigóticos (wt/v) e homozigóticos para o alelo wild-type (wt/wt), mostrando concentrações de 6-TGN duas vezes mais elevadas. Estas concentrações mais elevadas em doentes homozigóticos para a variante (v/v) traduzem-se em uma maior incidência cumulativa de toxicidade hematopoiética. Quando as doses são administradas de acordo com o de genótipo de *TPMT* (b), em um regime terapêutico individualizado, as concentrações de 6-TGN são semelhantes para todos os genótipos, e todos os três fenótipos da *TPMT* podem ser tratados sem toxicidade aguda (Adaptado de Cheok, M. *et al.*, 2006b).

Aplicação clínica da farmacogenómica

Atualmente, apesar de bem estabelecida a relação entre a variabilidade genética neste gene e a resposta a tiopurinas, as práticas terapêuticas comuns na maioria das instituições que têm a responsabilidade de diagnosticar e tratar esta doença, não se alteraram significativamente.

Em Portugal, nenhuma instituição realiza regularmente a genotipagem/fenotipagem antes da administração de fármacos tiopurínicos. Quando olhámos para o cenário dentro da União Europeia, verificamos que na Irlanda, em contraste, todas as crianças com leucemia são rotineiramente testadas relativamente ao seu genótipo para *TPMT*, antes do início do tratamento. Isto é útil tanto para identificar os doentes com deficiência em *TPMT* como para a individualização da dose. Neste caso, a quimioterapia é centralizada em certas instituições e portanto estes testes genéticos ocorrem apenas em laboratórios dentro destas (Zika, E. *et al.*, 2006).

Atualmente, existem dois métodos para detetar a atividade da *TPMT*. O teste enzimático que envolve a análise bioquímica da atividade da enzima no sangue e permite ser aplicado rapidamente em uma grande população e, mais recentemente, um teste de ADN, que permite a genotipagem de polimorfismos neste gene. Este último tem como vantagem ser um método mais rápido, sensível e específico comparativamente ao método anterior. A análise bioquímica da atividade da enzima no sangue poderá ser afetada por factores exógenos, tais como transfusões sanguíneas recentes e interações com diversos medicamentos e álcool, o que naturalmente poderá afetar os resultados (Zika, E. *et al.*, 2006; Donnan, J. *et al.*, 2011).

Em países como a Alemanha e a Holanda, por exemplo, os testes são aplicados em casos específicos, após a ocorrência de efeitos adversos. Na Holanda existe um único laboratório que oferece testes para a determinação do genótipo do *TPMT*. Neste país todas as crianças com LLA são tratadas de acordo com o protocolo padrão, sendo que no decorrer do tratamento são realizados hemogramas. Como base nisto, a dose de tiopurinas é monitorizada e reduzida ou aumentada, se necessário. Embora este protocolo padrão não inclua a realização do teste genético para o *TPMT* antes do início do tratamento, ele recomenda aos médicos a análise da deficiência na enzima, em casos de hepatotoxicidade grave ou persistente (Zika, E. *et al.*, 2006).

A falta de educação e formação parece ser uma das barreiras à implementação da farmacogenética na prática clínica. Muitos médicos não estão completamente familiarizados com a biologia molecular ou genética, o que poderá ser limitante, uma vez que a farmacogenética não requer apenas um teste de laboratório mas também uma interpretação do genótipo/fenótipo (Evans, W. *et al.*, 2004). Por outro lado, devemos ter em consideração que várias gerações de médicos foram educadas para começar os tratamentos com uma “dose média”, sendo compreensível a sua relutância em confiar em testes genéticos. Outra das barreiras a aplicação do teste para a TPMT será certamente a relação custo-efetividade. A aplicação do teste genético para TPMT antes da administração de 6-MP parece ser, do ponto de vista comercial, pouco atraente, como mostra um estudo recente conduzido por Donnan *et al.*, em crianças com LLA (Donnan, J. *et al.*, 2011).

Um maior investimento na investigação no campo da farmacogenética será necessário, no entanto uma das formas pela qual a farmacogenética poderia ser transposta para a prática clínica seria pelo estabelecimento de diretrizes por agências reguladoras, identificando os genes específicos nos quais uma genotipagem preditiva deveria ser levada em consideração antes do início do tratamento (Ingelman- Sundberg, M. *et al.*, 2005).

Polimorfismos em outros genes do metabolismo de tiopurinas

Para além de polimorfismos na enzima TPMT, outras alterações genéticas em genes que codificam para enzimas envolvidas no metabolismo e transporte de tiopurinas poderão também contribuir para a toxicidade induzida por este grupo de fármacos. Este é o caso da enzima ITPA, responsável por catalisar um dos passos intermediários do metabolismo da 6-MP (Gervasini, G. *et al.*, 2010).

Dois polimorfismos associados com a deficiência da atividade da proteína foram identificados no gene *ITPA*, localizado no cromossoma 20, com uma frequência de cerca de 10% em Caucasianos. Um destes polimorfismos corresponde a uma mutação IVS2+21A> C no intrão 2. O impacto clínico deste parece estar limitado em doentes tratados com doses *standard* de tiopurinas (Beaumais, T. *et al.*, 2012). Este polimorfismo parece ser responsável por uma menor eficiência no *splicing* do ARNm,

representando deste modo a base molecular para a menor atividade da enzima. Indivíduos homozigóticos para IVS2+21A> C apresentam cerca de 60% da atividade da ITPA (Heller, T. *et al.*, 2004).

O segundo polimorfismo consiste em um SNP não sinónimo correspondente à transição 94C> A no exão 2 (Pro32Thr). O impacto deste polimorfismo na resposta a tiopurinas foi inicialmente controverso, provavelmente porque polimorfismos no *ITPA* e no *TPMT* eram considerados independentes. De facto, tanto *ITPA* 94C> A como polimorfismos no *TPMT* parecem participar na variabilidade das concentrações do metabolito 6-MMPN (Beumais, T. *et al.*, 2012).

Stocco *et al.*, conduziram um estudo que pretendia avaliar a influência de polimorfismos nos genes *ITPA* (94C> A) e *TPMT* (*TPMT*2*, *TPMT*3A* e *TPMT*3C*) no metabolismo e toxicidade da 6-MP, em doentes com LLA, cujas doses deste fármaco foram ajustadas de acordo com o genótipo de cada doente para o gene *TPMT*. Assim, este estudo contou com a participação de duas *cohorts*, uma com 247 doentes que receberam uma dose *standard* de 75mg/m² de 6-MP, a qual foi ajustada de acordo com o genótipo de cada doente relativamente ao gene *TPMT* (protocolo Total 13B), e a outra de 188 doentes que, pelo contrário, recebeu 75mg/m² de 6-MP, não tendo a sua dose ajustada (protocolo Total 12).

Embora o impacto clínico de polimorfismos no gene *TPMT* seja já bem conhecido, este consiste no primeiro estudo descrito na literatura a estudar o impacto de polimorfismos no gene *ITPA* no contexto de uma administração de 6-MP individualizada com base no genótipo de *TPMT*. Os doentes do protocolo Total 13B foram avaliados relativamente ao efeito do genótipo *ITPA/TPMT* nas concentrações dos metabolitos 6-TGN e 6-MMPN tanto nas células da medula óssea como em eritrócitos, pelo que estes investigadores observaram concentrações significativamente mais elevadas de 6-MMPN nos doentes portadores do alelo variante no *ITPA*, tanto em células leucémicas como em eritrócitos (**Tabela 1.2.**). Pelo contrário, polimorfismos no *ITPA* não foram associados com diferenças nas concentrações de 6-TGN tanto em células leucémicas como em eritrócitos (**Tabela 1.2.**). Ainda que o papel de *ITPA* no metabolismo da 6-MP seja conhecido, o mecanismo pelo qual variantes neste gene influenciam a acumulação de tionucleótidos metilados ainda não se encontra completamente esclarecido. De facto, tanto o polimorfismo *ITPA* 94C> A como os SNPs *TPMT*2*, *TPMT*3A* e *TPMT*3C* participam na variabilidade das concentrações

de 6-MMPN: doentes com o alelo variante para *TPMT* e o genótipo *wild-type* para *ITPA* apresentam menores concentrações de 6-MMPN, os doentes com o genótipo *wild-type* para os dois genes revelam concentrações intermédias enquanto que doentes com genótipo *wild-type* para *TPMT* e alelo variante para *ITPA* apresentam maiores concentrações deste metabolito.

Dado que os níveis de 6-MMPN foram fortemente associados com hepatotoxicidade, é importante que *ITPA* 94C> A seja considerado quando se pretende analisar a resposta à terapêutica com 6-MP.

O nível de síntese de purinas pode ser influenciado por variantes nestes genes, no entanto, neste estudo os investigadores não observaram qualquer relação entre a taxa de síntese de purinas em células leucémicas e o genótipo de *ITPA/TPMT*.

Tabela 1.2. Efeito do genótipo *TPMT/ITPA* nas concentrações dos metabolitos TGN e MMPN em células da medula óssea em doentes tratados com uma dose única de 6-MP IV e em eritrócitos durante a fase de manutenção (Stocco, G. *et al.*, 2009).

	Protocolo Total 13B (n =247)			
	<i>TPMT</i>		<i>ITPA</i>	
	Alelo variante vs. Alelo <i>wild-type</i>		Alelo variante vs. Alelo <i>wild-type</i>	
	Metabolitos 6-TGN	Metabolitos 6-MMPN	Metabolitos 6-TGN	Metabolitos 6-MMPN
Células leucémicas da medula óssea	Não foi observada associação significativa entre as concentrações de 6-TGN e o genótipo de <i>TPMT</i>	As concentrações de 6-MMPN foram menores em portadores do alelo variante ($P = 0.026$)	Não foi observada associação significativa entre as concentrações de 6-TGN e o genótipo de <i>ITPA</i>	As concentrações de 6-MMPN foram mais elevadas em portadores do alelo variante ($P = 0.0038$)
Eritrócitos	As concentrações de 6-TGN foram mais elevadas em portadores do alelo variante ($P = 0.0077$)	As concentrações de 6-MMPN foram menores em portadores do alelo variante ($P = 0.032$)	Não foi encontrada qualquer relação entre o genótipo e as concentrações de 6-TGN ($P = 0.95$)	As concentrações de 6-MMPN foram mais elevadas em portadores do alelo variante ($P = 0.0057$)

Stocco *et al.*, avaliaram também o impacto de polimorfismo nos genes *ITPA/TPMT* na incidência da toxicidade. As toxicidades consideradas neste estudo foram neutropenia febril, toxicidade gastrointestinal e infeção relativamente aos doentes do protocolo Total 13B e toxicidade gastrointestinal e infeção para os doentes do protocolo Total 12 (os casos de neutropenia febril não foram estudados independentemente de

casos de infecção para este grupo de doentes). Os resultados poderão ser observados na **tabela 1.3**.

Tabela 1.3. Efeito do genótipo de *TPMT/ITPA* na incidência de toxicidade, durante a fase de manutenção, de acordo com os protocolos de tratamento Total 13B e Total12 (Stocco, G. *et al.*, 2009).

	Protocolo Total 13B (n=247)	Protocolo Total 12 (n=188)
<i>TPMT</i> Alelo variante vs. Alelo wild-type	Sem diferenças significativas na incidência de neutropenia febril. (OR = 1,4; IC 95%: 0,3 – 6,9; <i>P</i> = 0,71)	Portadores da variante alélica apresentam maior incidência de infecções (OR = 4,1; IC 95%: 1,2 – 14,0; <i>P</i> = 0,026).
<i>ITPA</i> Alelo variante vs. Alelo wild-type	Maior incidência de neutropenia febril em portadores da variante alélica (OR =3,0; IC 95%: 1,2 – 7,3; <i>P</i> = 0,018)	Sem diferenças significativas na incidência de infecções (OR = 0,90; IC 95%: 0,34 – 2,4; <i>P</i> = 0,84)

Os resultados revelaram que a incidência cumulativa de neutropenia febril, em doentes cujas doses de 6-MP foram ajustadas de acordo com o genótipo de *TPMT*, é significativamente maior em portadores do alelo *ITPA* 94A (**Figura 1.14**).

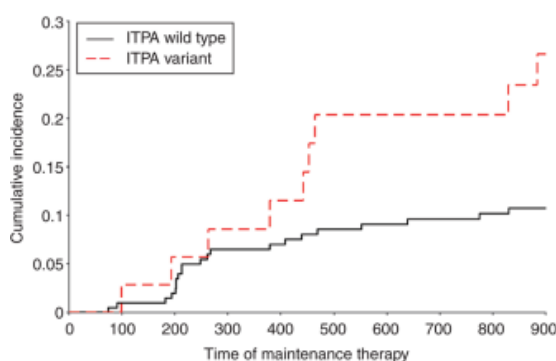


Figura 1.14. Curvas da incidência cumulativa de neutropenia febril de acordo com o genótipo de *ITPA* durante a quimioterapia de manutenção, em doentes com LLA, a qual inclui 6-MP de acordo com o protocolo Total 13B. No dia 900 de quimioterapia de manutenção, a estimativa da incidência desta reação adversa foi de 10,7% \pm 2,2 em doentes com o alelo *wild-type* e 26,6% \pm 7,8 em doentes com o alelo variante. (Os valores apresentados são a média e o desvio padrão) (Stocco, G. *et al.*, 2009).

Esta poderá ser causada por elevadas concentrações de nucleótidos tiopurínicos metilados, conhecidos pelas suas propriedades citotóxicas, o que devido à sua acumulação poderá contribuir para uma neutropenia persistente aumentando desta forma os eventos de neutropenia febril.

Esta associação foi particularmente evidente durante a segunda metade da quimioterapia de manutenção, quando o tratamento foi predominantemente, 6-MP e MTX. A neutropenia febril é uma complicação grave decorrente do tratamento com este tipo de fármacos e que, muitas vezes, leva à hospitalização para avaliação e tratamento e, mesmo quando devidamente tratada, poderá ser associada a significativa mortalidade, morbidade e custos. Além disso, a neutropenia febril poderá conduzir a uma redução da dose de 6-MP, pelo que a longo prazo poderá afetar a eficácia do tratamento da LLA. No entanto, uma vez que os doentes são devidamente tratados para estes efeitos adversos, estes investigadores não observaram uma associação entre os genótipos *ITPA/TPMT* e uma menor EFS (5, 8 ou 10 anos após o tratamento).

Foi também notório na *cohort* sujeita ao protocolo Total 12, uma maior probabilidade da ocorrência de infeções em doentes com défice na atividade da TPMT, mas não foi significativamente associado com o genótipo do *ITPA*. Segundo os autores, se as doses de 6-MP não forem ajustadas com base no genótipo do *TPMT*, então este será o factor predominante na toxicidade hematopoiética. Pelo contrário, se as doses forem ajustadas, então o gene *ITPA* terá uma influência significativa no risco de neutropenia febril. Estudo anteriores que avaliaram o papel de polimorfismos neste gene na toxicidade relacionada com tiopurinas foi conduzido em doentes com doença inflamatória intestinal, sendo que resultados contraditórios foram obtidos. A maioria destes estudos envolveu doentes cujas doses de 6-MP não foram sistematicamente ajustadas com base no genótipo de *TPMT*, segundo Stocco *et al.*, esta será provavelmente a razão dos resultados inconsistentes relativamente ao efeito do *ITPA* naqueles primeiros estudos (**Figura 1.15.**) (Stocco, G. *et al.*, 2009).

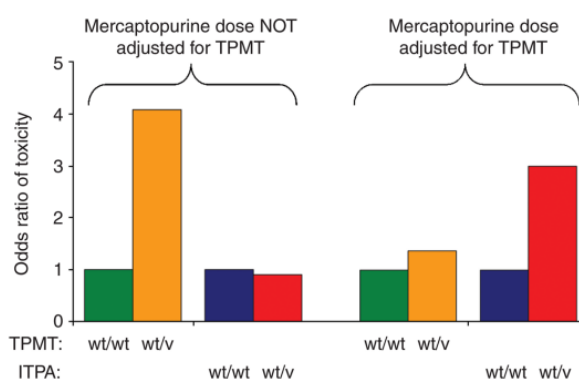


Figura 1.15. Gráfico do *Odds ratio* da toxicidade em função dos genótipos de *TPMT* e *ITPA*, em crianças com LLA para as quais as doses de 6-MP não foram ajustadas em função do genótipo de *TPMT* (Protocolo Total 12) e para aquelas nas quais as doses foram ajustadas com base no genótipo de *TPMT* (Protocolo Total 13B) (Stocco, G. *et al.*, 2009).

Também Hawwa *et al.*, observaram, em doentes com LLA, que portadores do alelo variante para o polimorfismo *ITPA* IVS2+21 A> C apresentam concentrações mais elevadas de 6-TGN quer nos eritrócitos ($P=0,008$) quer no plasma ($P=0,072$). Este grupo de investigadores observou também que esta variante alélica estava associada, nestes doentes, com a ocorrência de trombocitopenia ($P= 0,012$). Em contraste, o alelo *ITPA* 94A não foi associado com nenhum tipo de mielotoxicidade neste estudo (Hawwa, A. *et al.*,2008).

Em um estudo conduzido em uma população asiática, onde a variante alélica *ITPA* 94A apresenta uma maior frequência do que em caucasianos, Wan Rosalina *et al.* observaram também uma maior ocorrência de febre (OR = 1,75; IC 95%: 0,53 –5,82; $P<0,05$) e hepatotoxicidade (OR = 1,46, IC 95%: 0,41–5,13; $P<0,05$), em portadores do alelo *ITPA* 94A (Wan Rosalina, W.R. *et al.*2012). Um estudo mais recente, desenvolvido por Kim *et al.*, também associou os genótipos *ITPA* 94 AC/AA com uma EFS mais baixa, esta para o genótipo *wild-type* foi de 95.2% e 81.9% para os genótipos *ITPA* 94 AC/AA (HR=4,96; IC 95%: 1,1 – 22,7; $P = 0.039$) (Kim, H. *et al.*2012).

Uma outra enzima importante no metabolismo da 6-MP é a xantina oxidase, expressa predominantemente na mucosa intestinal e no fígado, rapidamente metaboliza 6-MP em ácido tiúrico inativo, resultando em uma substancial redução da biodisponibilidade de 6-MP. O gene *XO*, localizado no cromossoma 2, é altamente polimórfico pelo que alterações genéticas na região codificante, poderão ter consequências na atividade da proteína (Hawwa, A. *et al.*,2008; Beaumais, T. *et al.*, 2012).

Embora a influência da atividade da XO na variação interindividual de resposta ao tratamento ainda não esteja completamente esclarecida, Hawwa *et al.* avaliaram a correlação entre dois polimorfismos no gene *XO* (1936A> G e 2107A> G) com as concentrações de metabolitos da 6-MP em eritrócitos de 19 crianças com LLA. Estes investigadores observaram a presença de menores concentrações de 6-TU em um doente heterozigótico para as variantes no *XO*, comparativamente aos restantes doentes portadores do alelo *wild-type* do gene (AUC = 1,41 vs. 4,95 pmol per 8×10^8 eritrócitos $\text{mg}^{-1} \text{m}^{-2} \text{mês}^{-1}$). No entanto, concentrações de 6-TGNs nos eritrócitos deste paciente foram mais elevadas (Área Sob a Curva (*Area Under The Curve*, AUC) = 37,25 vs. 32,98 pmol per 8×10^8 eritrócitos $\text{mg}^{-1} \text{m}^{-2} \text{mês}^{-1}$). Estes resultados são consistentes com o papel desta enzima no catabolismo da 6-MP contudo segundo estes investigadores, a relação entre polimorfismos no gene *XO* e as concentrações de 6-TU deverá ser interpretada com algum cuidado, por duas razões: primeiro porque polimorfismos no *XO* foram também combinados neste estudo com polimorfismos no *TPMT* e em segundo lugar, todos os doentes estavam também a tomar MTX em associação com 6-MP, o qual apresenta um efeito inibidor sobre a atividade da enzima. Nenhuma das variantes alélicas em *XO*, neste grupo de doentes, foi associada a qualquer forma de mielotoxicidade. No entanto segundo os próprios autores, o pequeno tamanho da amostra poderá ter contribuído para esta falta de associação. De referir, que este estudo é dos poucos na literatura que pretende estudar o impacto clínico de polimorfismos neste gene nas concentrações dos metabolitos da 6-MP, bem como na toxicidade com esta relacionada, pelo que mais estudos serão necessários para compreender o papel deste gene na farmacogenética da 6-MP (Hawwa, A. *et al.*, 2008).

Foi observado ainda que os polimorfismos no gene *MTHFR* são mais comuns em indivíduos com baixa atividade de *TPMT* (Karas-Kuzelicki, N. *et al.*, 2009), muito provavelmente devido ao seu impacto sobre S-adenosilmetionina, um cofator da *TPMT* (Gervasini, G. *et al.*, 2012).

Quatro transportadores de influxo da família *solute carrier family* -SLC estão envolvidos no transporte de nucleótidos tiopurínicos, nomeadamente os transportadores SLC28A2, SLC28A3, SLC29A1 e SLC29A2. Os genes que codificam para estes transportadores são polimórficos, contudo o seu impacto clínico é pequeno ou ainda pouco estudado. Relativamente aos transportadores de efluxo da superfamília ABC, especialmente MRP4 e MRP5, dado seu papel na regulação dos níveis intracelulares de

tiopurinas, são bons candidatos para explicar a variabilidade interindividual na resposta a tiopurinas. Embora polimorfismos tenham sido identificados na região codificante destes genes, as suas consequências funcionais permanecem praticamente desconhecidas, sendo que não existem ainda dados disponíveis em doentes com LLA (Hawwa, A. *et al.*, 2008; Ban, H. *et al.*, 2010).

1.3. A Farmacogenômica na terapêutica com citarabina

As pesquisas sobre o papel da farmacogenética na resposta ou resistência a ara-C encontram-se ainda na sua fase inicial. A ocorrência de resistência é uma das principais razões para a falha no tratamento com ara-C, bem como para a ocorrência de efeitos adversos que contribuem para a morbidade e mortalidade (Hartford, C. *et al.*, 2009). A eficácia farmacológica da citarabina varia dramaticamente entre indivíduos, sendo que, de um modo geral, a quimioterapia de indução *standard*, com combinação de antibióticos antracíclicos e citarabina, produz uma taxa de remissão completa de 50 a 75%, em doentes adultos com LMA. No entanto, taxas de remissão mais elevadas têm sido observadas em doentes pediátricos com LMA, diagnosticados precocemente, com tratamentos de quimioterapia aperfeiçoados (Cai, J. *et al.*, 2008). Nos últimos anos, o aumento do uso de elevadas doses de ara-C melhorou significativamente a sobrevivência de doentes com LMA, particularmente os subtipos desta com translocação (8;21) e inversão (16). Porém, 15 a 30% dos doentes ainda não apresentam resposta ao tratamento e 30 a 80% apresentam recaída da doença. Apesar de doentes adultos com LMA a receberem altas doses de ara-C apresentarem uma maior probabilidade de sobrevida livre de recidiva em quatro anos do que aqueles a receberem baixas doses, a utilização de altas doses tem sido associada a efeitos adversos graves.

Ensaio clínicos demonstraram diferenças específicas entre grupos étnicos na eficácia do tratamento com ara-C e a ocorrência de efeitos adversos entre doentes com LMA. Estes recebem ara-C como componente principal do seu regime de tratamento, aumentando a possibilidade de que a farmacogenética deste fármaco possa desempenhar um papel fulcral nas diferentes respostas ao fármaco (Lamba, J.K. *et al.*, 2009).

O transportador hENT1/SLC29A1, o principal responsável pela entrada de citarabina na célula, e DCK, uma das enzimas responsáveis pela fosforilação de ara-C à sua forma ativa ara-CTP, representam dois dos genes candidatos a estudos farmacogenéticos (Cai, J. *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que as concentrações intracelulares de ara-CTP são mais elevadas em células sensíveis a este fármaco do que em células resistentes. Assim, o principal mecanismo subjacente à resistência a ara-C em células tumorais, parecem ser os níveis intracelulares insuficientes de ara-CTP, o que poderá dever-se à captação celular ineficiente de ara-C, devido a baixos níveis e/ou atividade do transportador hENT1, assim como à redução dos níveis de enzimas de ativação, principalmente DCK. O aumento celular de dCTP, o qual poderá competir com ara-CTP pela incorporação no ADN inibe também a atividade de DCK através de *feedback* negativo. Por outro lado, o aumento dos níveis de enzimas inativadoras, como CDA, também poderá contribuir para mecanismos de resistência (Lamba, J.K. *et al.*, 2009).

A eficácia global de ara-C pode, assim, ser modulada por uma combinação de fatores, incluindo as variações na absorção, nas vias anabólicas e catabólicas bem como na atividade de efluxo (Cai, J. *et al.*, 2008).

1.3.1. Polimorfismos nos genes envolvidos no transporte da citarabina

O transportador hENT1/SLC29A1 é responsável por cerca de 80% do influxo de ara-C nas células leucémicas humanas. Assim, quando são administradas doses *standard* deste fármaco, a sua concentração intracelular é criticamente dependente do transporte para dentro da célula por hENT1 (Lamba, J.K. *et al.*, 2009). Uma variabilidade interindividual considerável nos níveis de expressão de ARNm *hENT1* foi observada por Hubeek *et al.* Estes investigadores estudaram a relação entre o nível de expressão de ARNm de vários genes envolvidos no transporte e metabolismo de análogos de nucleósidos e a sensibilidade *in vitro* a este grupo de fármacos. Os resultados obtidos revelaram que a expressão de ARNm *hENT1* foi o factor mais importante na determinação da sensibilidade a ara-C ($P=0,001$), o que explicaria o facto de a entrada de ara-C na célula ser dependente principalmente deste transportador (**Figura 1.16.**).

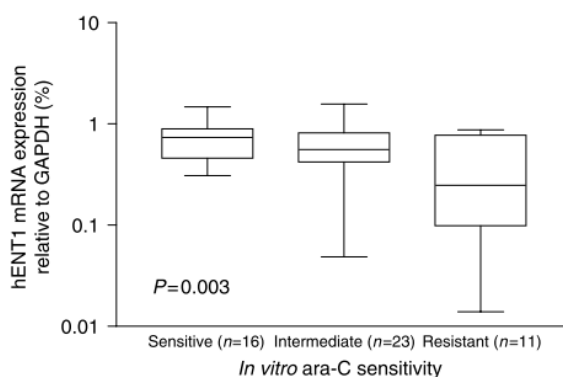


Figura 1.16. Expressão de ARNm *hENT1* em relação à sensibilidade a ara-C *in vitro*. Amostras provenientes de doentes com LMA foram divididas em três grupos baseadas na sua sensibilidade a ara-C (sensível: LC50 <0,98µm; intermédio:0,98 µm <LC50 <5,18 µm e resistente: LC50> 5,18 µm). LC50 corresponde a “*letal concentration 50*”. Células resistentes a ara-C *in vitro* expressaram níveis de ARNm *hENT1* 3 vezes menores do que células sensíveis (Hubeek, I. *et al.*,2005).

Os doentes que apresentaram resistência ao fármaco *in vitro* expressaram três vezes menos ARNm *hENT1* ($P=0,003$) (Hubeek, I. *et al.*,2005). Os resultados obtidos por estes investigadores estão de acordo com estudos anteriores, que apontam este transportador como um factor crucial na sensibilidade a ara-C. Galmarini *et al.*, determinaram a expressão de ARNm *hENT1* em blastos de 123 doentes adultos com LMA e demonstraram que a deficiência em *hENT1* estava relacionada com uma menor DFS.

Quando foram administradas doses *standard* de ara-C durante a fase de indução, os doentes com LMA cujos blastos foram negativos para a expressão de *hENT1*, apresentaram uma DFS menor (7,7 meses *vs* 13 meses; $P=0,05$) e um risco oito vezes maior de recidiva precoce comparativamente a doentes com blastos *hENT1* positivo (Galmarini, C.M. *et al.*,2002a,b).

Apesar de Hubeek *et al.* não terem avaliado a relação entre a expressão deste gene *in vivo* e a resposta ao tratamento, segundo os autores, os doentes com LMA podem beneficiar de uma avaliação dos níveis de ARNm *hENT1* no momento do diagnóstico devido a sua importância na dose de ara-C. O transporte de doses intermediárias de fármaco através da membrana é dependente apenas de transportadores de nucleósidos. No entanto, no transporte de altas doses de ara-C o *hENT1* parece ser menos crucial, uma vez que nesta situação o fármaco pode entrar na célula também por difusão passiva. Os doentes com um nível baixo de ARNm *hENT1* poderiam potencialmente

beneficiar de tratamento com doses mais elevadas ou com outro análogo que não fosse dependente deste transportador (Hubeek, I. *et al.*, 2005).

O gene *hENT1* tem revelado, excecionalmente, uma baixa mutabilidade em comparação com outros transportadores. Dentro da região de codificação, foram identificados quatro polimorfismos sinónimos e dois não-sinónimos (Ile216Thr e Glu391Lys). No entanto, ensaios *in vitro* demonstraram que estes polimorfismos não apresentaram qualquer influência na absorção de fármaco mediada pelo hENT1, o que poderá indicar que variantes na região codificante do gene poderão não estar envolvidas nas diferenças interindividuais na resposta a este fármaco (Osato, D.H. *et al.*, 2003).

Dado que nenhum polimorfismo na região codificante é conhecido por modular a função de *hENT1* e porque a expressão do gene parece afetar a sensibilidade a ara-C, alterações ao nível da regulação da transcrição do gene, parecem ser a hipótese mais provável para a variabilidade observada na expressão de *hENT1*. Ainda que o promotor do gene não tenha sido completamente caracterizado, foram descritos locais de ligação para o factor *hypoxia inducible factor* (HIF1), o qual medeia a repressão da expressão de *hENT1* em hipoxia. Portanto, qualquer variação genética que altere os locais de ligação para este factor de transcrição ou outros trará consequências ao nível da expressão do gene. A análise ao promotor do gene revelou três polimorfismos, nomeadamente 1345C> G, -1050G> A e -706G> C, responsáveis por alterações em locais de ligação de factores de transcrição. Diversos polimorfismos têm sido identificados nos diferentes grupos étnicos, no entanto a sua influência na resposta a ara-C continua a ser estudada (Lamba, J.K. *et al.*, 2009).

1.3.2. Polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo da citarabina

A enzima DCK, responsável por catalisar o primeiro passo na ativação de análogos nucleósidos tais como ara-C, gencitabina e fludarabina, tem sido alvo de diversos estudos. A redução ou a perda da atividade de DCK na célula tem sido observada em linhas celulares resistentes a ara-C, pelo que a transfecção do gene *DCK* nestas linhas celulares demonstrou um restauro *in vitro* da sensibilidade a ara-C (Lamba, J.K. *et al.*, 2009).

Banklau *et al.*, avaliaram de que modo polimorfismos poderia afetar a expressão de *DCK* em 90 crianças diagnosticadas com LLA e 4 com linfoma linfoblástico (LL) em estágio III e IV. Assim, estes doentes receberam baixas doses de ara-C durante a fase de indução da remissão e doses elevadas deste fármaco durante a reindução. Para os dois SNPs avaliados, *DCK* -360C> G e -201C> T, estes investigadores observaram que os alelos *wild-type* foram predominantes. Banklau *et al.*, verificaram que crianças com LLA portadoras do alelo *DCK* -360G apresentavam um maior risco de desenvolver mucosite após receberem baixas doses de ara-C (OR = 3,7; IC 95%: 1,2-11,3) (Banklau, C. *et al.*, 2010)

Também Hartford *et al.*, de modo a identificarem os polimorfismos genéticos que contribuem para a susceptibilidade a ara-C, estudaram em linhas celulares linfoblastoides, derivadas de doentes de origem europeia e africana, SNPs no gene *DCK* e a sua influência na susceptibilidade destas células a efeitos citotóxicos. Estas linhas celulares derivadas de indivíduos de diferentes etnias permitiram a identificação dos determinantes genéticos específicos de cada população. Estudos prévios observaram níveis significativamente mais elevados de ARNm *DCK* em células de doentes de origem africana comparativamente com as de doentes origem europeia. Segundo Hartford *et al.* estes resultados poderiam, em parte, explicar as diferenças observadas na população relativamente à sensibilidade a ara-C, uma vez que o aumento da expressão de *DCK* se traduziria em um aumento intracelular de ara-CTP.

Hartford *et al.*, registaram uma forte correlação entre os níveis de ARNm *DCK* e de proteína, assim como entre os níveis desta e a sensibilidade a ara-C. Estes investigadores, observaram também que uma maior expressão do gene, nos dois grupos étnicos, estavam significativamente correlacionadas com a citotoxicidade (**Figura 1.17.**).

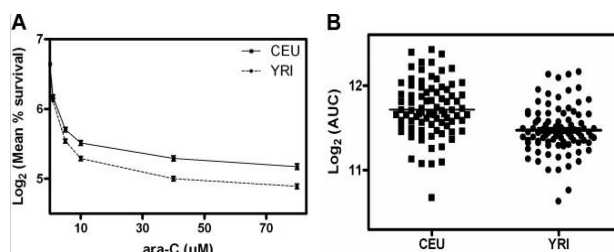


Figura 1.17. Citotoxicidade de ara-C em populações caucasianas (CEU) e africanas (YRI). (A) A percentagem de sobrevivência em linhas celulares de doentes caucasianos comparativamente a doentes de origem africana foi de 73,3 vs 70,5 com 1 μ M ($P = 0,24$), 53,3 vs 47,3 com 5 μ M ($P = 0,002$), 46,8 vs 39,9 com 10 μ M ($P = 1 \times 10^{-4}$), 40,3 vs 32,8 com 40 μ M ($P < 1 \times 10^{-4}$), e 37,3 vs 30,4 com 80 μ M de ara-C ($P < 1 \times 10^{-4}$). (B) A distribuição de \log_2 AUC em linhas celulares CEU e YRI ($P < 1 \times 10^{-4}$) (Hartford, C. *et al.*, 2009).

De forma a avaliar a contribuição de polimorfismos neste gene na sensibilidade a ara-C foram avaliados 64 SNPs, previamente identificados no *DCK*, para a sua associação com a citotoxicidade nestes dois grupos étnicos. Estes polimorfismos encontram-se na região proximal do promotor do gene assim como nos setes exões da região codificante.

Observou-se uma associação entre a presença de 5 dos 64 SNPs avaliados (-33, 70, 2162, 31942 e 36113) o \log_2 AUC nas amostras de células provenientes de doentes de origem africana, três dos quais poderão explicar uma variação significativa de cerca de 20% na AUC nas linhas celulares destes doentes. No entanto, apenas um dos 64 polimorfismos (1124) foi associado com o \log_2 AUC nas amostras de células de doentes europeus. Segundo os investigadores, este polimorfismo poderá explicar uma variação de 9% da AUC nestas linhas celulares.

Um subconjunto de 42 linhas celulares linfoblastoides, proveniente de doentes de origem africana, foi tratado com 1mM de ara-C nas quais foram quantificadas os níveis de ara-CTP. As linhas celulares linfoblastoides com um genótipo heterozigótico para o SNP *DCK* A70G demonstraram uma maior sensibilidade a ara-C. Hartford *et al.*, verificaram também que estas linhas celulares não só demonstraram uma maior expressão de *DCK* como apresentaram níveis significativamente mais elevados de ara-CTP comparativamente às linhas celulares linfoblastoides com genótipo homozigótico, o que sugere que este polimorfismo afecta a função da proteína (**Figura 1.18**) (Hartford, C. *et al.*, 2009).

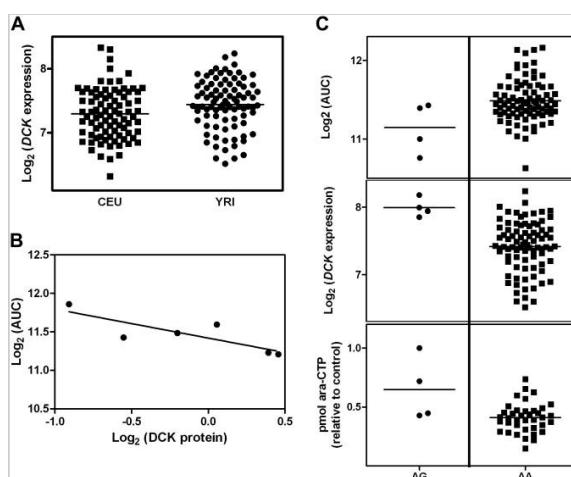


Figura 1.18. Análise da expressão de *DCK*. (A) Distribuição da expressão de mRNA em linhas celulares de caucasianos (CEU) e africanos (YRI) ($P = 0,02$). (B) A associação entre o nível de expressão da proteína *DCK* e \log_2 AUC em um subconjunto de linhas celulares YRI ($r^2 = 0,69$, $P = 0,04$). (C) A associação entre o genótipo de *DCK* A70G e \log_2 AUC ($P = 0,02$), os níveis de expressão de *DCK* ($P = 0,003$), e ara-CTP intracelular ($P = 0,003$) (Hartford, C. *et al.*, 2009).

Em estudos anteriores, outros dois polimorfismos, nomeadamente rs72552097 e rs2306744, foram identificados na região 3'-UTR não codificante do *DCK*, responsável por regular os níveis de ARNm *DCK* pós-transcrição e a eficiência da sua tradução, sendo que os alelos rs72552097G/rs2306744T expressam níveis mais elevados de ARNm *DCK*. Os doentes com LMA com os genótipos rs72552097CC/rs2306744CC apresentaram uma resposta ao tratamento significativamente menor em comparação com os restantes genótipos (Xu, P.P. *et al.*, 2012).

Os níveis de *DCK* foram também relacionados com a sensibilidade à gencitabina, outro substrato desta enzima, em tumores sólidos de diferentes origens, pelo que isto poderá fornecer evidências no que diz respeito à importância do estudo de variações genéticas que afetam este gene. Apesar de alguns estudos terem demonstrado uma associação entre a expressão de *DCK* e a sensibilidade a ara-C ou eficácia do tratamento, no entanto, a verdadeira contribuição da variação genética, nestes genes candidatos, na susceptibilidade a Ara-C permanece inconclusiva. Além disso, a contribuição genética para a toxicidade induzida por ara-C não foi avaliada de forma abrangente. Galmarini *et al.*, não encontraram qualquer relação entre os níveis de ARNm *DCK* e a evolução clínica de doentes adultos com LMA (Galmarini, C.M. *et al.*, 2002a).

Como foi referido anteriormente, *DCA* é a principal enzima de inativação da via metabólica de ara-C, estando envolvida na desaminação irreversível de ara-C a ara-U.

Ao longo das últimas décadas, alguns estudos têm associado os níveis de *DCA* com o risco de recaída em doentes com LMA (Jahns-Streubel, G. *et al.*, 1997; Schroder, J.K. *et al.*, 1998). Vários estudos *in vitro* têm demonstrado o papel do aumento da atividade da enzima *CDA* no desenvolvimento de resistência a ara-C. Estes resultados foram suportados pela observação que a resistência a ara-C poderia ser revertida utilizando um inibidor da *CDA*.

A prova do papel crucial de *CDA* no metabolismo de ara-C provém da demonstração de processos de resistência ao fármaco em fibroblastos de ratinho que sobre-expressam constitutivamente o gene *CDA* humano. A transdução retroviral de *CDA* em células progenitoras hematopoiéticas humanas está neste momento a ser explorada como estratégia citoprotectora, em conjugação com doses intensivas de ara-C em modelos animais, a qual tem tido resultados preliminares promissores.

Porém, as tentativas para estudar a relação entre a atividade de CDA em mieloblastos e a resposta clínica ao fármaco produziram resultados inconsistentes.

Alguns autores têm descrito que o aumento da atividade CDA correlaciona-se tanto com a resistência ao fármaco como com a duração da remissão. Schroder *et al.* confirmaram esses achados, demonstrando que a atividade mediana de CDA foi maior em doentes com doença refratária e recorrente. Estes investigadores avaliaram tanto a expressão quantitativa de ARNm *DCA* como a atividade enzimática de proteína (Schroder, J.K. *et al.*, 1998; Bhatla, D. *et al.*, 2009).

A sequenciação do gene CDA em vários grupos étnicos, nomeadamente asiáticos, caucasianos e afro-americanos identificou três polimorfismos não-sinónimos, nomeadamente 79A> C (Lys27Gln) e 208G> A (Ala70Thr) e 435T> C.

O polimorfismo 79A> C (Lys27Gln) foi associado com a redução da desaminação de ara-C *in vitro*, sendo que em crianças com LMA homocigóticas para o alelo CDA 79C (considerado o alelo responsável pela baixa atividade de DCA) foi observado um risco aumentado de mortalidade relacionada com o tratamento com ara-C (Lamba, J.K. *et al.*, 2009)

Bhatla *et al.*, conduziram um estudo que pretendeu avaliar a influência deste polimorfismo na ineficácia do tratamento com ara-C bem como na toxicidade relacionada com a administração deste. Assim, este estudo envolveu 457 doentes com LMA, com idades compreendidas entre os zero e vinte e um anos. Estes doentes foram tratados de acordo com os protocolos *Children's Cancer Group* (CCG) 2941 e 2961. O protocolo CCG- 2961 consiste em um estudo randomizado de fase III em doentes com idade inferior a 21 anos sem tratamento prévio de LMA. O protocolo CCG -2941 foi um estudo piloto para sucessor do protocolo CCG- 2961, sendo similar. Todos os doentes receberam de forma intensiva quimioterapia de indução com IDA- DCTER (idarrubicina, dexametasona, citarabina, tioguanina, etopósido e daunorrubicina) seguida de DCTER (dexametasona, ara- C, tioguanina, etopósido e daunorrubicina). A dose total de ara- C durante esta fase da quimioterapia foi de 1600 mg/m².

Os doentes aptos para receberem a quimioterapia de consolidação foram aleatoriamente agrupados: um dos grupos receberam o regime A, um segundo curso de DCTER (dose total de ara- C foi de 1600 mg/m²) e o outro grupo o regime B de IDA - FLAG (idarrubicina, fludarabina, ara-C e *human granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF)). Neste regime, a dose total de ara- C foi de 7590 mg/m².

Após a fase de consolidação, os doentes que não reuniram as condições para a realização de transplante alogênico, receberam quimioterapia de intensificação com altas doses de ara-C (dose total de ara-C foi de 24000 mg²) bem como L-asparaginase e doses adicionais de ara-C IT. Amostras de sangue foram também obtidas a partir de 205 dadores de sangue saudáveis de origem caucasiana e afro-americana, os quais serviram como controlos para estimar as frequências genóticas na população saudável.

Os genótipos para este polimorfismo variaram significativamente entre grupos étnicos, sendo o alelo variante 79C mais frequente em doentes caucasianos (AC+CC, 80%) comparativamente a doentes de origem africana (AC + CC, 3%), hispânica (AC+CC, 13%), asiática (AC + CC 1%) e de outras etnias (AC + CC, 3%), ($P < 0,001$).

Bhatla *et al.*, observaram que após o segundo ciclo de tratamento, quando elevadas doses de ara-C foram administradas, houve um aumento significativo na incidência cumulativa da mortalidade relacionada com o tratamento (MRT) em crianças portadoras do genótipo DCA 79CC comparativamente aos restantes genótipos (**tabela 1.4**). A análise dos resultados revelou também que o impacto do genótipo na MRT foi mais evidente no grupo de doentes a receber IDA-FLAG, com uma dose total de ara-C consideravelmente mais elevada (9190 mg/m²) comparativamente ao grupo que recebeu uma dose total de ara-C de 3200 mg/m². Nos doentes a receberem fludarabina observou-se, efetivamente um aumento da mortalidade decorrente de infeções, o que segundo os investigadores poderá dever-se à imunossupressão adicional originada por este fármaco neste grupo de doentes. Este poderá consistir em fator de confusão quando se avalia a mortalidade relacionada com o tratamento pós-randomização dos doentes a receberem maiores doses de ara-C. Contudo, este resultado não apresentou significado estatístico, como se pode observar nos resultados da **tabela1.4**.

Tabela 1.4. Mortalidade relacionada com o tratamento com ara-C nas diferentes fases de quimioterapia de acordo com o genótipo para CDA A79C.

Genótipo CDA A79C	MRT início do estudo	MRT pós- indução	MRT pós- randomização	IDA-DCTER Dose total de ara- C 3200 mg/m ²	IDA-FLAG Dose total de ara-C 9190 mg/m ²
AA	15 ±5%	12 ±5%	6,9±4,2%	8,2±6,4%	6,3±6,1%
AC	18 ±6%	13 ±6%	4,8±4,2%	4,3±6,0%	5,9±6,7%
CC	20 ±12	20 ±12%	17,1±12,7%	15,4±20%	23,5±20,6%
<i>P</i>	0,59	0,55	0,05	0,39	0,06

Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão.

Seria esperado que um aumento da exposição ao fármaco resultasse em uma redução na taxa de recaída. Estes investigadores observaram que a sobrevida livre de recaída (RFS) foi aumentada em 17% em crianças tratadas com IDA-FLAG com o genótipo *DCA* 79CC comparativamente aos outros genótipos ($59 \pm 12\%$ AA vs $55 \pm 14\%$ AC vs $76 \pm 20\%$ CC; $P= 0,40$). Porém, esta associação não apresentou significado estatístico possivelmente devido ao tamanho limitado da amostra.

Quando a toxicidade não hematológica foi avaliada, a toxicidade global não foi significativamente diferente entre os vários genótipos ($P= 0,675$), embora doentes com o genótipo 79CC fossem mais propensas a apresentar mucosite pós-randomização (AA 21%; AC 32%; CC 34%; $P = 0,04$). No entanto, estes investigadores não conseguiram estabelecer uma associação entre o genótipo, *CDA* A79C, e a OS nas diferentes fases de tratamento.

Segundo os investigadores, uma das limitações deste estudo foi a falta de medição direta da atividade de *CDA* nestes doentes, sendo que a atividade apenas está implícita a partir do genótipo.

Bhatla *et al.*, enfatiza a importância de replicar este estudo bem como a aplicação de protocolos clínicos utilizando diferentes doses de Ara -C para determinar a importância deste polimorfismo (Bhatla, D. *et al.*, 2009). No entanto, existem também alguns exemplos de resultados contrários aqueles obtidos por Bhatla *et al.*, pelo que a inconsistência nos resultados dos estudos no que diz respeito a este polimorfismo tem impedido a sua pronta implementação a nível clínico. Na região do promotor do gene *CDA*, em caucasianos e afro-americanos, foi identificado um haplótipo definido por três SNPs, -92A> G, -451C> T e -897C> A, os quais foram associados a uma maior atividade enzimática (Fitzgerald, S.M. *et al.*, 2006) No entanto, se este haplótipo estará associado com a sensibilidade a ara-C ou com a sua resposta clínica continua a ser determinado (Lamba, J.K. *et al.*, 2009).

Foi desenvolvido um estudo por Mahlkecht *et al.*, no qual se pretendeu avaliar a influência dos polimorfismos *CDA* 79A> C (Lys27Gln), -88G> A, -92A> G, -451C> T e *CDK* 364C> T (Pro122Se) na OS em 5 anos e na ocorrência de vários tipos de toxicidade em 360 doentes caucasianos com LMA. Foi observado por estes investigadores que os doentes com o genótipo *CDA* -92AA apresentavam menor incidência de toxicidade hepática comparativamente aos restantes genótipos *CDA* -

92AG e -92GG (13 vs 21 vs 23%; $P= 0,03$). Pelo contrário, nenhuma correlação foi observada com os restantes polimorfismos e com outros tipos de toxicidade.

Os resultados obtidos por Mahlkecht *et al.*, revelam ainda que cerca de 51% dos doentes atingiram a remissão completa após uma dupla quimioterapia de indução com a ara-C. Os polimorfismos *CDA* 79A> C, -92A> G e -451C> T e os seus haplótipos não apresentaram qualquer influência na resposta ao tratamento. No entanto, estes investigadores observaram que a OS em 5 anos foi menor em doentes homocigóticos para o alelo *CDA* -451T do que em doentes homocigóticos para o alelo *wild-type* (OS: 13 vs 25%, $P=0,05$). No que diz respeito à DFS em 5 anos, as diferenças entre genótipos não foram estatisticamente significativa ($P= 0,08$). Os doentes heterocigóticos para este polimorfismo apresentaram uma OS e DFS intermédias (23% e 29%, respetivamente).

Por último, Mahlkecht *et al.*, verificaram que os doentes homocigóticos para o alelo variante *CDA* -451T apresentaram um risco aumentado em 50% de mortalidade em comparação com os doentes homocigóticos para a versão *wild-type* (HR= 1,56; IC 95%: 1,09-2,24; $P=0,02$).

Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que mostraram a relevância clínica deste último polimorfismo no promotor do gene, o qual leva a uma redução no nível de expressão de *CDA* e consequentemente a alteração da atividade enzimática. Dados anteriores já tinham sugerido que este polimorfismo aumentaria o risco de toxicidade associado com doses *standard* de ara-C, o que está de acordo com estes dados. Há que salientar que, apesar de ara-C ser o mais importante fármaco no tratamento da LMA, a administração conjunta com antraciclina, mitoxantrona, em combinação com etopósido, outro fármaco usado na quimioterapia das leucemias, poderá ter tido alguma influência na toxicidade hepática observada assim como na resposta ao tratamento independentemente dos polimorfismos aqui referidos (Mahlkecht, U. *et al.*, 2009).

Muitos polimorfismos e haplótipos nos genes *DCK* e *CDA* têm sido identificados em doentes de etnia africana e caucasiana, no entanto poucos estudos têm sido realizados em doentes de origem asiática (Xu, P.P. *et al.*, 2012).

O polimorfismo *CDA* 208A> G, identificado na população japonesa, parece ser responsável pela menor atividade de *CDA* e pelo aumento da sensibilidade a ara-C, no

entanto este polimorfismo não foi identificado em caucasianos e afro-americanos (Lamba, J.K. *et al.*, 2009).

Xu *et al.*, realizaram um estudo retrospectivo no qual avaliaram três SNPs no gene *CDK* (57C> CA, 1356T> C e 359A> G (Glu120Gly)) e dois SNPs em *CDA* (79A> C (Lys27Gln) e 208G> A (Ala70Thr)) e a sua influência na resposta a ara-C em 151 doentes chineses com LMA. Todos os doentes receberam quimioterapia de indução *standard* e os efeitos do tratamento foram avaliados após o segundo ciclo de quimioterapia.

Estes investigadores observaram que os portadores de pelo menos um alelo variante para os polimorfismos *DCK* 1356T> C (OR = 1,225, IC 95%: 1,225-9,851, $P = 0,0192$) e *CDA* 208G> A (OR = 9,851; IC 95%: 1,31-77,93, $P = 0,0263$) apresentaram uma melhor resposta a ara-C. Pelo contrário, em portadores homozigóticos *DCK* 57AA observaram uma diminuição da resposta à quimioterapia com ara-C (OR = 0,147, IC 95%: 0,027-0,801, $P = 0,0267$) (Xu, P.P. *et al.*, 2012). Assim, estes investigadores confirmam a importância destes dois genes na resposta ao tratamento com ara-C.

Os principais genes candidatos continuam a ser alvo de diversos estudos, não só *hENT1/SLC29A1*, *DCK* e *DCA* mas também outras enzimas envolvidas no metabolismo de ara-C e de outros análogos nucleósidos têm sido estudadas (Lamba, J.K. *et al.*, 2009).

1.4. A Farmacogenômica na terapêutica com vincristina

Na última década diversos estudos têm possibilitado um maior conhecimento acerca da farmacocinética, farmacodinâmica e farmacogenética da vincristina no entanto, a variabilidade interindividual farmacocinética mostrada por este fármaco e a ocorrência de neurotoxicidade relacionada com a dose permanece pouco estudada, principalmente em doentes com leucemias agudas.

A toxicidade limitante da dose consiste em neuropatia motora periférica progressiva, o que pode conduzir a perda da força muscular periférica das extremidades dos membros superiores e inferiores (Hartman, A. *et al.*, 2010), resultado da degeneração axonal, ainda que reversível, provocada por este fármaco (Moore, A. *et al.*, 2009). Alguns autores assumem que existe uma relação entre doses cumulativas de

vincristina e a severidade de problemas motores, no entanto um estudo recente mostrou que estes não se encontram relacionados com a frequência, dose ou doses cumulativas. Além disso, crianças tratadas com protocolos de quimioterapia idênticos apresentaram uma variabilidade na resposta ao fármaco. Assim, a causa da variabilidade na ocorrência de neurotoxicidade permanece, ainda, desconhecida (Hartman, A. *et al.*, 2010).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram o papel fulcral das enzimas CYP3A no metabolismo e eliminação sistêmica da vincristina. O CYP3A5 parece ser mais eficiente a catalisar a formação do principal metabolito da vincristina comparado com o CYP3A4 (a depuração plasmática é 9 a 14 vezes maior pelo CYP3A5), contribuindo 55 a 95% no metabolismo deste fármaco. Assim, polimorfismos neste gene poderão contribuir para a variabilidade interindividual observada na eliminação sistêmica da vincristina, (Dennison, J. *et al.*, 2006) tornando-o no principal gene candidato a estudos farmacogenéticos (Gervasini, G. *et al.*, 2012).

As principais variantes alélicas neste gene incluem *CYP3A5*3*, *CYP3A5*6* e *CYP3A5*7*, todas elas resultam na expressão de uma enzima não funcional. Alguns estudos têm revelado que existe uma variabilidade interindividual de até dez vezes na farmacocinética da vincristina, assim como na variabilidade intradoentes após administração de doses repetidas.

Mais de 70% dos africanos apresenta no mínimo um alelo *CYP3A5*1*, o que permite a expressão de quantidades significativas de enzima ativa, no entanto este alelo encontra-se presente em apenas 10 a 20% de caucasianos. A expressão polimórfica do *CYP3A5* pode, em parte, explicar a discrepância étnica observada em relação à sobrevida e ocorrência de toxicidade em doentes tratados com este grupo de fármacos (Renbarger, J. *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado em crianças com LLA de etnia africana foi observado que estas apresentavam um aumento de 42% na taxa de mortalidade comparativamente com crianças caucasianas. A EFS foi de apenas 54% para crianças de etnia africana comparativamente com uma EFS de 82% em caucasianos. Os investigadores sugerem que a alta expressão de *CYP3A5* em africanos resulte em um aumento da eliminação da vincristina e contribua para esta disparidade na EFS (Moore, A. *et al.*, 2009) Por outro lado, poderá supor-se que os africanos metabolizam a vincristina mais eficientemente que caucasianos resultando em uma diminuição da biodisponibilidade do fármaco e consequentemente em uma menor toxicidade (Renbarger, J. *et al.*, 2008).

Renbarger *et al.*, desenvolveram um estudo retrospectivo envolvendo uma *cohort* de 113 doentes pediátricos com LLA pré-B, 92 doentes caucasianos e 21 doentes africanos, nos quais foi avaliada a relação entre a etnia e a neurotoxicidade associada com a vincristina. Estes investigadores observaram que 34,8% dos caucasianos apresentaram sintomas relacionados com neurotoxicidade comparativamente com 4,8% dos africanos ($P=0,007$). Além disso, caucasianos apresentaram formas mais severas de toxicidade do que africanos ($P < 0,0001$). O grau médio de neurotoxicidade para caucasianos foi de 2,72, enquanto que africanos apresentaram grau 1 ($P < 0,0001$). Cerca de 4% do total de doses administradas a doentes caucasianos foram reduzidas devido a neurotoxicidade em comparação com 0,1% dos africanos ($P < 0,0001$). Em média, africanos apresentam uma diminuição de exposição a vincristina comparativamente a caucasianos, potencialmente devido à expressão do *CYP3A5*. Segundo estes investigadores, a ocorrência de toxicidade está muitas vezes relacionada com o grau de exposição ao fármaco, e portanto indivíduos africanos que expressam um *CYP3A5* funcional apresentam uma ocorrência de neurotoxicidade significativamente menor do que caucasianos, os quais normalmente não expressam um *CYP3A5* funcional. Tais resultados suportaram esta hipótese. Não obstante, outras possibilidades poderão explicar estes resultados, uma vez que diferenças na neurotoxicidade poderão estar relacionadas com a variabilidade na sensibilidade à vincristina mais do que na exposição ao fármaco, além de que esta variabilidade poderá dever-se a factores étnicos não genéticos, nomeadamente diferenças ambientais (Renbarger, J. *et al.*, 2008).

Em um estudo mais recente, Hartmann *et al.* avaliaram a variação no desempenho motor de 34 doentes com LLA, tratados com $2,0\text{mg}/\text{m}^2$ de vincristina, e a sua relação com polimorfismos no gene *CYP3A5*, nomeadamente com a variante alélica *CYP3A5*3*. Os resultados não forneceram evidências de que *CYP3A5*3* afetasse o desempenho motor nesta *cohort* de doentes. Estes investigadores testaram a hipótese de que a presença do genótipo *CYP 3A5*3/*3* faria aumentar a toxicidade da vincristina, o que consequentemente resultaria em uma alteração no desempenho motor, contudo os resultados obtidos não suportaram esta hipótese e os investigadores não observaram qualquer associação estatística significativa entre a variante *CYP3A5*3* e o desempenho motor. Segundo os investigadores, nesta *cohort* de doentes apenas foram observados portadores dos genótipos *CYP3A5*1/*3* e *CYP3A5*3/*3*, portanto nada pode ser concluído sobre o efeito do *CYP3A5*1/*1* (Hartman, A. *et al.*, 2010).

Os alcaloides da vinca são também um substrato para o transportador ABCB1, tendo este um papel importante na excreção biliar e renal deste grupo de fármacos. Foi identificado um diverso número de polimorfismos no gene *MDR1* levantando a possibilidade de que variações genéticas neste poderiam contribuir para a variabilidade interindividual observada na farmacocinética, eficácia e toxicidade relacionada com a vincristina. Sendo este transportador expresso na barreira hematoencefálica, apresenta a capacidade de limitar a exposição neuronal à vincristina. No entanto, uma menor atividade ou menor expressão de *ABCB1* poderão aumentar essa exposição e conseqüentemente a incidência de neuropatia (Moore, A. *et al.*, 2009).

Plasschaert *et al.* conduziram um estudo realizado em 52 crianças com LLA tratadas com vincristina, no entanto estes investigadores não encontraram qualquer associação estatística significativa entre os polimorfismos 3435C> T ou 2677G> T neste gene e a variabilidade na farmacocinética e toxicidade. Quando estes investigadores avaliaram a associação entre os haplótipos e a variabilidade farmacocinética, observaram que os portadores do haplótipo 3435C/2677G apresentavam um maior tempo de meia-vida do que os não portadores (1156 vs 805 minutos, $P = 0,038$). Em contraste, o haplótipo 3435T/2677G tinha um tempo de meia-vida mais curto do que aqueles que não eram portadores deste haplótipo (805min vs 1.180 min, $P = 0,044$). No entanto, este significado já não foi observado após a correção de Bonferroni para testes múltiplos. Os haplótipos não afetaram outros parâmetros farmacocinéticos, tais como a depuração plasmática de fármaco, o que segundo estes investigadores, sugere que os resultados observados são de importância muito limitada. Além disso, estes polimorfismos não foram relacionados com um risco aumentado para a obstipação induzida pela vincristina (Plasschaert, S.L. *et al.*, 2004)

Hartman *et al.*, também avaliaram a influência destes polimorfismos no gene *MDR1* na neurotoxicidade no entanto, e de acordo com os estudos anteriores, também estes investigadores não encontraram qualquer associação estatística entre o genótipo e o desempenho motor destes doentes. Estes autores colocaram a hipótese de que estes haplótipos poderiam afetar a capacidade motora mas os resultados obtidos não suportaram este pressuposto. O tamanho das *cohorts* nestes estudos eram relativamente pequenas limitando assim a avaliação do efeito destes polimorfismos nos diferentes genes (Hartman, A. *et al.*, 2010).

Pesquisas acerca da farmacocinética e farmacogenética da vincristina continuam em curso, no entanto dada a escassez de evidências sobre o impacto clínico destas variantes genéticas em doentes tratados com este fármaco, tem havido a necessidade de estabelecer estratégias preventivas. Atualmente, estão a decorrer ensaios clínicos que investigam a utilização de agentes neuroprotetores, tal como ácido glutâmico, e de formulações lipossomais, os quais poderão aumentar a janela terapêutica de vincristina (Moore, A. *et al.*, 2009).

1.5. A Farmacogenômica na terapêutica com antibióticos antracíclicos

A contribuição de fatores farmacogenéticos na via metabólica de antraciclina não se encontra ainda completamente estabelecida. No entanto, tem-se observado neste grupo de fármacos uma variação interindividual e interétnica em parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, surgindo a hipótese de que uma variabilidade genética possa contribuir, em parte, para a heterogeneidade na biodisponibilidade, eficácia e ocorrência da bem conhecida cardiotoxicidade, relacionada com a dose de fármaco (Lal, S. *et al.*, 2010).

A cardiotoxicidade induzida por antraciclina parece ser um processo multifatorial, tanto os fármacos doxorubicina e daunorrubicina como os seus principais metabolitos têm sido implicados neste processo. Vários mecanismos têm sido propostos e julga-se que os mecanismos pelos quais estes fármacos exercem a sua ação terapêutica são diferentes daqueles responsáveis pela cardiotoxicidade, nomeadamente *stress* oxidativo em miócitos cardíacos por radicais livres, processos que envolvem ferro e efeitos nocivos sobre as mitocôndrias.

Uma das razões pela qual os cardiomiócitos podem ser mais sensíveis a estes fármacos do que outros tecidos é, porque o coração, em comparação com o fígado, tem uma concentração muito baixa de defesas enzimáticas contra o ataque de radicais livres tais como as enzimas superóxido dismutase e glutatona peroxidases (Minotti, G. *et al.*, 2004; Bains, O. *et al.*, 2009).

1.5.1. Polimorfismos nos genes envolvidos no transporte de antibióticos antracíclicos

São escassos os estudos sobre a influência de polimorfismos, em genes envolvidos no transporte de antraciclina, na incidência de efeitos adversos, em doentes com leucemias agudas. Em particular, *SLC22A16* e *ABCB1* têm sido os principais genes alvos estudados, dada a sua importância na farmacocinética e toxicidade neste grupo de fármacos (Gervasini, G. *et al.*, 2012).

Estudos em doentes com cancro da mama tratados com doxorubicina e daunorrubicina têm mostrado que polimorfismos no gene do transportador de influxo *SLC22A16*, nomeadamente 1226T> C (Met409Thr), 146A> G (His49Arg), 312T> C (sinónimo) e 755T> C (Val252Ala), poderão influenciar a variabilidade farmacocinética interindividual e interétnica. Bray *et al.* observaram, para os polimorfismos 146A> G, 312T> C e 755T> C, que indivíduos portadores dos alelos variantes, comparativamente aos portadores do alelo *wild-type*, apresentavam uma menor incidência na “*dose delay*” da doxorubicina, e conseqüentemente um menor risco de toxicidade. Curiosamente estes investigadores verificaram uma maior incidência na “*dose delay*” em portadores do alelo *SLC22A16* 1226C (Bray, J. *et al.* 2010).

A sobre-expressão do transportador *ABCB1*, é um problema clinicamente relevante na LMA, uma vez que este é responsável pelo transporte de substratos como os antibióticos antracíclicos. Muitos polimorfismos neste gene têm sido identificados, dos quais se destacam 1236C> T, 2677G> T/A e 3435C> T, em forte *linkage disequilibrium* e encontrados com elevada frequência e 1199G> A. Estes SNP têm sido alvo de estudos relativamente à sua influência na biodisponibilidade de alguns fármacos, tendo sido associados com alterações na expressão do transportador. Indivíduos homozigóticos para os três alelos variantes nos três *loci* mostraram uma menor atividade do *ABCB1* (Lal, S. *et al.*,2010).

Alguns estudos *in vitro* têm identificado este transportador como um dos principais candidatos por mediar a resistência à doxorubicina. Linhas celulares Hs578T-Dox, de carcinoma da mama, com sobre-expressão de *ABCB1* revelaram uma sensibilidade duzentas vezes menor do que linhas celulares Hs578T que não expressam *ABCB1* (Lal, S. *et al.*,2010). Estudos em ratinhos “*mdr1a-knock-out*” também suportam o papel

fulcral deste transportador na excreção da doxorubicina por via hepática e por mecanismos extra-hepáticos (Kassner, N. *et al.*, 2008).

Até hoje, existem poucos estudos, num cenário de leucemias agudas, que avaliem de que forma polimorfismos genéticos poderão afetar a biodisponibilidade e, conseqüentemente, modular a resposta e efeitos adversos relacionados com a mitoxantrona (Gervasini, G. *et al.*, 2012).

Green *et al.*, investigaram a influência destes polimorfismos na citotoxicidade *in vitro* em células leucémicas e na OS de 100 doentes com LMA com cariótipo normal. Todos os doentes assim como 400 indivíduos saudáveis foram genotipados para estes cinco polimorfismos, não tendo sido encontradas diferenças significativas nas frequências alélica entre estes dois grupos.

Quando estes investigadores avaliaram a influência de polimorfismos no *ABCB1* na OS destes doentes verificaram que portadores dos genótipos 1236C/C apresentaram uma pior sobrevida do que doentes com outros genótipos ($P = 0,03$). O tempo de sobrevida médio foi de 0,7, 1,3 e 1,8 anos para os portadores de 1236C/C, 1236C/T e 1236T/T, respetivamente. Da mesma forma, portadores do genótipo 2677G/G apresentaram também uma OS menor ($P = 0,02$). O tempo de sobrevida médio para os doentes com genótipo G/G, G/T e T/T foi de 0,7, 1,2 e 1,7 anos, respetivamente (Green, H. *et al.*, 2012).

Também Illmer *et al.* avaliaram a influência dos polimorfismos 1236C> T, 2677G> T/A e 3435C> T em uma população caucasiana com LMA (n=405), mostrando que doentes com as variantes *wild-type* (1236C/C, 2677G/G e 3435C/C) apresentavam uma menor OS e um maior risco de recaída da doença, relativamente aos portadores dos restantes genótipos (Illmer, T. *et al.*, 2002). No entanto, estudos com resultados contrários também se observam (Kim, D.H. *et al.* 2006; Holt, B. *et al.*, 2006).

Nos estudos de citotoxicidade, Green *et al.* avaliaram a sensibilidade *in vitro* de células leucémicas de 56 doentes com LMA, relativamente à mitoxantrona, daunorrubicina, citarabina e etopósido. Deste modo, as células leucémicas de doentes com o melhor prognóstico, isto é, com os genótipos 1199G/A, 1236T/T, 2677T/T e 3435T/T, foram avaliadas quanto à sua sensibilidade comparativamente com a sensibilidade das células de todos os outros doentes. Estes investigadores observaram que as células leucémicas de doentes com os genótipos 1236T/T e 2677T/T eram significativamente mais sensíveis à mitoxantrona ($P = 0,02$), apresentando assim uma

sobrevida *in vitro* significativamente menor. Os polimorfismos 1199G> A e 3435C> T não afetaram a citotoxicidade *in vitro*, no entanto, uma vez que apenas três dos doentes, a partir do qual as células leucêmicas foram isoladas, eram heterozigóticos para 1199G> A, esse efeito não pode ser excluído (Green, H. *et al.*, 2012).

As consequências funcionais destes polimorfismos no *ABCB1* ainda não foram extensivamente estudadas *in vitro* para estes substratos. Em contraste com este estudo, Schaefer *et al.* mostraram que as velocidades de transporte máximo para a vincristina, outro substrato deste transportador, foi significativamente elevado, cerca de 1,5 a 3 vezes mais para as variantes 2677T e 2677A, respetivamente (Schaefer, M. *et al.*, 2006). Isto poderia indicar uma resistência mais elevada para a variante 2677T do que para 2677G, o que estaria em contradição com a menor sobrevida, observada por Green *et al.*, em células leucêmicas isoladas de doentes homozigóticos para o alelo T.

Green *et al.* sugerem que polimorfismos no *ABCB1*, tais como 1236C> T e 2677G> T, poderão afetar a sobrevivência de doentes com LMA com cariótipo normal após a quimioterapia, o que ofereceria informações úteis para estratégias de tratamento e quimioterapia individualizada. Os portadores dos genótipos 1236T/T ou 2677T/T beneficiariam do tratamento padrão da LMA com antraciclina e citarabina, sendo considerados doentes de baixo risco, ao contrário dos portadores dos genótipos 1236C/C e 2677G/G genótipos, que apresentaram um pior prognóstico quando tratados de acordo com os regimes padrão. Se o genótipo de *ABCB1* se revelar, efetivamente, um marcador de prognóstico confiável, o número de doentes de risco intermediário pode ser diminuído ainda mais do que já é hoje (Green, H. *et al.*, 2012).

1.5.2. Polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo de antibióticos antracíclicos

As enzimas carbonil reductases, como foi visto anteriormente, são oxidoreductases dependentes de NADPH responsáveis pelo metabolismo de doxorubicina e daunorrubicina, sendo capazes de catalisar a sua redução para os respectivos álcoois, doxorubicinol e daunorrubicinol, facilitando deste modo a sua eliminação do organismo, quer diretamente ou através de reações de conjugação de fase II. A atividade destas enzimas varia muito entre indivíduos e grupos étnicos razão pela qual se torna

um gene alvo para estudos farmacogenéticos (Bains, O. *et al.*, 2009; Thorn, C. *et al.*, 2011).

Bains *et al.* desenvolveram um estudo metabólico *in vitro* que pretendia avaliar a influência das variantes V88I e P131S, dois polimorfismos não-sinónimos presentes no gene *CBR1*, no metabolismo de doxorubicina e daunorrubicina e dos seus principais metabolitos, doxorubicinol e daunorrubicinol. Estes investigadores observaram que *CBR1*, tanto a enzima *wild-type* como as suas variantes, são eficientes na metabolização da doxorubicina e daunorrubicina, com maior especificidade para esta última. A preferência metabólica de *CBR1* para daunorrubicina é consistente com o observado em estudos prévios. Além disso, também observaram que a variante V88I reduz significativamente a atividade da enzima para ambas as antraciclinas e que a variante P131S reduz significativamente a afinidade para a daunorrubicina (Bains, O. *et al.*, 2009).

Gonzalez-Covarrubias *et al.* demonstraram, através do consumo do cofactor NADPH, que a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) da reação metabólica foi significativamente menor na variante V88I comparativamente à enzima *wild-type*. Estes investigadores confirmaram esta diferença cinética por medição direta dos níveis daunorrubicinol, a qual demonstrou que a enzima variante produz 47% menos metabolito que a versão *wild-type*.

Estes autores sugerem que, dada a proximidade desta variante ao local de ligação do cofator, esta tenha impacto na afinidade de ligação do NADPH. Assim, esta substituição de uma valina por uma isoleucina poderá ser a base para a diminuição significativa nos níveis de metabolitos produzidos. A mutação P131S, embora mais distante do centro ativo e do local de ligação de NADPH do que a mutação V88I, poderia alterar a conformação de um ou de ambos os locais, o que por sua vez explicaria por que houve uma menor afinidade para a daunorrubicina comparativamente com a enzima *wild-type*, ao passo que não houve alteração para a doxorubicina. Assim sendo reduções na atividade metabólica para as duas antraciclinas pela variante V88I e na afinidade de substrato para a daunorrubicina pela variante P131S poderão explicar a variabilidade nos efeitos secundários graves observados em doentes com cancro tratados com qualquer uma destas antraciclinas.

Estes investigadores propõem que estes efeitos adversos são o resultado da acumulação excessiva de fármaco. Uma quantidade crescente de estudos mostrou que

este acumula-se nas mitocôndrias de cardiomiócitos e interferem com a função da enzima da cadeia de transporte de eletrões.

O papel fundamental de CBR1 na patogénese da cardiotoxicidade relacionada com antraciclina tem sido estudada em modelos animais. A sobre-expressão de CBR1, no coração de ratinhos revelou elevados níveis intracardíacos de doxorubicinol e aumento de lesão no miocárdio após a administração de doxorubicina (Gonzalez-Covarrubias, V. *et al.*, 2007). Olson *et al.* relataram que os níveis plasmáticos de doxorubicinol 4h após a administração de doxorubicina foram 75% maiores em ratinhos com os dois alelos ativos *CBR1* (+/+) do que em heterozigóticos *CBR1* (-/-). Estes autores também observaram que redução global de 40 a 50% nos níveis de CBR1 entre ratinhos *CBR1* (+/-) foi suficiente para conferir uma proteção significativa contra a cardiotoxicidade relacionada com a dose desta antraciclina. Como resultado a percentagem de ratinhos mortos 18 dias após o tratamento com doxorubicina era de 91% para *CBR1* (+/+) *versus* 18% *CBR1* (+/-) (Olson L.E. *et al.*, 2003). Neste contexto, é possível especular que os indivíduos homozigóticos para o genótipo *CBR1* 188 poderão apresentar uma menor velocidade de síntese de doxorubicinol e consequentemente, ter um impacto sobre o risco de cardiotoxicidade associada com o uso de antraciclina (Gonzalez-Covarrubias, V. *et al.*, 2007). Recentemente, um estudo desenvolvido Varatharajan *et al.*, pretenderam avaliar o papel da expressão das enzimas *CBR1* e *CBR3* na citotoxicidade *in vitro* da daunorubicina e de que modo polimorfismos nestes dois genes influenciam a farmacocinética deste fármaco e do seu metabolito, em 104 doentes adultos de origem asiática com LMA, recebendo quimioterapia de indução com daunorubicina em combinação com citarabina. Estes investigadores observaram que estes doentes apresentavam uma expressão de ARNm *CBR1* significativamente maior comparativamente a *CBR3*.

No ensaio de citotoxicidade *in vitro*, Varatharajan *et al* observaram que o “*half maximal inhibitory concentration*” (IC50) deste fármaco nas amostras de células leucémicas foi de 0,01 a 3,2 µM, ou seja estas células foram sensíveis ao fármaco (as amostras foram classificadas como sensíveis (IC50 <0.5 µM), sensibilidade intermédia (IC50 0.5 – 1.0 µM) ou resistentes (IC50 > 1.0 µM)).

A expressão de ARNm *CBR1* foi comparada com a citotoxicidade *in vitro* da daunorubicina entre amostras de células leucémicas, classificadas como sensíveis, de sensibilidade intermédia e resistentes, de acordo com o valor de IC50. Os investigadores

observaram que os níveis de *CBR1* foram significativamente maiores em amostras de células resistentes comparativamente a amostras sensíveis a este fármaco ($P= 0,0158$), sugerindo que a expressão mais elevada de *CBR1* confere *in vitro* uma quimioresistência para a daunorrubicina. A expressão de ARNm *CBR3* não foi associada com a citotoxicidade da daunorrubicina *in vitro*. Tal resultado poderá dever-se ao facto de que entre as enzimas envolvidas na redução da daunorrubicina, *CBR1* é a mais eficiente e portanto um aumento da expressão desta poderá contribuir para a ocorrência de resistência por aumento da conversão para o seu metabolito, daunorrubicinol, tal como foi observado neste estudo.

Segundo os autores, uma correlação positiva significativa entre a expressão de *CBR1* e os níveis de daunorrubicinol intracelular ($P <0,0001$), foi também observado que o aumento da conversão da daunorrubicina para o seu metabolito é um dos factores que afecta a citotoxicidade da daunorrubicina, diminuindo a sua eficácia.

De todos os polimorfismos avaliados em *CBR1* e *CBR3* apenas o rs20571 em *CBR1* mostrou uma associação significativa com IC50 ($P=0,04$). Ao contrário dos níveis intracelulares de daunorrubicinol, as concentrações plasmáticas do metabolito não mostraram qualquer associação significativa relativamente à expressão de *CBR1* ou *CBR3*. No entanto, em doentes portadores do alelo 312C do polimorfismo G312G> C, os níveis de daunorrubicina plasmática foram mais elevados e a sua eliminação do organismo foi menor comparativamente ao genótipo *wild-type*, ainda que esta associação não tenha tido significado estatístico ($P = 0,178$ e $P=0,2839$ para a AUC de daunorrubicina e depuração plasmática, respetivamente). Este último resultado foi consistente com aqueles obtidos em estudos prévios com doentes asiáticos com cancro da mama, pelo que mais estudos serão necessários para confirmar esta associação. A inibição da *CBR1* poderá ser uma opção para melhorar a eficácia do tratamento bem como prevenir a ocorrência de efeitos adversos (Varatharajan, S. *et al.*, 2012).

Em qualquer dos casos, para este grupo de fármacos, os estudos acerca do papel da variabilidade genética na sua farmacologia são ainda relativamente recentes e os resultados existentes permanecem inconsistentes. No entanto, a confirmar-se esta associação, estes genes poderão vir a ser clinicamente útil como biomarcadores genéticos para orientar a terapêutica em doentes com cancro assim como minimizar os efeitos adversos (Varatharajan, S. *et al.*, 2012; Visscher, H. *et al.*, 2012).

Conclusão

A farmacogenómica é uma área promissora e com grande potencial para melhorar a utilização de fármacos antileucémicos. Claramente aceite pela comunidade científica, os polimorfismos apresentam-se como elementos chave na relação dos fatores genéticos individuais com a eficácia deste tipo de fármacos. A presença de determinados polimorfismos genéticos pode ajudar a prever a resposta do indivíduo à terapêutica, aumentando assim tanto a sua eficácia como a sua segurança, levando à possibilidade de prever e evitar possíveis falhas terapêuticas ou até graves reações adversas, e assim conduzir, deste modo, a uma melhor seleção e individualização do tratamento.

Existem fortes expectativas de que as pesquisas atuais consigam pavimentar um caminho para que decisões terapêuticas futuras possam ser amplamente orientadas pela farmacogenómica. No entanto, apesar de todo o conhecimento existente, ainda estamos longe da sua utilização generalizada na prática clínica.

Como se pôde observar ao longo deste trabalho, os estudos realizados nos últimos anos na área das leucemias agudas não produziram conhecimento suficiente para a sua aplicação na prática clínica, com a exceção do modelo farmacogenético mais conhecido, a variação polimórfica no gene *TPMT*. Além deste, os estudos realizados em outros genes alvo, de importância no campo da farmacogenómica, apresentaram resultados contraditórios. Entre as causas subjacentes a estas discrepâncias poderão estar outros polimorfismos em genes das mesmas vias metabólicas, os tamanhos das *cohorts* e tempo de *follow-up* destes doentes, diferentes protocolos de quimioterapia além de outros fatores não genéticos.

Assim, além de ser necessária a realização de novos estudos de forma a colmatar estas limitações, torna-se indispensável abrir o espectro dos mesmos aos restantes fármacos usados no tratamento das leucemias agudas.

Referências bibliográficas

- Adam de Beaumais, T., and Jacqz-Aigrain, E. (2012). Pharmacogenetic determinants of mercaptopurine disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur. J. Clin.Pharmacol.* 68, 1233–1242.
- Al-Shakfa, F., Dulucq, S., Brukner, I., Milacic, I., Ansari, M., Beaulieu, P. et al. (2009). DNA Variants in Region for Noncoding Interfering Transcript of Dihydrofolate Reductase Gene and Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin. Cancer Res*; 15(22):6931-8
- Alves, S., Ferreira, F., Amorim, A. and Prata, M.J. (2000). Screening of Thiopurine S-methyltransferase mutations by horizontal conformation-sensitive gel electrophoresis. *Human Mutation* 15:246-253.
- Alves, S., Rocha, J., Amorim, A. and Prata, M.J. (2004). Tracing the Origin of the Most Common Thiopurine Methyltransferase (TPMT) Variants: Preliminary Data from the Patterns of Haplotypic Association with Two CA Repeats. *Annals of Human Genetics* 68,313–323.
- Antica, M. (Ed.). *Acute Leukemia - The Scientist's Perspective and Challenge*. In Tech, 2011. Capítulo 1: 3-16.
- Aplenc, R., Thompson, J., Han, P., La, M., Zhao,H., Lange, B. et al. (2005). Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Therapy Response in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res* 65:2482-2487.
- Ban, H., Andoh, A., Imaeda, H., Kobori, A., Bamba, S., Tsujikawa, T., et al. (2010). The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J.Gastroenterol.* 45, 1014–1021.
- Baslund, B., Gregers, J. and Nielsen, C.H. (2008). Reduced folate carrier polymorphism determines methotrexate uptake by B cells and CD4⁺T cells. *Rheumatology* (Oxford). 47(4):451-453.

- Bains, O.S., Karkling, M.J., Grigliatti, T.A., Reid, R.E. and Riggs, K.W. (2009). Two Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms of Human Carbonyl Reductase 1 Demonstrate Reduced in Vitro Metabolism of Daunorubicin and Doxorubicin. *Drug Metabolism and Disposition* Vol. 37, No.5.
- Blume, S.W., Meng, Z., Shrestha, K., Snyder, R.C. and Emanuel, P.D. (2003). The 5' -untranslated RNA of the human dhfr minor transcript alters transcription pre-initiation complex assembly at the major (core) promoter. *J. Cell Biochem.* 88:165 – 80.
- Banklau, C., Jindadamrongwech, S., Sawangpanich, R., Apibal, S., Hongeng, S., Paisooksantivatana, K., et al. (2010). Effect of genetic alterations of cytarabine-metabolizing enzymes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* 3, 103–108.
- Belson, M., Kingsley, B. and Holmes, A. (2007). Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environ. Health Perspect.* 115:138–145.
- Bhatla, D., Gerbing, R. B., Alonzo, T. A., Conner, H., Ross, J. A., Meshinchi, S., et al. (2009). Cytidine deaminase genotype and toxicity of cytosine arabinoside therapy in children with acute myeloid leukemia. *Br. J.Haematol.* 144, 388 – 394.
- Bray, J., Sludden, J., Griffin, M. J., Cole, M., Verrill, M., Jamieson, D., et al. (2010). Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br. J.Cancer* 102, 1003 – 1009.
- Brunton, L.L., Lazo, J.S., and Parker, K.L. (Eds.). Goodman & Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics. Editora McGraw-Hill, 2007, 1ª Edição. Capítulo 51: 853-889.
- Cai, J., Damaraju, V.L., Groulx, N., Mowles, D., Peng, Y., Robins, M.J. et al. (2008). Two Distinct Molecular Mechanisms Underlying Cytarabine Resistance in Human Leukemic Cells. *Cancer Res* 68:2349-2357.
- Chang, H., Salma, F., Yi, Q-L., Patterson, B., Bien, B., Minden MD., (2004). Prognostic relevance immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 28: 43-8
- Chatzidakis, K., Goulas, A., Athanassiadou-Piperopoulou, F., Fidani, L., Kolioukas, D., and Mirtsou, V. (2006). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism: association with risk for childhood acute lymphoblastic and response during the initial phase of chemotherapy in greek patients. *Pediatr. Blood Cancer* 47, 147–151.

- Cheok, M., Lugthart, S. and Evans, W.E. (2006a). Pharmacogenomics of acute leukemia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:317-53.
- Cheok, M. & Evans, W.E. (2006b). Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 6, 117-129.
- Costea, I., Moghrabi, A. and Krajcinovic, M. (2003). The influence of cyclin D1 (CCND1) 870A>G polymorphism and CCND1-thymidylate synthase (TS) gene-gene interaction on the outcome of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics* 13(9), 577-80.
- Crabb, D.W., Matsumoto, M., Chang, D. and You, M. (2004). Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proceedings of the Nutrition Society* 63, 49–63.
- De Jonge, R., Hooijberg, J.H., van Zelst, B., Jansen, G., van Zantwijk, C., Kaspers, G. et al. (2005). Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 106:717-720.
- Dennison, J. B., Kulanthaivel, P., Barbuch, R. J., Renbarger, J. L., Ehlhardt, W. J., and Hall, S. D. (2006). Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. *Drug Metab. Dispos.* 34, 1317 – 1327.
- Deschler, B. & Lübbert, M. (2006) Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Cancer* 107: 2099–107.
- Donnan, J., Ungar, W.J., Mathews, M., Hancock-Howard, R. and Rahman, P. (2011). A cost effectiveness analysis of thiopurine methyltransferase testing for guiding 6-mercaptopurine dosing in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 57: 231-239.
- Dulucq, S., St-Onge, G., Gagné, V., Ansari, M., Sinnett, D., Labuda, D. (2008). DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood.* 111:3692-3700.
- D'Angelo, V., Ramaglia, M., Iannotta, A., Crisci, S., Indolfi, P., Francese, M., et al. (2011). Methotrexate toxicity and efficacy during the consolidation phase in paediatric acute lymphoblastic leukaemia and MTHFR polymorphisms as pharmacogenetic determinants. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68, 1339–1346.
- Evans, W.E. (2004). Pharmacogenetics of Thiopurine S-Methyltransferase and Thiopurine Therapy. *Ther. Drug Monit.* 26:186– 191.

- Fauci, A., Longo, D.L., Kasper, D., Jameson, J., Hauser, S., Loscalzo, J. and Braunwald, E. (Eds.). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Editora McGraw-Hill, 2008, 17ª Edição. Capítulo 104: 677-693
- Fukuda, Y. & Schuetz, J.D. (2012). ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochemical Pharmacology*, Volume 83, Issue 8; Pages 1073-1083.
- Galmarini C.M., Thomas, X., Calvo, F., Rousselot, P., Jafaari, A.E., Cros, E., et al. (2002a). Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients. *Leuk Res* 26: 621 – 629
- Galmarini, C.M., Thomas, X., Calvo, F., Rousselot, P., Rabilloud, M., El Jaffari, A., et al. (2002b). In vivo mechanisms of resistance to cytarabine in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 117: 860 – 868.
- Gervasini, G. (2009). Polymorphisms in methotrexate pathways: what is clinically relevant, what is not, and what is promising. *Curr. Drug Metab.* Vol.10, 547–566.
- Gervasini, G. & Vagace, J.M. (2012). Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and Pharmacogenomics* Vol.3, artigo 249.
- Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J. and Sarkadi, B. (2004). The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism, and Toxicity. *Current Drug Delivery*, Vol. 1, No. 1.
- Gonzalez-Covarrubias, V., Ghosh, D., Lakhman, S. S., Pendyala, L. and Blanco, J.G. (2007). A functional genetic polymorphism on human carbonyl reductase 1 (CBR1 V88I) impacts on catalytic activity and NADPH binding affinity. *Drug Metab. Dispos.* 35, 973–980.
- Green, H., Falk, I.J., Lotfi, K., Paul, E., Hermansson, M., Rosenquist, R. et al. (2012). Association of ABCB1 polymorphisms with survival and in vitro cytotoxicity in de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *The Pharmacogenomics Journal* (12), 2, 111-118.
- Gregers, J., Christensen, I., Dalhoff, K., Lausen, B., Schroeder, H., Rosthøj, S. (2010). The association of reduced folate carrier 80G >A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood* 115(23):4671-4677.

- Hartford, C. M., Duan, S., Delaney, S. M., Mi, S., Kistner, E. O., Lamba, J. K., et al. (2009). Population-specific genetic variants important in susceptibility to cytarabine arabinoside cytotoxicity. *Blood* 113, 2145–2153.
- Hartman, A., Van Schaik, R. H., Van Der Heiden, I.P., Broekhuis, M. J., Meier, M., Den Boer, M. L., et al. (2010). Polymorphisms in genes involved in vincristine pharmacokinetics or pharmacodynamics are not related to impaired motor performance in children with leukemia. *Leuk. Res.* 34, 154–159.
- Hawwa, A. F., Millership, J. S., Collier, P. S., Vandenbroeck, K., Mccarthy, A., Dempsey, S., et al. (2008). Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 66, 517–528.
- He, L., Vasiliou, K. and Nebert, D.W. (2009) .Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Human Genomics* Vol3. No 2. 195–206.
- Heller, T., Oellerich, M., Armstrong, V. W., and Von Ahsen, N. (2004). Rapid detection of ITPA 94C > A and IVS2 + 21A > C gene mutations by real-time fluorescence PCR and in vitro demonstration of effect of ITPA IVS2 + 21A > C polymorphism on splicing efficiency. *Clin. Chem.* 50, 2182–2184.
- Hodges, L., Markova, S., Chinn, L.W., Gow, J.N., Kroetz, D.L., Klein, T. et al. (2011). Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics* 21 (3): 152– 161.
- Hoffman, R., Benz, E., Shattil, S., Furie, B., Silberstein, L. and McGlave, P. *Hoffman: Hematology: Basic Principles and Practice*. Editora Churchill Livingstone –Elsevier, 2009, 5ª Edição, Capítulos 59- 66.
- Huang, L., Tissing, W. J., De Jonge, R., Van Zelst, B. D., and Pieters, R. (2008). Polymorphisms in folate-related genes: association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22, 1798–1800.
- Hubeek, I., Stam, R.W., Peters, G.P., Broekhuizen, R., Meijerink, J.P.P., van Wering, E.R. (2005). The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *British Journal of Cancer* 93, 1388 – 1394.
- Illmer, T., Schuler, U.S., Thiede, C., Schwarz, U.I., Kim, R.B., Gotthard, S. et al. (2002). MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res* 62: 4955-62.

- Imanishi, H., Okamura, N., Yagi, M., Noro, Y., Moriya, Y., Nakamura, T., et al. (2007). Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. *J. Hum Genet.* 52, 166–171.
- Infante-Rivard, C., Labuda, D., Krajcinovic, M. and Sinnett, D. (1999). Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. *Epidemiology* 10:481–487.
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S., Gomez, A. and Rodriguez-Antona, C. (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics* 116:496 – 526.
- Innocenti, F., Cox, N. and Dolan, M.E. (2011). Use of genomic information to optimize cancer chemotherapy. *Semin Oncol.* 38(2): 186–195.
- Instituto Português de Oncologia do Porto- Registo Oncológico 2010. Disponível em <http://ipporto.pt/>. Acedido em 25 de Fevereiro de 2013.
- International Agency for Research on Cancer - GLOBOCAN project 2008. Disponível em <http://globocan.iarc.fr>. Acedido a 25 de Maio de 2013.
- International Agency for Research on Cancer – EUCAN. Disponível em <http://eco.iarc.fr/EUCAN/Country.aspx?ISOCountryCd=620#block-pie-m>. Acedido a 25 de Maio de 2013.
- Jancova, P., Anzenbacher, P. and Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 154(2):103–116.
- Jamieson, D. and Boddy, A. V. (2010). Pharmacogenetics of genes across the doxorubicin pathway. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7, 1201–1210.
- Kager, L., (2009). Pharmacogenomics to improve childhood acute lymphoblastic leukaemia therapy. *Magazine of European Medical Oncology* Vol. 2: 65–70.
- Kalliokoski, A. and Niemi, M. (2009) Review- Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *British Journal of Pharmacology* 158, 693–705.
- Kantar, M., Kosova, B., Cetingul, N., Gumus, S., Toroslu, E., Zafer, N., et al. (2009). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene polymorphisms and therapy-related toxicity in children treated for acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 50, 912–917.

- Karas Kuzelicki, N., Milek, M., Jazbec, J. and Mlinaric-Rascan, I., (2009). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) low activity genotypes reduce the risk of relapse-related acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk. Res.* 33(10), 1344-8.
- Kassner, N., Huse, K., Martin, H.J., Gödtel-Armbrust, U., Metzger, A., Meineke, I. et al. (2008). Carbonyl Reductase 1 Is a Predominant Doxorubicin Reductase in the Human Liver. *Drug Metabolism and Disposition* Vol. 36 No. 10. 2113–2120.
- Kim, D.H., Park, J.Y., Sohn, S.K., Lee, N.Y., Baek, J.H., Jeon, S.B. et al. (2006). Multidrug resistance-1 gene polymorphisms associated with treatment outcomes in de novo acute myeloid leukemia. *Int J Cancer* 118: 2195-201.
- Kim, H., Kang, H.J., Kim, H.J., Jang, M.K., Kim, N.H., Oh, Y. et al. (2012). Pharmacogenetic Analysis of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Possible association between Survival Rate and ITPA Polymorphism. *Plos One* Vol. 7; issue 9: e45558.
- Kishi, S., Cheng, C., French, D., Pei, D., Das, S., Cook, E. H., et al. (2007). Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood* 109, 4151–4157.
- Krajcinovic, M., Costea, I., Primeau, M., Dulucq, S., Moghrabi, A., (2005). Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. *The Pharmacogenomics Journal* 5, 374–380.
- Lal, S., Mahajan, A., Chen, W. N., and Chowbay, B. (2010). Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. *Curr. Drug Metab.* 11, 115–128.
- Lamba, J.K. (2009). Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics* 10 (10): 1657–1674.
- Laverdière, C., Chiasson, S., Costea, I., Moghrabi, A. and Krajcinovic, M. (2002). Polymorphism 80G> A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*; 100: 3832-3834.
- Lennard, L. and Lilleyman, J. S. (1996). Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Ther. Drug Monit.* 18, 328–334.

- Lin, T., Islam, O. and Heese, K. (2006). ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis – a different perspective. *Cell Research* 16: 857-87.
- Locher, K.P. (2009). Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364, 239 – 245.
- Ma, X., Buffler, P., Gunier, R., Dahl, G., Smith, M., Reinier, K. et al. (2002). Critical Windows of Exposure to Household Pesticides and Risk of Childhood Leukemia. *Environ. Health Perspect.* 110: 955– 960.
- Mahlkecht, U., Dransfeld, C.L., Bulut, N., Kramer, M., Thiede, C., Ehninger, G. et al. (2009). SNP analyses in cytarabine metabolizing enzymes in AML patients and their impact on treatment response and patient survival: identification of CDA SNP C-451T as an independent prognostic parameter for survival. *Leukemia* 23, 1929–1932.
- Martianov, I., Ramadass, A., Serra Barros, A., Chow, N. and Akoulitchev, A. (2007). Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* 445:666 – 70.
- Meeker, N.D., Yang, J. & Schiffman, J. (2010). Pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin. Pharmacother.* 11(10).
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. and Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* Vol. 56, No. 2. 185–229.
- Mikkelsen, T.S., Thorn, C.F., Yang, J.J., Ulrich, C.M., French, D., Zara, G. et al. (2011). PharmGKB summary: methotrexate pathway. *Pharmacogenet Genomics.* 21 (10):679-86.
- Moore, A., and Pinkerton, R. (2009). Vincristine: can its therapeutic index? Be enhanced? *Pediatr. Blood Cancer* 53, 1180–1187.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Guidelines in Oncology- Acute Lymphoblastic Leukemia, version 1.2012. Disponível em http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site. Acedido em 12 de Março de 2013.

- National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Guidelines in Oncology- Acute Myeloid Leukemia, version 2.2011. Disponível em http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site. Acedido em 12 de Março de 2013.
- News Medical. Disponível em (<http://www.news-medical.net/health/Acute-Myeloid-Leukemia-History.aspx>). Acedido a 13 de Maio de 2013.
- Olson, L.E., Bedja, D., Alvey, S.J., Cardounel, A.J., Gabrielson, K.L., Reeves, R.H. et al. (2003). Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1. *Cancer Res* 63:6602–6606.
- Ongaro, A., De Mattei, M., Della Porta, M.G., Rigolin, G., Ambrosio, C., Di Raimondo, F., et al. (2009). Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematologica* 94, 1391–1398.
- Osato, D.H., Huang, C.C., Kawamoto, M., et al. (2003). Functional characterization in yeast of genetic variants in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT1. *Pharmacogenetics* 13:297–301.
- Pakakasama, S., Kanchanakamhaeng, K., Kajanachumpol, S., Udomsubpayakul, U., Sirachainan, N. and Thithapandha, A. (2007). Genetic polymorphisms of folate metabolic enzymes and toxicities of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 86:609 – 611.
- Pinto, N., Ludeman, S.M. and Dolan, M.E. (2009). Pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy. *Pharmacogenomics* 10(12), 1897-1903.
- Plasschaert, S. L., Groninger, E., Boezen, M., Kema, I., De Vries, E. G., Uges, D., et al. (2004). Influence of functional polymorphisms of the MDR1 gene on vincristine pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 76, 220–229.
- Preissner, S., Kroll, K., Dunkel, M., Senger, C., Goldsobel, G., Daniel Kuzman et al. (2010). SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. *Nucleic Acids Research*, Vol. 38, Database issue D237–D243.
- Pui, C.H., Relling, M. V., and Downing, J.R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 350, 1535 – 1548.

- Pui, C-H. (Ed.). *Childhood leukemias*. Editora Cambridge University Press, 2012, 3ª Edição. Parte 1, Capítulo 1: 3-18.
- Relling, M.V., Gardner, E.E., Sandborn, W.J., Schmiegelow, K., Pui, C-H., Yee, S.W (2011). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* doi:10.1038/clpt.2010.320.
- Relling, M.V., Gardner, E.E., Sandborn, W.J., Schmiegelow, K., Pui, C-H., Yee, S.W (2012). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and thiopurine dosing - Supplemental Material.
- Renbarger, J.L., McCammack, K.C., Rouse, C.E. and Hall, S. D. (2008). Effect of Race on Vincristine-Associated Neurotoxicity in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Pediatr. Blood Cancer*; 50:769–771
- Schaefer, M., Roots, I. and Gerloff, T. (2006) In-vitro transport characteristics discriminate wild-type ABCB1 (MDR1) from ALA893SER and ALA893THR polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 16: 855-61.
- Russo, R., Capasso, M., Paolucci, P., Iolascon, A., (2011). Pediatric pharmacogenetic and pharmacogenomic studies: the current state and future perspectives. *Eur J Clin Pharmacol* 67 (Suppl 1):S17 – S27.
- Savonarola, A., Palmirotta, R., Guadagni, F. and Silvestris, F., (2012). Pharmacogenetics and pharmacogenomics: role of mutational analysis in anti-cancer targeted therapy. *Pharmacogenomics J.* 12:277–286.
- Schroder, J.K., Kirch, C., Seeber, S. and Schutte, J. (1998). Structural and functional analysis of the cytidine deaminase gene in patients with acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1998; 103:1096–1103.
- Schmiegelow, K., Vestergaard, T., Nielsen, S.M., and Hjalgrim, H. (2008). Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: the adrenal hypothesis, *Leukemia* 22, 2137–2141.
- Sugimoto, H. & Shiro, Y. (2012). Diversity and Substrate Specificity in the Structures of Steroidogenic Cytochrome P450 Enzymes. *Biol. Pharm. Bull.* 35(6) 818–823.
- Roberts, R.L., Gearry, R.B., Bland, M.V., Sies, C.W., George, P.M., Burt, M. et al. (2008). Trinucleotides repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. *Pharmacogenet Genomics.* 18:434–438.

- Rocha, V., Porcher, R., Fernandes, J. F., Filion, A., Bittencourt, H., Silva, W. Jr., et al. (2009). Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for patients with leukemia. *Leukemia* 23, 545–556.
- Rowe, J. & Goldstone, A. (2007). How I treat acute lymphocytic leukemia in adults. *Blood* 110: 2268-2275.
- Stanulla, M., Schaeffeler, E., Flohr, T., Cario G., Schrauder, A., Zimmermann, M., et al. (2005). Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA* 293, 1485–1489.
- Stocco G., Cheok, M. H., Crews, K.R., Dervieux, T., French, D., Pei, D., et al. (2009). Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 85, 164–172.
- Tai, H.L., Krynetski, E.Y., Yates, C.R., Loennechen, T., Fessing, M.Y., Krynetskaia, N.F. et al. (1996). Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet.* 58:694–702.
- Taub, J.W., Matherly, L.H., Ravindranah, Y., Kaspers, G-JL., Rots, M.G. and van Zantwijk, C.H. (2002). Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methotrexate sensitivity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 16, 764 – 765.
- The Pharmacogenomics Knowledgebase - Vinka Alkaloid Pathway and Pharmacokinetics. Disponível em <http://www.pharmgkb.org/pathway/PA150981002>. Acedido em 15 de Julho de 2013.
- Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E. et al. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 21(7): 440–446.
- Treviño, L.R., Shimasaki, N., Yang, W., Panetta, J.C., Cheng, C., Pei, D. (2009). Germline Genetic Variation in an Organic Anion Transporter Polypeptide Associated With Methotrexate Pharmacokinetics and Clinical Effects. *J Clin Oncol* 27:5972-5978.
- Van der Holt, B., Van den Heuvel-Eibrink, M.M., Van Schaik, R.H., van der Heiden I.P., Wiemer, E.A., Vossebeld, P.J. et al. (2006). ABCB1 gene

polymorphisms are not associated with treatment outcome in elderly acute myeloid leukemia patients. *Clin Pharmacol Ther* 80: 427-39.

- Varatharajan, S., Abraham, A., Zhang, W., Shaji, R. V., Ahmed, R., Abraham, et al. (2012). Carbonyl reductase 1 expression influences daunorubicin metabolism in acute myeloid leukemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* doi: 10.1007/s00228-012-1291-9.
- Visscher, H., Ross, C., Rassekh, S., Barhdadi, A., Dubé, AP., Al-Saloos, H. et al. (2012). Pharmacogenomic Prediction of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Children. *J Clin Oncol* 30:1422-1428.
- Walter, R., Othus, M., Burnett, A.K., Löwenberg, B., Kantarjian, H., Ossenkoppele, G. et al. (2013). Significance of FAB subclassification of “acute myeloid leukemia, NOS” in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood*. 121(13):2424-2431.
- Wan Rosalina, W.R., Teh, L.K., Mohamad, N., Nasir, A., Yusuf, R., Baba, A. A., et al. (2011). Polymorphism of *ITPA* 94C > A and risk of adverse effects among patient with acute lymphoblastic leukaemia treated with 6-mercaptopurine. *J. Clin. Pharm. Ther.* 37, 237–241.
- Wang, J.F., Zhang, C.C., Chou, K.C. and Wei, D.Q. (2009). Structure of cytochrome p450s and personalized drug. *Curr. Med. Chem.* 16(2):232-44.
- Wang, L., Pelleymounter, L., Weinshilboum, R., Johnson, J., J Hebert, J., R. et al. (2010). Very important pharmacogene summary: thiopurine S-methyltransferase. *Pharmacogenet Genomics* 20(6): 401–405.
- Wartenberg, D., Groves, F. and Adelman, A.S. (2008). Acute Lymphoblastic Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Acute Leukemias- Hematologic Malignancies*, pp 77-93.
- Weinshilboum, R. & Wang, L. (2004). Pharmacogenomics: bench to bedside. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 739-748.
- Whetstone, J.R., Gifford, A.J., Witt, T., Liu, X.Y., Flatley, R.M., Norris, M. (2001). Single Nucleotide Polymorphisms in the Human Reduced Folate Carrier: Characterization of a High-Frequency G/A Variant at Position 80 and Transport Properties of the His and Arg Carriers. *Clinical Cancer Research* Vol. 7, 3416 – 3422.
- Wilson, A., Platt, R., Wu, Q., Leclerc, D., Christensen, B., Yang, H., et al. (1999). A common variant in methionine synthase reductase combined with low

cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol. Genet. Metab.* 67(4), 317-23.

- World Health Organization (WHO) - Incidence of Childhood Leukaemia. Disponível em <http://www.who.int/en/>. Acedido a 30 de Maio de 2013.
- World Health Organization (WHO) - 18th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines: Review of medicines for the treatment of common tumours in children. Disponível em <http://www.who.int/en/>. Acedido a 15 de Junho de 2013.
- Xu, P. P., Chen, B. A., Feng, J. F., Cheng, L., Xia, G. H., Li, Y. F., et al. (2012). Association of polymorphisms of cytosine arabinoside-metabolizing enzyme gene with therapeutic efficacy for acute myeloid leukemia. *Chin. Med. J. (Engl.)* 125, 2137– 2143.
- Yang, L., Hu, X., and Xu, L. (2012). Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 33, 1445–1454.
- Yano, J.K., Wester, M.R., Schoch, G.A., Griffin, K.J., Stout, C.D. and Johnson, E.F. (2004). The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 determined by X-ray Crystallography to 2.05 Å Resolution. *J. Biol. Chem.* 279(37):38091-4.
- Zara, G., Cheok, M., Krynetskaia, N., Thorn, C., Stocco, G., Hebert, J.M. (2010). Thiopurine pathway. *Pharmacogenet Genomics.* 20(9):573-4
- Zika, E., Gurwitz, D. and Ibarreta, D. (2006). Pharmacogenetics and Pharmacogenomics: State-of-the-art and Potential Socio-economic Impact in the EU. *Scientific and Technical Research series*, EUR 22214 EN.

Anexo A

	LMA - M0	LMA -M1	LMA -M2	LMA -M3	LMA - M4	LMA - M5	LMA - M6	LMA - M7
Morfologia	<p>Blastos pequenos e muito pouco diferenciados. Apresentam nucléolos múltiplos e grânulos azurófilos citoplasmáticos. A cromatina nuclear é finamente granular. Não são encontrados bastonetes de Auer.</p>	<p>Mieloblastos pouco diferenciados. Bastonetes de Auer são encontrados em aproximadamente 50% dos casos. (Se não existirem evidências de bastonetes de Auer os blastos podem assemelhar-se LLA-L2. Se as reações de mieloperoxidase ou <i>Sudan Black</i> forem positivas em mais de 3% de blastos o diagnóstico mais provável é uma LMA-M1).</p>	<p>Mieloblastos são o tipo de células predominante assim como neutrófilos hipogranulares A característica que permite diferenciar LMA-M2 da LMA-M1 é a presença de maturação igual ou além do estágio promielocítico. Os neutrófilos poderão apresentar bastonetes de Auer.</p>	<p>Os blastos são grandes, com citoplasma abundante e o núcleo, geralmente, bilobado ou marcadamente recortado podendo apresentar nucléolos em cada lobo. O citoplasma é abundante apresentando grandes quantidades de grânulos de coloração roxa ou vermelha. Bastonetes de Auer podem ser observados em alguns casos. A forma variante de LMA-M3 é caracterizada pela escassez de grânulos dentro dos blastos promielocíticos.</p>	<p>Distingue-se de M1, M2 e M3 pela proporção aumentada de células monocíticas leucêmicas na medula óssea e/ou sangue. Alguns casos de LM-M4 são caracterizados por um aumento de eosinófilos e classificados como M4e.</p>	<p>Um critério de diagnóstico da LMA-M5 é que $\geq 80\%$ de todas as células não eritroides na medula óssea sejam células monocíticas. Existem duas formas distintas de M5: M5a (granulócitos $<20\%$ e monócito $s > 80\%$, $> 80\%$ monoblastos. M5b granulócitos $<20\%$ e monócitos $> 80\%$, $<80\%$ monoblastos.</p>	<p>O diagnóstico da eritroleucemia pode ser feita, quando mais de 50% de todas as células da medula óssea nucleadas são da linha eritroide. Os eritroblastos apresentam características morfológicas bizarras: formas multilobular ou multinucleadas são comuns. É observada anemia com poiquilocitose e anisocitose no sangue periférico.</p>	<p>Sangue periférico revela micromegacariócitos e blastos indiferenciados. A biopsia da medula óssea mostra um aumento de fibroblastos e / ou aumento da reticulina bem como a presença de mais do que 30% de células blásticas. Estas apresentam protusões citoplasmáticas.</p>

Imunofenotipagem	Blastos positivos para os marcadores mieloides CD13, 14, 15 ou CD33 e 34 e negativos para os marcadores linfoides (T ou B), CD3, 10, 19 e 5.	Blastos positivos para os marcadores mieloides CD13, 14, 15, 33 e CD34.	Blastos positivos para os marcadores mieloides CD13 e CD15.	Blastos positivos para os marcadores mieloides CD13, CD15, CD1 e CD33. M3 com a t (15;17) é caracterizado pela associação de marcadores linfoides, com marcadores mieloides e negatividade para HLA-DR e CD34.	Blastos positivos para os marcadores CD13, CD33, CD11b e CD14.	Blastos positivos para os marcadores CD11b e CD14.	Blastos expressam CD13, CD33 e anti-MPO. Nas formas variantes de LMA-M6, as células mais diferenciadas podem ser detetadas pela expressão de glicoforina A e ausência de marcadores mieloides.	Blastos positivos para os marcadores CD41, CD42 e CD61.
Citoquímica	Peroxidase e <i>Sudan black</i> positivos para M0-M4. Estearase não-específica negativa para M2 e fracamente positiva para M3. Esterase específica e não específica positiva para M4.					Peroxidase e <i>Sudan black</i> têm pouca atividade em monoblastos	Eritroblastos, especialmente pronormoblastos são PAS positivos	Peroxidase negativa. Fosfatase ácida positiva
Citogenética		t (9; 22) (q34; q11)	t (8;21)	t (15;17)	Inv (16) (p13, q22) e del (16) (q22)	Translocações ou deleções na banda 11q23		Não existe uma única alteração cromossômica associada com a LMA-M7 com exceção de t (1, 22) (p13; q13), encontrado quase exclusivamente em crianças com menos de 18 meses de idade.

Anexo B

(Adaptado de Relling, M. *et al.* 2011)

Associação entre o genótipo de <i>TPMT</i> e resposta à terapêutica com tiopurinas			
Tipo de estudo experimental (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> pré-clínico ou clínico)	Principais resultados dos estudos	Referências	¹ Nível de associação
<i>In vitro</i>	A conversão de 6-MP a metilmercaptipurina ausente em eritrócitos humanos, linfócitos, fígado e rins de indivíduos homozigóticos para o alelo variante.	(Szumlanski, C. <i>et al.</i> , 1992)	Elevada
<i>In vitro</i>	Mecanismos de inativação funcional para <i>TPMT</i> *2,*3A, *3B * e * 4 demonstrada pela expressão de variantes alélicas específicas.	(Wang, L. <i>et al.</i> , 2003)	Elevada
Pré-clínico	Ratinhos <i>knock-out</i> para <i>TPMT</i> apresentam uma maior morbidade e mortalidade decorrente da administração de 6-MP e 6-TG comparativamente aos ratinhos com genótipo <i>wild-type</i> ; heterozigotos apresentaram um risco intermédio.	(Hartford, C <i>et al.</i> , 2007)	Elevada
Clínico	Doentes com LLA com genótipo <i>wild-type</i> apresentaram um maior risco de recaída hematológica do que aqueles com, pelo menos, um alelo variante, particularmente em regimes de quimioterapia que são principalmente à base de 6-MP e 6-TG.	(Lennard, L. <i>et al.</i> , 1990)	Elevada
Clínico	Indivíduos homozigóticos para um alelo variante apresentam mielossupressão com risco de vida, após a administração de doses normais de 6-MP, 6-TG, e azatioprina. A toxicidade poderia ser minimizada com diminuição das doses.	(Sehwab, M. <i>et al.</i> , 2002; Hindorf, V. <i>et al.</i> , 2006; Zelinkova, Z. <i>et al.</i> , 2006; Gearry, R.B. <i>et al.</i> , 2005; Kaskas, B.A. <i>et al.</i> , 2003)	Elevada
Clínico	Aumento do risco de mielossupressão, em doentes heterozigóticos a receberem doses normais de 6-MP.	(Kaskas, B.A. <i>et al.</i> , 2003; Evans, W.E. <i>et al.</i> , 2001)	Elevada

Clínico	Maior nível de doença residual em doentes com LLA com genótipo <i>wild-type</i> comparativamente a heterozigóticos ou homozigóticos para o alelo variante.	(Stanulla, M. <i>et al.</i> , 2005)	Elevada
Clínico	Nenhuma alteração no risco de recaída para doentes heterozigóticos com LLA, os quais receberem menores doses de 6-MP.	(Relling, M.V. <i>et al.</i> , 2006; Sehmiegelow, K. <i>et al.</i> , 2010)	Elevada
Clínico	Nenhum aumento de toxicidade aguda em doentes heterozigóticos em comparação com os doentes homozigóticos para o alelo <i>wild-type</i> com LLA, os quais receberam menores doses de 6-MP.	(Evans, W.E. <i>et al.</i> , 2001; Stocco, G. <i>et al.</i> , 2009)	Moderada
Clínico	Aumento do risco de leucemia secundária em doentes com baixa atividade da TPMT.	(Yenson, P.R. <i>et al.</i> , 2008; Sehmiegelow, K. <i>et al.</i> , 2009)	Elevada
Clínico	Realização da genotipagem de <i>TPMT</i> de modo a prevenir a ocorrência de mielossupressão e a prever a resposta ao tratamento com AZA em doente com CD.	(Gardiner, S J. <i>et al.</i> , 2008; Dubinsky, M.C. <i>et al.</i> , 2005; Regueiro, M. <i>et al.</i> , 2002)	Moderada
Clínico	Realização da genotipagem de <i>TPMT</i> de modo a prevenir a ocorrência de mielossupressão após tratamento com AZA em doentes com RA.	(Corominas, H. <i>et al.</i> , 2003; Marra, C.A. <i>et al.</i> , 2002; Glunie, G.P. <i>et al.</i> , 2004)	Moderada
Clínico	Realização da genotipagem de <i>TPMT</i> de modo a prevenir a ocorrência de mielossupressão após tratamento com AZA em doentes transplantados.	(Formea, C. M. <i>et al.</i> , 2004; Sebbag, L. <i>et al.</i> , 2000)	Moderada

CD: doença de Crohn; ALL: leucemia linfoblástica aguda; AZA: azatioprina RA: artrite reumatóide; IBD: doença inflamatória intestinal; MP: mercaptopurina; TG: tioguanina; TPMT: tiopurina s-metiltransferase.

¹Elevada associação: inclui resultados consistentes em estudos bem conduzidos. Associação moderada: a associação é suficiente para determinar os efeitos, mas a força dessa associação é limitada pelo número, a qualidade ou a consistência dos estudos individuais.