



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

**FARMACOGENÉTICA DO GENE *TPMT* NA RESPOSTA A 6-
MERCAPTOPURINA, EM PACIENTES COM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA.**

Carlos Henrique Vasconcelos de Lima

Belém –PA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

**FARMACOGENÉTICA DO GENE *TPMT* NA RESPOSTA A 6-
MERCAPTOPURINA, EM PACIENTES COM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA.**

Autor: Carlos Henrique Vasconcelos de Lima

Orientador: Prof. Dr. Ney Carneiro Pereira dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Paulo Pimentel Assumpção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas da Universidade Federal do Pará (UFPA), área de concentração Medicina I, do Núcleo de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Belém – PA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB/UFGPA)

Lima, Carlos Henrique Vasconcelos de, 1980-

Farmacogenética do Gene *TPMT* na resposta A 6-Mercaptopurina, em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda / Carlos Henrique Vasconcelos de Lima; Orientador, Prof. Dr. Ney Carneiro Pereira dos Santos. — 2016.

107 f. : il. ; color. : 30 cm.

Inclui bibliografias.

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Pará, Núcleo de Pesquisa em Oncologia, Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2016.

1. Neoplasias. 2. Polimorfismo Genético. 3. Farmacogenética. I. Santos, Ney Carneiro Pereira dos, *orient.* II. Título.

CDD - 23. ed. 616.99419098115

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carlos Henrique Vasconcelos de Lima

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas da Universidade Federal do Pará (UFPA), área de concentração Medicina I, do Núcleo de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Belém (PA), 01 de Março de 2016.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção
(orientador)

Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos
(orientador)

Profa. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos
(avaliadora)

Prof. Dr. André Salim Khayat
(avaliador)

Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno
(avaliadora)

Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos
(suplente)

RESUMO

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o tipo de câncer mais frequente em crianças menores de 15 anos de idade. O 6-mercaptopurina (6-MP) é um dos agentes quimioterápicos mais amplamente utilizado no tratamento da LLA infantil. Polimorfismos no gene Tiopurina s-metiltransferase (*TPMT*) podem estar associados a variações individuais na resposta ao tratamento da LLA infantil, como aumento de toxicidade grave (grau 3 e 4). O objetivo deste trabalho foi associar polimorfismos do gene *TPMT*: *TPMT**2 (238G>C), *TPMT**3A (460G>A e 719A>G), *TPMT**3B (460G>A), *TPMT**3C (719A>G), *TPMT**8 (644G>A) e a variante intrônica rs12201199 (94T>A) com a ocorrência de toxicidades graves em pacientes com LLA tratados com 6-MP, na Região Norte do Brasil. Foram investigados 137 pacientes infantis com LLA tratados no Hospital Ophir Loyola, no estado do Pará. O polimorfismo rs12201199 foi genotipado pela técnica de PCR em tempo Real (equipamento 7500 Real-Time PCR System) e os demais polimorfismos foram genotipados por sequenciamento direto, utilizando o sequenciador automático ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). Os haplótipos entre os polimorfismos investigados foram derivados através de estimativas de máxima verossimilhança utilizando o programa PHASE. Foi empregado um painel de 48 Marcadores Informativos de Ancestralidade, como controle genômico na amostra e as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS v.20.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). Todos os testes estatísticos consideraram a probabilidade (p-valor) significativa quando $\leq 0,05$. Em relação à ascendência genômica, observou-se que a composição étnica dos pacientes com LLA foi de 44% Europeu, 22% Africano e 34% Ameríndio. Entre as toxicidades relatadas, a infecciosa foi a mais prevalente (86%), seguida da hematológica (65%), da gastrointestinal (64,8%) e toxicidade no sistema nervoso central (29,9%). A frequência alélica do polimorfismo rs12201199 foi de 0,482 entre os indivíduos estudados. As variantes haplotípicas mais prevalentes foram *TPMT**3A (7,6%), seguido pelo *TPMT**3C e *TPMT**8, ambos com 7,3%. Não foi observada uma associação significativa entre o perfil de metabolização deficiente da *TPMT* com nenhuma das toxicidades graves relatadas nos pacientes com LLA estudados. No entanto, os dados encontrados mostram que há uma significativa relação entre o polimorfismo do gene *TPMT* (rs12201199) e a ocorrência de toxicidade infecciosa grave durante o tratamento da LLA infantil. Foi observado que os pacientes que possuem o genótipo homozigoto mutante AA para o polimorfismo no gene *TPMT* têm um risco de 4,098 vezes maior de apresentar toxicidade grave infecciosa durante o tratamento para LLA infantil em relação aos que apresentam os outros genótipos. Este resultado pode ser importante para ajudar a prever riscos de toxicidade durante o tratamento, contribuindo para um melhor prognóstico individual dos pacientes com LLA infantil.

Palavras Chave: LLA; Polimorfismo genético; rs12201199; Toxicidades; *TPMT*.

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common type of cancer in children under 15 years of age. 6-mercaptopurine (6-MP) is one of the most widely used chemotherapeutic agents in the treatment of childhood ALL. Polymorphisms in thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) may be associated with individual variation in the response to treatment of childhood ALL, such as increased severe toxicity (grade 3 and 4). The aim of this study was to associate polymorphisms of TPMT gene: *TPMT*2* (238G>C), *TPMT*3A* (460G>A and 719A>G), *TPMT*3B* (460G>A), *TPMT*3C* (719A>G), *TPMT*8* (644G>A) and intronic variant rs12201199 (94T>A) with the occurrence of serious toxicities in patients with ALL treated with 6-MP, in Northern Brazil. One hundred thirty-seven pediatric patients with ALL and treated at the Ophir Loyola Hospital in the state of Pará were investigated. The rs12201199 polymorphism was genotyped by real-time PCR (equipment 7500 Real-Time PCR System) and other polymorphisms were genotyped by direct sequencing using the automated sequencer ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). The haplotypes among the studied polymorphisms were derived via maximum likelihood estimates using the program PHASE. A panel of 48 markers Ancestry Informative was used as genomic control in the sample and statistical analyses were performed using SPSS v.20.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA). All statistical tests considered the probability (p) significant when $\leq 0,05$. In relation to the genomic ancestry, it was noted that the ethnic composition of ALL patients was 44% Caucasian, 22% African and 34% Amerindian. Among the reported toxicities, infectious was most prevalent (86%), followed by hematological (65%), gastrointestinal (64.8%) and central nervous system toxicity (29.9%). Allele frequency of polymorphism rs12201199 was 0.482 among the studied subjects. The most prevalent haplotype variants were *TPMT*3A* (7.6%), followed by *TPMT*3C* and *TPMT*8*, both 7.3%. There was no significant association between poor metabolism profiles of TPMT with none of the serious toxicities reported in the studied patients with LLA. However, our data show that there is a significant relationship between the polymorphism of *TPMT* gene (rs12201199) and the occurrence of severe infectious toxicity during treatment of childhood ALL. It has been observed that patients who have mutant homozygous AA genotype for this polymorphism in *TPMT* gene have 4.098 times higher risk of presenting severe infectious toxicity during the treatment for childhood ALL compared to those with the other genotypes. This result may be important to help predict risk of toxicity during treatment, contributing to a better individual prognosis of patients with childhood ALL.

Keywords: ALL; genetic polymorphism; rs12201199; toxicities; *TPMT*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Capacidades adquiridas das células tumorais durante os múltiplos passos da carcinogênese. Fonte: HANAHAN; WEINBERG, 2011. | 12 |
| Figura 2 – Distribuição percentual da incidência por tipo de câncer infanto-juvenil, Belém e Ananindeua, 1997 a 2001. Fonte: INCA, 2008. | 18 |
| Figura 3 – Taxas e tendências da mortalidade* para leucemia, em menores de 20 anos, de ambos os sexos. Brasil, 1996-2008. | 20 |
| Figura 4 – Subtipos da LLA de acordo com a Classificação da OMS. A Leucemia linfoblástica precursor B. Esfregaço de medula óssea. Vários linfoblastos com uma relação núcleo citoplasma alta e variável e com condensação de cromatina. B Leucemia linfoblástica precursor T. Esfregaço de sangue. Os linfoblastos variam de tamanho em células grandes e pequenas com uma alta relação núcleo citoplasma. Fonte: JAFFE et al., 2001. | 25 |
| Figura 5 – Mecanismo de metabolização do fármaco 6-MP. 1, 2 e 3 evidenciam os passos da via metabólica da 6-MP. IMPD (Inosina monofosfato desitrogenase), TXMP (tioxantina monofosfato), GMPS (Guanosina monofosfato sintase) e TGMP (Tioguanina monofosfato). Fonte: SILVA, 2007. | 38 |
| Figura 6 – Procedência e números de casos por município de pacientes pediátricos portadores de LLA no estado do Pará. Fonte: SILVA et al., 2011. | 41 |
| Figura 7 – Frequência de Toxicidade em pacientes pediátricos portadores de LLA provenientes do estado do Pará. Fonte: SILVA et al., 2011. | 41 |
| Figura 8 – Fármacos aprovados pela FDA referentes a marcadores farmacogenômicos. Fonte: WANG et al., 2011. | 45 |
| Figura 9 – Estrutura química dos fármacos tiopurina. Fonte: Modificado de Zhou (2006). | 46 |
| Figura 10 – Distribuição Populacional da Atividade da enzima TPMT. Indivíduos que apresentam atividade enzimática alta apresentam o genótipo homozigoto selvagem (S/S). Indivíduos que apresentam atividade intermediária apresentam genótipo heterozigoto (S/M). Indivíduos que apresentam atividade enzimática baixa ou indetectável apresentam dois alelos mutantes (M/M). Fonte: RELLING, 2013. | 50 |
| Figura 11 – Variantes alélicas predominantes do locus TPMT. O alelo selvagem TPMT*1 codifica para alta atividade enzimática. Os alelos mutantes TPMT*2, *3A, *3B e *3C codificam para baixa atividade da enzima. Modificado de Reis (2006). ... | 51 |
| Figura 12 – Representação de mistura interétnica individual. | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos novos câncer, segundo sexo e localização primária, no Brasil para 2016. | 14 |
| Tabela 2 – Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos novos câncer, segundo sexo e localização primária, para a Região Norte para 2016. | 15 |
| Tabela 3 – Taxas médias de mortalidade para leucemia, segundo faixa etária, em ambos os sexos. Brasil, 1996-2008. | 19 |
| Tabela 4 – Tendência das taxas de mortalidade para leucemia em menores de 20 anos, nas capitais que dispõem de RCBP. Brasil, 1996-2008. | 20 |
| Tabela 5 – Taxas médias de incidência* e mortalidade** e razão de taxas, de incidências/mortalidade para leucemia, em capitais com RCBP. Brasil. | 21 |
| Tabela 6 – Medicamentos e doses específicas no protocolo GBTLI-99 para o tratamento de LLA com baixo risco de recaída. | 29 |
| Tabela 7 – Medicamentos e doses específicas no protocolo GBTLI-99 para o tratamento de LLA com alto risco de recaída. | 30 |
| Tabela 8 – Relação entre os alelos e seus respectivos genótipos | 48 |
| Tabela 9 – Frequência das variantes alélicas do TPMT em diferentes grupos étnicos. | 49 |
| Tabela 10 – Relação entre as variantes alélicas e atividade da enzima TPMT..... | 49 |
| Tabela 11 – Alelos da Tiopurina metiltransferase e fenótipos associados à atividade da enzima TPMT. | 52 |
| Tabela 12 – Dosagem recomendada de 6-Mercaptopurina de acordo com o fenótipo do TPMT..... | 55 |
| Tabela 13 – Polimorfismos farmacogenéticos selecionados do gene TPMT associados a resposta terapêutica do 6-MP..... | 66 |
| Tabela 14 – Descrição dos iniciados utilizados na genotipagem dos polimorfismos do gene. | 67 |
| Tabela 15 – Característica clínica dos pacientes com LLA. | 70 |
| Tabela 16 – Média de ancestralidade genética dos pacientes com LLA. | 71 |
| Tabela 17 – Toxicidades grave 3 e 4, relatada nos pacientes com LLA durante o tratamento. | 72 |
| Tabela 18 – Frequência estimada nos pacientes com LLA para os haplótipos derivados do gene <i>TPMT</i> | 73 |
| Tabela 19 – Frequência estimada nos pacientes com LLA para os haplótipos derivados do gene <i>TPMT</i> | 73 |
| Tabela 20 - Distribuição dos pacientes estudados de acordo com o genótipo do <i>TPMT</i> e sua capacidade de metabolização do 6-MP. | 74 |
| Tabela 21 – Caracterização do genótipo do gene <i>TPMT</i> e determinação do perfil de metabolização do 6-MP em pacientes com LLA com e sem toxicidades grave. | 75 |
| Tabela 22 – Distribuição das frequências da variante RS12201199 do gene <i>TPMT</i> em relação à presença de toxicidades grave durante o tratamento para LLA infantil. | 78 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-MeTIMP: 6-metil tioinosina 5' monofosfato

6-MP: 6-mercaptopurina

6-TGN: 6-tioguanina

6-TU: Ácido tioúrico

ABL: Tirosina quinase não-receptora AB

ARID5B: Domínio 5B interativo rico AT

ASNS: Asparaginase Sintetase

AZA: Azatioprina

BCR: Breakpoint cluster region

Bmi1: proto-oncogene, polycomb ring finger

CDKN2A: Inibidor da quinase 2A dependente de ciclina

CEBPE: Proteína de ligação ao estimulador de CCAAT

COMT: Catecol O-Metiltransferase

CYP2A6: Citocromo P450, família 2, subfamília B, polipéptido 6

CYP3A5: Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 5

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

E2A: Adenovírus humano A

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ETV6: ETS-variante gene 6

EUROCARE: European Registry-Based Study on Survival and Care of Cancer

FDA: Food and Drug Administration

GBTLI LLA: Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda na Infância

GMPS: Guanosina monofosfato sintase

GSTM1: Glutathione-S-transferase mu 1

HGPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase

HLA: Complexo principal de histocompatibilidade

IARC : Agência Internacional para Pesquisa em Câncer

IGH: Complexo gênico de cadeia pesada de imunoglobulina

IKZF1: Família Ikaros dedo-de-zinco 1.

IL12A: Interleucina 12 A

IMPD: Inosina monofosfato desitrogenase

INCA: Instituto Nacional do Câncer
ITC: Irradiação total do corpo
KCl: Cloreto de potássio
KH₂PO₄: Fosfato monopotássico
LCR: Líquido Cefalorraquidiano
LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC: Leucemia linfóide Crônica
LMA: Leucemia Mielóide Aguda
LMC: Leucemia Mielóide Crônica
MADIT: Combinação de Metotrexato, Citarabina e Dexametasona administrada intratecalmente.
MgCl₂: Cloreto de magnésio
MIAs: Marcadores informativos de ancestralidade
MMP: Metilmercaptapurina
MTHFR: Metiltetrahidrofolato redutase
MTX: Metotrexato
Na₂HPO₄: Fosfato de sódio dibásico
NaCl: Cloreto de sódio
NCI/NIH: Instituto Nacional de Câncer (dos Estados Unidos)
NCI: Common Toxicity Criteria
OMS: Organização Mundial da Saúde
PBS: Tampão fosfato-salino
PBX1: Pre-B-cell leukemia homeobox
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
pH: Potencial Hidrogeniônico
PIP4K2A: Fosfatidilinositol-5-fosfato-4-kinase
RCBP: Registros de Câncer de Base Populacional
RHC: Registros Hospitalares de Câncer
RUNX1: Fator de transcrição relacionado com o runt-1
SIM: Sistema de Informações sobre Mortalidade
SLC19A1: Família portadora de soluto 19, membro 1
SNC: Sistema nervoso central
SNP: Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos
TCEH: Transplante de células estaminais hematopoiéticas

TGMP: Tioguanina monofosfato

TGN: Nucleotídeos citotóxicos

TIMP: Tiomecaptopurina

TPMT: Tiopurina Metiltransferase

Tris-HCl: Tris(hidroximetil)aminometano

TXMP: Tioxantina monofosfato

VKORC1: Epóxido Redutase da Vitamina K

XO: Xantina Oxidase

χ^2 : Qui-quadrado

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

microL: Microlitro

M: Molaridade

mM: Milimolar

pmol: Picomol

ng: Nanograma

μ L: Microlitro

$^{\circ}$ C: Grau Celsius

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 CÂNCER | 11 |
| 1.1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER | 12 |
| 1.2 LEUCEMIA | 15 |
| 1.2.1 EPIDEMIOLOGIA DAS LEUCEMIAS | 17 |
| 1.2.2 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA | 24 |
| 1.2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA | 26 |
| 1.2.4 TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA | 26 |
| 1.2.4.1 GLICOCORTICÓIDES | 35 |
| 1.2.4.2 ASPARAGINASE | 35 |
| 1.2.4.3 METOTREXATO | 36 |
| 1.2.4.4 6-MERCAPTOPURINA | 37 |
| 1.3 MECANISMO DE AÇÃO DA 6-MERCAPTOPURINA | 37 |
| 1.3.1 EFEITOS ADVERSOS AO FÁRMACO 6-MERCAPTOPURINA | 39 |
| 1.4 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA NO ESTADO DO PARÁ | 40 |
| 1.5 FARMACOGENÉTICA | 42 |
| 1.5.1 FARMACOGENÉTICA APLICADA AO CÂNCER | 43 |
| 1.5.2 FARMACOGENÉTICA DO 6-MP | 44 |
| 1.6 GENE TPMT- POLIMORFISMOS GENÉTICOS | 47 |
| 1.7 DOSAGEM RECOMENDADA DE 6-MP | 53 |
| 1.8 INFLUÊNCIA ÉTNICA EM ESTUDOS FARMACOGENÉTICOS | 57 |
| 1.8.1 CONTROLE GENÔMICO DE ANCESTRALIDADE | 60 |
| 1.9 APLICABILIDADE CLÍNICA | 61 |
| 2 OBJETIVOS | 63 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 63 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 63 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 64 |
| 3.1 AMOSTRAS ESTUDADAS | 64 |
| 3.2 EXTRAÇÃO DE DNA | 64 |
| 3.3 QUANTIFICAÇÃO | 65 |
| 3.4 SELEÇÃO DOS SNP | 66 |
| 3.5 DESENHO DOS INICIADORES | 66 |
| 3.6 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) | 67 |
| 3.7 SEQUENCIAMENTO DIRETO DO DNA | 67 |
| 3.8 GENOTIPAGEM DA VARIANTE RS12201199 | 68 |
| 3.9 GENOTIPAGEM DOS MARCADORES DE ANCESTRALIDADE | 68 |
| 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 69 |
| 4 RESULTADOS | 70 |
| 4.1 DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES | 70 |
| 4.2 FREQUÊNCIA DOS ALELOS DO GENE TPMT EM PACIENTES COM LLA | 72 |
| 4.3 ASSOCIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DAS VARIANTES DO GENE TPMT EM RELAÇÃO ÀS TOXICIDADES GRAVE DURANTE O TRATAMENTO ANTILEUCÊMICO | 75 |
| 5 DISCUSSÃO GERAL | 79 |
| 6 CONCLUSÃO | 85 |
| 7 REFERÊNCIAS | 86 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer caracteriza-se como uma doença genética e epigenética desencadeada por alterações em genes específicos do controle celular, associados aos fatores ambientais, que resultam um fenótipo proliferativo em um emaranhado de células heterogêneas (YASUI *et al.*, 2006; WEINBERG, 2008). O mau funcionamento do ciclo celular é resultado de eventos mutacionais somáticos cumulativos, revelados por alterações moleculares, bioquímicas e traços celulares que conferem capacidades adquiridas e vantagens proliferativas (HANAHAN *et al.*, 2000; CROCE, 2009).

As características das células tumorais englobam autossuficiência quanto ao sinal de crescimento, insensibilidade aos fatores inibitórios, evasão a apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, reprogramação do metabolismo energético, evasão da vigilância imune, invasão celular e metástase (Figura 1), demonstrando o quão complexa é a doença neoplásica (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Embora a maioria das neoplasias seja resultado de interações complexas entre o componente genético do indivíduo e o ambiente (câncer esporádico), um percentual de casos decorre de alterações herdadas (câncer hereditário), o que acarreta uma maior predisposição ao desenvolvimento de tumores agressivos em membros da mesma família. Estima-se que cerca de 5% a 10% de muitos cânceres estejam associados à predisposição hereditária (INCA, 2010).

Os cânceres podem ser classificados de acordo com os tecidos e os tipos celulares dos quais derivam, podendo ser agrupados em duas grandes categorias: carcinoma, quando são derivados de células epiteliais ou de tecidos que recobrem alguns órgãos, e Sarcoma, quando derivam do tecido conjuntivo ou de células musculares. Os cânceres que não se enquadram em nenhuma dessas categorias incluem as várias leucemias, que são derivadas de células hematopoiéticas e os cânceres do sistema nervoso central (INCA, 2010).

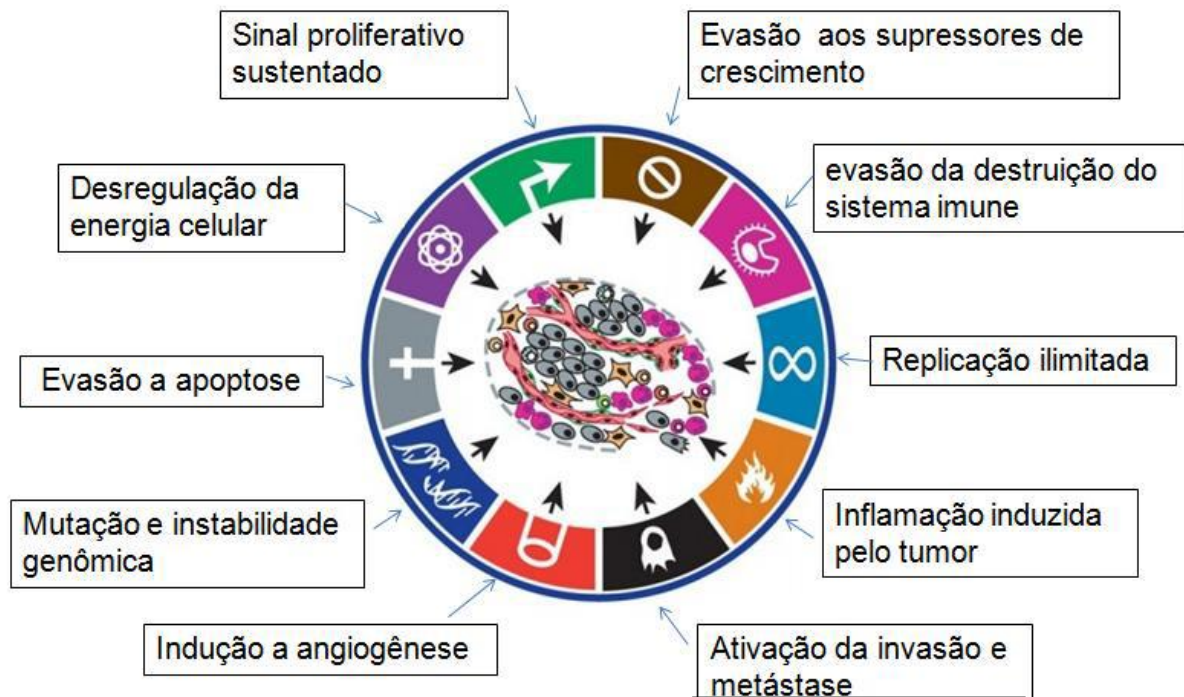


Figura 1 – Capacidades adquiridas das células tumorais durante os múltiplos passos da carcinogênese. Fonte: HANAHAN; WEINBERG, 2011.

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês International Agency for Research on Cancer), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. A estimativa continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas.

Nos países desenvolvidos os tipos de câncer mais frequentes na população masculina foram próstata, pulmão e cólon e reto; e mama, cólon e reto e pulmão entre as mulheres. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres (INCA, 2014).

Em 2030, a carga global é estimada para ser de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e

do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2015).

É com base nas informações de 23 Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), alimentados por uma rede de 282 Registros Hospitalares de Câncer (RHC), que se consolida o sistema de morbidade por câncer – com informações oportunas e de qualidade (padronizadas, atualizadas e representativas da população brasileira). A esse sistema, agrega-se o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) para a elaboração da estimativa de 19 tipos de câncer, apresentada para o território nacional, estados e capitais, por gênero (INCA, 2015).

A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (INCA, 2015) (Tabela 1).

Tabela 1 – Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos novos câncer, segundo sexo e localização primária, no Brasil para 2016.

| Localização Primária da Neoplasia Maligna | Estimativa dos Casos Novos | | | | | | | |
|---|----------------------------|------------|---------|------------|----------|------------|---------|------------|
| | Homens | | | | Mulheres | | | |
| | Estado | | Capital | | Estado | | Capital | |
| | Casos | Taxa Bruta | Casos | Taxa Bruta | Casos | Taxa Bruta | Casos | Taxa Bruta |
| Próstata | 61.200 | 61,82 | 13.940 | 64,93 | - | - | - | - |
| Mama Feminina | - | - | - | - | 57.960 | 56,20 | 18.990 | 79,37 |
| Colo do Útero | - | - | - | - | 16.340 | 15,85 | 4.550 | 19,07 |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 17.330 | 17,49 | 4.430 | 20,58 | 10.890 | 10,54 | 3.230 | 13,49 |
| Cólon e Reto | 16.660 | 16,84 | 5.560 | 25,08 | 17.620 | 17,10 | 6.210 | 25,95 |
| Estômago | 12.920 | 13,04 | 3.130 | 14,54 | 7.600 | 7,37 | 2.180 | 9,07 |
| Cavidade Oral | 11.140 | 11,27 | 2.780 | 12,95 | 4.350 | 4,21 | 1.230 | 5,04 |
| Laringe | 6.360 | 6,43 | 1.600 | 7,50 | 990 | 0,94 | 320 | 0,97 |
| Bexiga | 7.200 | 7,26 | 2.110 | 9,79 | 2.470 | 2,39 | 830 | 3,21 |
| Esôfago | 7.950 | 8,04 | 1.460 | 6,75 | 2.860 | 2,76 | 610 | 2,27 |
| Ovário | - | - | - | - | 6.150 | 5,95 | 2.170 | 8,92 |
| Linfoma de Hodgkin | 1.460 | 1,46 | 450 | 1,74 | 1.010 | 0,93 | 400 | 1,33 |
| Linfoma não Hodgkin | 5.210 | 5,27 | 1.550 | 7,15 | 5.030 | 4,88 | 1.670 | 7,02 |
| Glândula Tireoide | 1.090 | 1,08 | 350 | 1,27 | 5.870 | 5,70 | 1.800 | 7,46 |
| Sistema Nervoso Central | 5.440 | 5,50 | 1.290 | 5,86 | 4.830 | 4,68 | 1.250 | 5,20 |
| Leucemias | 5.540 | 5,63 | 1.370 | 6,38 | 4.530 | 4,38 | 1.180 | 4,88 |
| Corpo do Útero | - | - | - | - | 6.950 | 6,74 | 2.530 | 10,47 |
| Pele Melanoma | 3.000 | 3,03 | 840 | 3,86 | 2.670 | 2,59 | 740 | 2,96 |
| Outras Localizações | 51.850 | 52,38 | 11.890 | 55,45 | 47.840 | 46,36 | 11.820 | 49,33 |
| Subtotal | 214.350 | 216,48 | 52.750 | 245,63 | 205.960 | 199,57 | 61.710 | 257,55 |
| Pele não Melanoma | 80.850 | 81,66 | 17.370 | 80,90 | 94.910 | 91,98 | 21.910 | 91,65 |
| Todas as Neoplasias | 295.200 | 298,13 | 70.120 | 326,51 | 300.870 | 291,54 | 83.630 | 348,99 |

Nota: * Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Para o Brasil, no ano de 2016, estimam-se 5.540 casos novos de leucemia em homens e 4.530 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,63 casos novos a cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres (Tabela 1). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, a leucemia em homens é o sexto mais frequente na Região Norte (3,81/100 mil). Nas Regiões Sudeste (6,03/100 mil) e Nordeste (4,41/100 mil), ocupa a nona posição. Na Região Sul (8,55/100 mil), ocupa a décima posição. Na Região Centro-Oeste (4,38/100 mil), ocupa a 11ª posição. Para as mulheres, é o sétimo mais frequente na Região Norte (3,01/100 mil) e o oitavo na Região Sul (6,62/100 mil). Na Região Nordeste (3,71/100 mil), ocupa a décima posição. É o 11º mais frequente na Região Centro-Oeste (3,62/100 mil), e, na Região Sudeste (4,45/100 mil), ocupa a 12ª posição (INCA, 2015) (Tabela 2).

Tabela 2 – Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos novos câncer, segundo sexo e localização primária, para a Região Norte para 2016.

| Localização Primária da Neoplasia Maligna | Estimativa dos Casos Novos | | | | | | | |
|---|----------------------------|------------|---------|------------|----------|------------|---------|------------|
| | Homens | | | | Mulheres | | | |
| | Estado | | Capital | | Estado | | Capital | |
| | Casos | Taxa Bruta | Casos | Taxa Bruta | Casos | Taxa Bruta | Casos | Taxa Bruta |
| Próstata | 2.470 | 29,50 | 970 | 39,94 | - | - | - | - |
| Mama Feminina | - | - | - | - | 1.810 | 22,26 | 1.040 | 39,98 |
| Colo do Útero | - | - | - | - | 1.970 | 23,97 | 990 | 37,43 |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 680 | 8,07 | 310 | 15,59 | 410 | 5,05 | 230 | 8,25 |
| Cólon e Reto | 440 | 5,34 | 230 | 8,78 | 480 | 5,89 | 280 | 10,45 |
| Estômago | 970 | 11,62 | 460 | 18,29 | 480 | 5,82 | 250 | 9,05 |
| Cavidade Oral | 290 | 3,46 | 160 | 5,74 | 160 | 1,76 | 90 | 2,35 |
| Laringe | 250 | 3,04 | 150 | 5,46 | 80 | 0,62 | 60 | 0,91 |
| Bexiga | 370 | 4,32 | 110 | 3,42 | 90 | 0,76 | 80 | 1,35 |
| Esôfago | 200 | 2,20 | 90 | 2,87 | 90 | 0,73 | 70 | 0,94 |
| Ovário | - | - | - | - | 250 | 2,92 | 170 | 5,55 |
| Linfoma de Hodgkin | 110 | 0,97 | 80 | 1,84 | 70 | 0,47 | 50 | 0,91 |
| Linfoma não Hodgkin | 230 | 2,66 | 130 | 4,38 | 170 | 1,87 | 110 | 3,34 |
| Glândula Tireoide | 80 | 0,74 | 70 | 1,17 | 270 | 3,09 | 130 | 4,47 |
| Sistema Nervoso Central | 230 | 2,62 | 130 | 4,41 | 190 | 2,21 | 120 | 3,53 |
| Leucemias | 310 | 3,81 | 140 | 5,33 | 250 | 3,01 | 130 | 4,07 |
| Corpo do Útero | - | - | - | - | 230 | 2,71 | 120 | 3,57 |
| Pele Melanoma | 90 | 0,84 | 60 | 1,31 | 70 | 0,65 | 50 | 0,94 |
| Outras Localizações | 1,930 | 23,19 | 860 | 35,00 | 1,470 | 17,86 | 670 | 25,77 |
| Subtotal | 8,650 | 103,24 | 3,950 | 159,06 | 8,540 | 103,79 | 4,640 | 176,84 |
| Pele não Melanoma | 2,410 | 28,89 | 960 | 39,05 | 1,890 | 23,12 | 630 | 24,68 |
| Todas as Neoplasias | 11,060 | 132,00 | 4,910 | 197,71 | 10,430 | 126,76 | 5,27 | 200,85 |

Nota: * Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

1.2 LEUCEMIA

Leucemia é uma patologia de origem na maioria das vezes não conhecida, ela é o resultado de anormalidades que ocorrem em uma célula progenitora do sistema hematopoiético. Essas anormalidades modificam o programa de diferenciação celular determinando uma vantagem proliferativa do clone leucêmico sobre as demais células normais da medula óssea culminando, portanto, no acúmulo dessas células anormais na medula e impedindo a formação de células sanguíneas normais (SACHS, 1996; INCA, 2011).

A leucemia caracteriza-se pela proliferação de blastos anormais e pela produção comprometida de células sanguíneas normais (BABA *et al.*, 2010). Consistem na neoplasia hematológica mais comum entre os cânceres em crianças e

adolescentes em todo o mundo e apresentam maior magnitude no sexo masculino e na faixa etária de 0 a 4 anos (BABA *et al.*, 2010; BOSETTI *et al.*, 2010).

As neoplasias originadas da medula óssea são do ponto de vista histórico, denominadas leucemias e podem ser classificadas de acordo com o tipo de glóbulos brancos afetado, nesse quesito são classificadas em dois grandes grupos; linfoide, quando afetam células da linhagem linfocitária, sendo chamadas de leucemia linfoide, linfocítica ou linfoblástica; ou mielóide quando afetam as células de origem mielóide podendo ser denominadas de leucemia mielóide ou mieloblástica. Em relação aos diferentes estágios de maturação das células afetadas (linfoide ou mielóide).

Além disso, as leucemias podem ser classificadas em crônicas e agudas. Na forma crônica ocorrem proliferação e acúmulo gradativo de células neoplásicas na medula óssea, que se apresentam em um estágio tardio de maturação. Na forma aguda a linhagem celular afetada é oriunda de células imaturas, levando a um bloqueio de maturação e a uma proliferação descontrolada dessas células neoplásicas (ROWLEY, 2000; ZAGO *et al.*, 2004; INCA, 2014).

Dessa forma, combinando as duas categorias podem ser classificados quatro tipos mais comuns de leucemias: a. Leucemia Linfoide Aguda (LLA); b. Leucemia Linfoide Crônica (LLC); c. Leucemia Mielóide Aguda (LMA); d. Leucemia Mielóide Crônica (LMC) (INCA, 2014).

Embora as causas para o desenvolvimento de leucemia ainda não sejam bem conhecidas, existem evidências para alguns fatores de risco, como exposição à radiação ionizante, medicamentos utilizados em quimioterapia e exposição ocupacional ao benzeno.

Os primeiros indícios de que a exposição à radiação ionizante levava ao desenvolvimento de leucemia foram estudados após os bombardeios de Hiroshima e Nagasaki. Observou-se um excesso nas taxas de incidência para leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda e leucemia mielóide crônica, porém não foram observados excessos nas taxas de incidência para leucemia linfoblástica crônica (INCA, 2014).

1.2.1 EPIDEMIOLOGIA DAS LEUCEMIAS

No contexto mundial, a leucemia constitui a neoplasia mais comum em crianças menores de 15 anos de idade na maioria das populações, sendo a LLA a mais frequente, representando 30% de câncer na infância (ONCIU, 2009).

A LMA é mais frequente em adultos e representa apenas 4% dos diagnósticos em cânceres pediátricos (MULLIGHAN, 2009; WAYNE *et al.*, 2010). A ocorrência de LMC na infância é rara, correspondendo a cerca de 1% dos cânceres em crianças de 1 a 4 anos (WAYNE *et al.*, 2010). Foram estimados cerca de 350 mil casos novos e 265 mil óbitos por leucemia no mundo para o ano de 2012 (INCA, 2014).

O câncer pediátrico é responsável por cerca de 2 a 3% de todos os tumores malignos, e as leucemias e os linfomas são os tumores hematológicos mais frequentes nessa faixa etária no Brasil (MONDIAL, 2012).

No Brasil, as leucemias são o tipo de tumor mais frequente em crianças e adolescentes, com percentual médio de 29%, sendo a região Norte do país a que apresenta maiores percentuais para esse tipo de neoplasia, acima de 39% (INCA, 2011). A Figura 2 mostra a distribuição percentual da incidência dos diferentes tipos de câncer infanto-juvenil na população de Belém e Ananindeua no período de 1997 a 2001 (INCA, 2008).

A incidência das leucemias tem aumentado nos últimos anos na maioria dos países desenvolvidos sendo observadas taxas mais altas nos Estados Unidos, no Norte Europeu e no Japão (BABA *et al.*, 2010). Por outro lado, menores taxas de incidência foram registradas em países em desenvolvimento, muito embora em algumas capitais do Brasil, como São Paulo (1998 a 2002) e Goiânia (1999-2003), as taxas sejam similares as dos países desenvolvidos (RIBEIRO *et al.*, 2007; INCA, 2010).

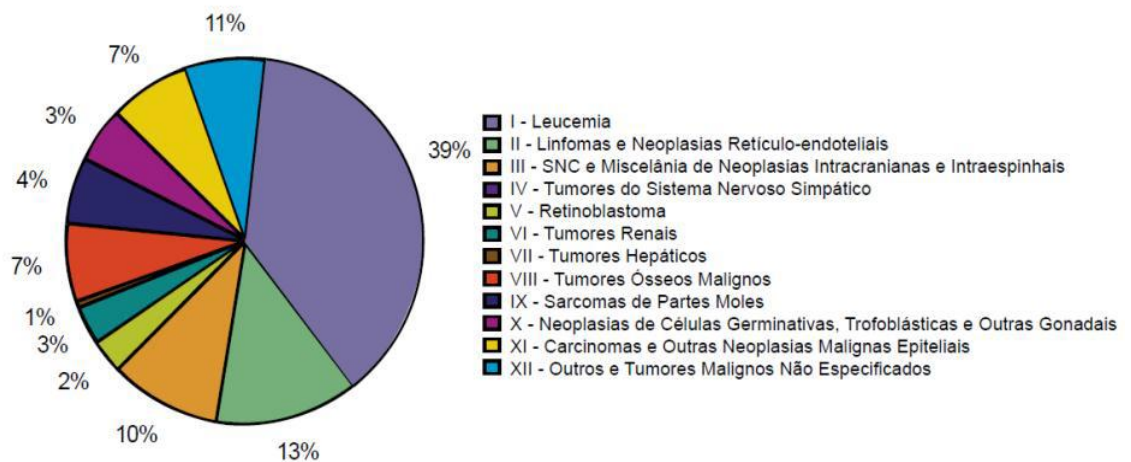


Figura 2 – Distribuição percentual da incidência por tipo de câncer infanto-juvenil, Belém e Ananindeua, 1997 a 2001. Fonte: INCA, 2008.

Ao contrário do observado para incidência, as taxas de mortalidade por leucemias em crianças e adolescentes tem apresentado redução desde a década de 1960, principalmente nos países desenvolvidos. No Brasil, entre 1980 e 2002, houve redução significativa da mortalidade por leucemias. Esse fato tem sido atribuído à melhora no diagnóstico, no tratamento da doença e no acesso aos serviços de saúde (YANG *et al.*, 2009; BOSETTI *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2010).

Em virtude das diferenças no acesso ao tratamento, observa-se uma considerável diferença entre populações com relação à sobrevida. Nos Estados Unidos e da Europa Ocidental, a sobrevida em cinco anos é de 43%. Enquanto, para o Japão, observa-se uma sobrevida de 25%; na América do Sul, 24%; na Índia, 19%; na Tailândia, 15%; e na África subsaariana, 14%. Em áreas com acesso a tratamentos, a sobrevida relativa em cinco anos, em crianças, alcança 80% (INCA, 2014).

No Brasil, onde os dados de incidência ainda não são consistentes, os estudos epidemiológicos sobre câncer na infância valem-se das taxas de mortalidade para avaliar o impacto da doença. Devido as diferenças regionais e de implantação do sistema integrado do Registro de Câncer de Base Populacional no Brasil (RCBP), não existe disponibilidade de uma série histórica de incidência de câncer na infância. Portanto, a análise das tendências de mortalidade por tipo de neoplasia hematológica pode fornecer subsídios para avaliação da efetividade das

estratégias de detecção precoce e intervenção, voltadas para esse grupo populacional, que vem sendo executadas no país (SILVA *et al.*, 2013).

Na Tabela 3, são apresentadas as taxas médias trienais de mortalidade por leucemias, segundo faixa etária, no Brasil. Houve redução das taxas de mortalidades para esta neoplasia hematológica na população brasileira de menores de 20 anos. As leucemias apresentaram maiores magnitudes de mortalidade para todo o período e para todas as faixas etárias estudadas (SILVA *et al.*, 2013).

Tabela 3 – Taxas médias de mortalidade para leucemia, segundo faixa etária, em ambos os sexos. Brasil, 1996-2008.

| Período | Faixa etária | | | | | |
|---------|--------------|------------|------------|--------------|--------------|------------|
| | < 1 ano | 1 a 4 anos | 5 a 9 anos | 10 a 14 anos | 15 a 19 anos | < 20 anos* |
| 1996-98 | 13,19 | 16,08 | 13,43 | 12,76 | 14,97 | 14,13 |
| 2001-03 | 12,78 | 15,30 | 14,15 | 12,59 | 14,90 | 14,11 |
| 2006-08 | 11,95 | 13,00 | 13,51 | 14,13 | 15,18 | 13,92 |

Fonte: SIM/DATASUS.

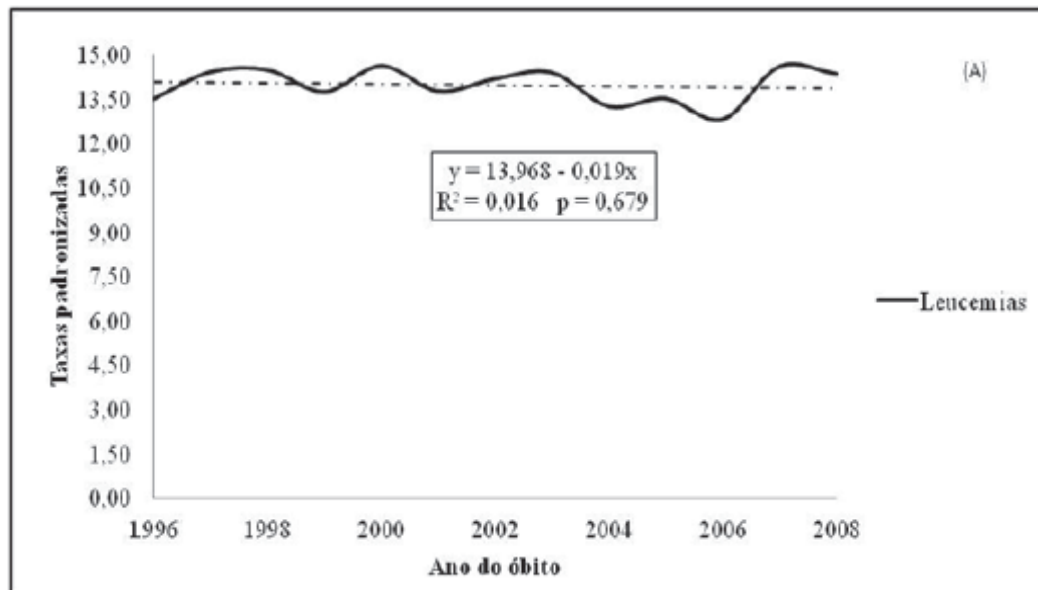
Nota: * Padronizado por idade, por 100 1.000.000 de habitantes.

Observando as taxas de mortalidade da leucemia, verificaram-se taxas mais elevadas para as faixas etárias até 4 anos. Nas faixas etárias de 10 a 14 anos e 15 a 19 anos, houve oscilação das taxas no período do estudo, sendo observado aumento entre 2006 e 2008 (SILVA *et al.*, 2013).

Na Figura 3, encontram-se a distribuição das taxas de mortalidade e o resultado da análise da tendência para leucemia no Brasil. Observa-se uma oscilação das taxas de mortalidade por leucemias que variaram entre 13,50 por 1.000.000 em 1996 e 14,35 por 1.000.000 em 2008. Entretanto, não foi observada tendência estatisticamente significativa no período estudado (SILVA *et al.*, 2013).

Na Tabela 4, pode-se observar a tendência das taxas de mortalidade para as capitais brasileiras em que foram obtidos modelos com significância estatística. Na maioria das capitais, foi observado declínio da mortalidade por leucemias, exceto em Belém, Joao Pessoa e Palmas, onde houve crescimento da mortalidade.

Na Tabela 5, encontram-se descritas as taxas medias de incidência para leucemia, nos períodos disponíveis nos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP) das capitais e as taxas de mortalidade correspondentes ao mesmo período (SILVA *et al.*, 2013).



*Padronizado por idade, por 1.000.000 de habitantes.

Figura 3 – Taxas e tendências da mortalidade* para leucemia, em menores de 20 anos, de ambos os sexos. Brasil, 1996-2008.

Tabela 4 – Tendência das taxas de mortalidade para leucemia em menores de 20 anos, nas capitais que dispõem de RCBP. Brasil, 1996-2008.

| Leucemias | | | | |
|--------------|--------------------------------|------|--------|---------------------------|
| Capital | Modelo | R(%) | P | Tendência |
| Belém | $y=73,885 + 4,186x$ | 73,3 | <0,001 | Crescente constante |
| Palmas | $y=22,268 + 5,533x$ | 78,9 | <0,001 | Crescente constante |
| João Pessoa | $y=53,020 + 2,068x$ | 31,7 | 0,04 | Crescente constante |
| São Paulo | $y=97,633 - 6,469x + 1,828x^2$ | 68,8 | 0,003 | Decrescente não constante |
| Porto Alegre | $y=70,856 - 3,373x + 0,717x^2$ | 75,6 | 0,001 | Decrescente não constante |

Fonte: SIM/DATASUS

Nota: * Padronizado por idade, por 1.000.000 de habitantes

Tabela 5 – Taxas médias de incidência* e mortalidade** e razão de taxas, de incidências/mortalidade para leucemia, em capitais com RCBP. Brasil.

| Capitais | Leucemias | | |
|------------------------------------|------------|-------------|-----------------|
| | Incidência | Mortalidade | Razão das taxas |
| Aracaju (1996-2000) | 27,18 | 57,98 | 0,47 |
| Belém e Ananindeua (1997-2001) | 31,57 | 62,99 | 0,50 |
| Belo Horizonte (2000-2001) | 40,99 | 63,04 | 0,65 |
| Campo Grande (2000-2001) | 53,72 | 40,20 | 1,34 |
| Cuiabá e Várzea Grande (2000-2003) | 70,19 | 51,18 | 1,37 |
| Curitiba (1998-2002) | 64,90 | 22,26 | 2,92 |
| Fortaleza (1998-2002) | 38,87 | 46,30 | 0,84 |
| Goiânia (1999-2003) | 67,51 | 83,07 | 0,81 |
| João Pessoa (2000-2004) | 34,89 | 57,02 | 0,61 |
| Manaus (1999-2002) | 68,38 | 34,37 | 1,99 |
| Natal (1998-2001) | 48,15 | 69,82 | 0,69 |
| Palmas (2000-2003) | 07,67 | 17,72 | 0,43 |
| Porto Alegre (1998-2002) | 47,73 | 86,40 | 0,55 |
| Recife (1997-2001) | 49,18 | 75,24 | 0,65 |
| Salvador (1998-2002) | 22,04 | 33,55 | 0,66 |
| São Paulo (1998-2002) | 48,57 | 32,12 | 1,51 |

Fonte: DATASUS/MS. As taxas de mortalidade aqui descritas são equivalentes ao período disponibilizado das taxas de incidência de RCBP.

Fonte: INCA, 2008.

Nota: * Padronizado por idade por 1.000.000 de habitantes.

A incidência anual do câncer infantil no mundo vem se estabilizando desde 1990 e varia entre 70 a 160 casos por um milhão de habitantes menores de 15 anos (LINABERY; ROSS, 2008). No Brasil, a ocorrência do câncer varia segundo região geográfica e, em diversas capitais que dispõem de RCBP, não se tem observado estabilidade das taxas de incidência (INCA, 2010).

Sendo assim, observou-se redução nas taxas de mortalidade por leucemias em menores de 20 anos no Brasil com variação entre os grupos etários, sendo observadas taxas mais elevadas para as leucemias no período (2006-2008) para a faixa etária de 10 a 19 anos. Corroborando esses achados, pode-se citar o estudo realizado nos Estados Unidos que observou redução das taxas de mortalidade por leucemias na faixa etária de 0 a 19 anos, no período de 1975 a 2006. No Japão,

entre 1970 e 2006, também houve redução da mortalidade por neoplasias hematológicas em menores de 15 anos, similarmente ao que ocorreu em outros países como Canada, Itália, Inglaterra e Nova Zelândia (YANG *et al.*, 2009). Na Colômbia, no período de 1985 a 2008, houve redução da mortalidade por leucemia em menores de 14 anos de ambos os sexos (PIÑEROS *et al.*, 2011). Em Madri, na Espanha, a semelhança de nosso estudo, houve redução da mortalidade por neoplasias hematológicas em menores de 20 anos no período de 1997 a 2001, exceto para as leucemias, nas faixas etárias de 5 a 14 anos para meninos e de 10 a 19 anos para meninas, para as quais foi observado incremento nas taxas, no período de 1997 a 2001 (GRANDE, 2005).

Na maioria dos países europeus, foi observado um declínio da mortalidade por leucemia para o período de 1970 a 2007 com estabilização das taxas (BOSETTI *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos, houve declínio das taxas de mortalidade por leucemias entre 1975 a 2006, ocorrendo declínio mais lento dessas taxas na última década, correspondendo, aproximadamente, a 2 % ao ano (SMITH *et al.*, 2010). Yang *et al.* (2009) realizaram um estudo comparativo da mortalidade em menores de 15 anos no Japão com aquela de outros países desenvolvidos (Canada, Estados Unidos, Reino Unido, Nova Zelândia e Itália) e concluíram que houve tendência de declínio importante da mortalidade por leucemias entre 1970 e 2006 nos países estudados.

Vários estudos (YANG *et al.*, 2009; BOSETTI *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2010) sugerem que a mortalidade por neoplasias hematológicas reflete a melhora da sobrevida do câncer em geral na faixa etária de 0 a 19 anos. Em estudo realizado pelo EUROCARE (European Registry-Based Study on Survival and Care of Cancer) na Europa entre 1983 e 1995, a maior sobrevida entre os cânceres em menores de 15 anos foi constatada para as leucemias e os linfomas, em consequência dos avanços no tratamento dessas neoplasias no período estudado (GATTA *et al.*, 2002).

No geral, a mortalidade por doenças malignas da infância e, em particular a leucemia infantil, tem sido utilizada como um indicador de qualidade do cuidado médico em todo mundo, pois a incidência dessas doenças não varia substancialmente em relação ao tempo e ao espaço. Além disso, os dados de mortalidade são considerados indicadores mais sensíveis da acessibilidade e efetividade do cuidado médico (VECCHIA *et al.*, 1998; CURADO *et al.*, 2011).

Observou-se tendência de incremento da mortalidade por leucemias em Belém e Palmas e declínio constante em São Paulo e Porto Alegre. Estudos brasileiros recentes têm demonstrado que o declínio das taxas de mortalidade por leucemias difere segundo as regiões geográficas e o status socioeconômico (RIBEIRO *et al.*, 2007; BOSETTI *et al.*, 2010; GRABOIS *et al.*, 2011). Grabois *et al.* (2011), ao descreverem as variações geográficas do acesso aos serviços de saúde em menores de 18 anos com câncer no Brasil, constataram iniquidade no acesso aos serviços de quimioterapia, radioterapia e cirurgia nas regiões Norte e Nordeste. Os serviços especializados para o tratamento oncológico estão concentrados nas regiões Sul e Sudeste, o que pode explicar, em parte, o declínio da mortalidade por leucemias e linfomas nas capitais localizadas nessas regiões. Outra explicação para o aumento da mortalidade observado neste estudo pode ser a melhora da qualidade da certificação do óbito nessas localidades (SILVA *et al.*, 2013).

O fato de as taxas de mortalidade por leucemias serem maiores do que as taxas de incidência em nove capitais que dispõem de RCBP sugere que existem diferenças na qualidade dos sistemas de informação. Grabois *et al.* (2011) mostraram que crianças com leucemia linfocítica aguda que moram em regionais de saúde com condições de saúde desfavoráveis tiveram pior acesso aos centros especializados, sugerindo que elas chegam a esses locais com doença em fase muito avançada ou não conseguem chegar, ocasionando, como substrato, o subdiagnóstico e o sub-registro. Portanto, é importante reduzir as iniquidades geográficas e garantir o acesso aos centros especializados para o diagnóstico precoce e o tratamento de qualidade, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste do país. Existe também a possibilidade de sub-registro de óbitos por erros na codificação da causa básica de morte. Outro aspecto é a baixa detecção dos casos, pela necessidade de testes diagnósticos de boa qualidade que possibilitem realizar as análises morfológica, imunofenotípica e citogenética dos tumores (MONTEIRO *et al.*, 1997; RIBEIRO *et al.*, 2007; INCA, 2010).

Outra limitação diz respeito à mortalidade por causas mal definidas. A proporção de óbitos por causas mal definidas no Brasil reduziu de 25,6% em 1980 para 4,6% em 2008. Entretanto, há variação entre as regiões geográficas com percentual mais alto nas regiões Nordeste (2004: 28,4%) e Norte e menor percentual na região Sul (2004: 8,3%). Apesar de ter havido redução dos óbitos por causas mal

definidas nas regiões Norte e Nordeste, esses valores ainda são elevados (SILVA *et al.*, 2013).

1.2.2 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

A LLA é o tipo de leucemia mais frequente em crianças e compreende apenas 20% das leucemias agudas em adultos (APPELBAUM, 1999; ZAGO *et al.*, 2004; GAYNON *et al.*, 2010) mais frequente em crianças na faixa etária de 2 a 5 anos, sendo mais incidente no sexo masculino e em crianças brancas. A LLA é o câncer mais comum diagnosticada em crianças. Tem uma sobrevivência global de cerca de 80-98% (GAYNON *et al.*, 2010).

A classificação da LLA pela a OMS baseia-se em critérios morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e biologia molecular, que inclui leucemia linfoblástica aguda de percussores T ou B (Figura 4) ou neoplasias precursoras de células B maduras do subgrupo leucemia/linfoma de Burkitt (cujos blastos tem origem de células B do centro germinativo) (WIEMELS, 2012). Em 80% dos casos a expansão clonal das células leucêmicas na LLA decorre de linhagem de linfócitos B e em 20% decorrem da linhagem dos linfócitos T (PUI *et al.*, 2004; CHEOK; EVANS, 2006; ONCIU, 2009). Subtipos imunofenotípicos de linfoblastos de células B exibem uma variedade de anormalidades genéticas. Várias vias moleculares estão envolvidas na patogênese (WIEMELS, 2012).

Na maioria dos casos de LLA na infância, são observadas alterações genéticas características, incluindo as alterações cromossômicas numéricas e estruturais como hiperdiploidia (>46 cromossomos, um ou mais cromossomos supranumerários) ou translocações, bem como mudanças mais sutis na forma de mutações pontuais e deleções de genes. Essas anormalidades citogenéticas têm significado relevante no prognóstico do paciente, visto que os blastos hiperploides têm prognósticos favoráveis e algumas translocações como a t(9;22), t(4;11) e t(1;19) estão associadas ao mau prognóstico da doença (JABBOUR *et al.*, 2005; WIEMELS, 2012).

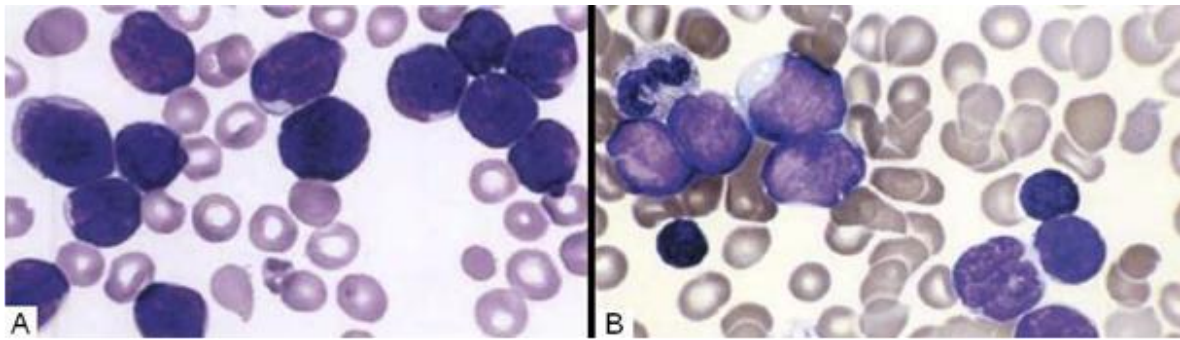


Figura 4 – Subtipos da LLA de acordo com a Classificação da OMS. A Leucemia linfoblástica precursor B. Esfregaço de medula óssea. Vários linfoblastos com uma relação núcleo citoplasma alta e variável e com condensação de cromatina. B Leucemia linfoblástica precursor T. Esfregaço de sangue. Os linfoblastos variam de tamanho em células grandes e pequenas com uma alta relação núcleo citoplasma. Fonte: JAFFE et al., 2001.

As alterações genéticas, mas comuns incluem hiperdiploidia e translocações (BCR-ABL, E2A-PBX1, TCR). Entre as células T de pacientes com LLA, a metade apresenta cariótipo normal enquanto que as translocações recorrentes são vistas em um terço dos pacientes (JABBOUR *et al.*, 2005).

A LLA é uma doença que se caracteriza pelo acúmulo de linfoblastos em numerosos órgão e tecidos, notadamente na medula óssea e sangue periférico. Devido à vantagem proliferativa das células leucêmicas sobre as células normais na medula óssea, a função do sistema hematopoiético fica prejudicada o que resulta em anemia, trombocitopenia e diminuição da imunidade celular. A infiltração pelas células leucêmicas para outros órgãos determina o aumento do fígado (hepatomegalia), baço (esplenomegalia) e linfonodos (linfadenomegalias). Outros órgãos como timo, rim, pele, gônadas e sistema nervoso podem também ser comprometidos (ZAGO *et al.*, 2004).

Os pacientes apresentam sintomas relacionados à diminuição da produção de células normais da medula óssea e, conseqüentemente, a redução de componentes do sangue da circulação: a) diminuição na produção de glóbulos vermelhos e hemoglobina (palidez, cansaço fácil e sonolência); b) diminuição na produção de plaquetas (hematomas não traumáticos, petéquias e sangramentos prolongados de pequenos ferimentos); c) diminuição na produção de glóbulos brancos (aumento do risco de infecções).

Os linfoblástos leucêmicos podem se acumular no sistema linfático levando aumento dos linfonodos. Tais células podem também se alojar no líquido céfalo-raquidiano, causando cefaléia e vômito.

1.2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

O diagnóstico definitivo da leucemia tem base no exame da medula óssea, considera-se o diagnóstico de leucemia quando em torno de 20% a 30% das células nucleadas da medula óssea consiste de blastos (BENNETT *et al.*, 1976).

O hemograma está na maioria dos casos alterados, anemia, trombocitopenia e presença de blasto são alterações frequentes encontrados na leucemia, em 20% dos indivíduos com leucemia linfoblástica aguda não é possível evidenciar a presença de blastos (GAJJAR *et al.*, 1995). Para determinar a classificação dos subtipos de Leucemia são realizados exames citogenético (cariótipo) e imunofenotípico.

Os exames radiográficos comumente mostram alterações que são sugestivas de leucemia (GALLAGHER *et al.*, 1996). Também são feitos exames do líquido cefalorraquidiano (LCR) para atestar infiltração das células leucêmicas no sistema nervoso central (ZAGO *et al.*, 2004).

1.2.4 TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Até meados dos anos 1980, as leucemias eram a causa mais comum de mortes em crianças acometidas com câncer em todo mundo (MILLER; MCKAY, 1984). A regressão da mortalidade começou com o progresso terapêutico devido a ação dos agentes quimioterápicos contra os blastos leucêmicos (INCA, 2011). A sobrevida livre de leucemia por mais de cinco anos é condicionado como critério de cura nessa doença, atualmente a leucemia linfoblástica aguda é curada em cerca de 80% nas crianças submetidas a regimes quimioterápicos (PUI, 2000; PUI; EVANS, 2006).

O objetivo no tratamento das leucemias é extinguir as células leucêmicas para que a medula óssea possa ter o seu funcionamento normalizado (PUI; EVANS, 2006; INCA, 2011).

Uma das características do tratamento da LLA na infância é a dependência de estratificação com base no risco. Os pacientes podem ser classificados em grupos com base em risco de falha do tratamento. Aqueles com características favoráveis

podem ser tratados com regimes menos tóxicos, enquanto que os regimes mais agressivos são reservados para aqueles com doença de risco elevado.

Várias características clínicas têm sido mostradas para ajudar nesta classificação, incluindo idade e contagem de células brancas do sangue na apresentação. Idade entre 1 e 10 anos é uma característica de risco normal, com doença mais agressiva observada em lactentes e aqueles com mais de 10 anos (MÖRICKÉ *et al.*, 2005). A contagem de células brancas superior a 50.000/microL também constitui um fator de mau prognóstico.

Os pacientes tratados com corticosteróides antes de sua investigação diagnóstica completa também são considerados como de alto risco, como a tremenda eficácia de esteróides para tratar LLA pode subestimar contagem de células brancas do sangue inicial e limitar a confiança no estadiamento.

As características das células leucêmicas, também, podem ser utilizadas para determinar se os pacientes estão em maior risco. A imunofenotipagem descreve as células leucêmicas em termos das proteínas que são expressas, e se os mesmos são mais semelhantes às células que se transformam eventualmente linfócitos B ou linfócitos T. Esta determinação também tem mostrado afetar o prognóstico.

Em aproximadamente 80%, a maioria dos pacientes pediátricos com LLA tem imunofenótipo B, que abrange uma ampla gama de pacientes, incluindo muitos dos pacientes de menor risco com LLA pediátrica.

Por outro lado, aqueles com imunofenotipagem de células T compreendem aproximadamente 10% a 15% de todas as LLA pediátrica, e têm sido historicamente associada com uma taxa de cura mais baixa. No entanto, a identificação desses pacientes e tratamento com regimes mais agressivos levou a taxas de sobrevivência que se aproximam do tipo B (REITER *et al.*, 1994; GAYNON *et al.*, 2010), embora um subconjunto específico de LLA de células T tem sido associada a um prognóstico pobre em alguns estudos (HAYDU; FERRANDO, 2013). Há grupos leucemias agudas indiferenciadas que não podem ser suficientemente caracterizadas como linfóide ou mielóide, quer de origem, bem como aquelas linhagens bifenotípica que incluem marcadores de origem mielóides e linfóides e/ou tanto de células B e de células T. Estes imunofenótipos ambíguos estão associados a um pior prognóstico (GERR *et al.*, 2010).

Anomalias citogenéticas recorrentes nos blastos leucêmicos permite uma classificação molecular de risco. As duas mais bem estabelecidas aberrações

citogenéticas favoráveis incluem alta hiperdiploidia e a proteína de fusão ETV6/RUNX1, resultado da translocação t(12;21).

Alta hiperdiploidia é visto em 20% a 25% dos casos de LLA tipo B, é definida como 51 a 65 cromossomas por célula ou um índice de DNA maior do que 1,16, e é particularmente favorável quando associado com trissomia simultânea 4 e 10 (HARRIS *et al.*, 1992). A translocação t(12; 21) também é visto em cerca de 20% a 25% dos casos de LLA tipo B, e está associada com a melhoria da sobrevivência, incluindo a melhora da sobrevida, mesmo depois de recaída (SEEGER *et al.*, 2001). Ambos os subgrupos favoráveis ocorrem em menor frequência em afro-americanos (africanos subsaarianos) (POLLOCK *et al.*, 2000; RUBNITZ *et al.*, 2008). Várias alterações citogenéticas desfavoráveis também foram identificados. Uma característica fortemente associada com mau resultado é hipodiploidia, definido como menos de 44 cromossomos ou um índice de DNA de menos de 0,81. Alterações citogenéticas adicionais associados com maior risco LLA incluem a fusão BCR-ABL de t (9; 22), conhecido como o cromossoma Filadélfia (observados em 3% de todos os casos de LLA pediátrica), e mais recentemente identificado, amplificação intracromossomal do cromossomo 21 (iAMP21, visto em 1% -2% do LLA tipo B) (HEEREMA *et al.*, 2013).

Além destas características que são usados para informar prognóstico, a resposta à terapia inicial surgiu como um preditor independente particularmente potente. Tradicionalmente uma remissão completa foi definida como menos do que 5% de blastos detectáveis sobre a morfologia microscópica, no final da indução. Falha de indução é observada em cerca de 3% a 5% das crianças com diagnóstico recente de LLA e indica um prognóstico muito mau, com uma sobrevivência global de cerca de 33%. Ele é mais associado com pacientes com imunofenótipo de células T, imunofenótipo de células B com uma alta contagem de leucócitos, o cromossoma Filadélfia e idade avançada (SCHRAPPE *et al.*, 2012).

Os regimes terapêuticos para LLA são realizados por grupos cooperativos multicêntricos de vários países. O protocolo quimioterápico mais utilizado por grandes centros de tratamento da LLA no Brasil é o protocolo GBTLI LLA-99 de 2009 (Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda na Infância). O esquema terapêutico GBTLI LLA-99 está descrito na Tabela 6 e 7.

Tabela 6 – Medicamentos e doses específicas no protocolo GBTLI-99 para o tratamento de LLA com baixo risco de recaída.

| Etapa (Duração) | Medicamentos (Doses) | |
|--|--|--|
| Indução da remissão (4 semanas) | Prednisona (40 mg/m ² /dia) Vincristina (1,5 mg/m ² /sem) L-asparaginase (5000 UI/m ² /dia) Daunorrubicina (25mg/m ² /semana) MADIT | |
| Consolidação da remissão (2 semanas) | Ciclofosfamida (1 g/m ² /dose) Citarabina (75 mg/m ² /dose) 6-Mercaptopurina (50 mg/m ² /dia) MADIT | |
| Intensificação (8 semanas) | Metotrexato (2 g/m ² /dose) 6-Mercaptopurina (50 mg/m ² /dia) MADIT | |
| Consolidação tardia (8 semanas) | Dexametasona (6mg/m ² /dia) Vincristina (1,5 mg/m ² /dose) Doxorrubicina (30mg/m ² /dose) L-asparaginase (5000 UI/m ² /dose) Ciclofosfamida (1 g/m ² /dose) Tioguanina (60mg/m ² /dia) MADIT | |
| Manutenção (1 ano e meio – pacientes são aleatoriamente colocados em um dos grupos) | GRUPO 1 | GRUPO 2 |
| | 6-Mercaptopurina (50 mg/m ² /dia) + Metotrexato (25 g/m ² /dose) contínuos Pulso de Vincristina (1,5 mg/m ² /dia) + Dexametasona (4mg/m ² /dia) MADIT | 6-Mercaptopurina (100 mg/m ² /dia) + Metotrexato (200 g/m ²) intermitentes Pulso de Vincristina (1,5 mg/m ² /dia) + Dexametasona (4mg/m ² /dia) MADIT |

Nota: GBTLI = Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância;

MADIT = Combinação de Metotrexato, Citarabina e Dexametasona administrada intratecalmente.

Tabela 7– Medicamentos e doses específicas no protocolo GBTLI-99 para o tratamento de LLA com alto risco de recaída.

| Etapa (Duração) | Medicamentos (Doses) | |
|--|---|---|
| Indução da remissão (4 semanas – pacientes são aleatoriamente colocados em um dos grupos) | Prednisona (40 mg/m ² /dia) Vincristina (1,5 mg/m ² /sem) L-asparaginase (5000 UI/m ² /dia) Daunorrubicina (25mg/m ² /semana) MADIT | Prednisona (40 mg/m ² /dia) Vincristina (1,5 mg/m ² /sem) L-asparaginase (5000 UI/m ² /dia) Daunorrubicina (25mg/m ² /semana) Metotrexato (1 g/m ² /dose) MADIT |
| Consolidação – Bloco A (1 semana) | Metotrexato (2 g/m ² /dose) Tioguanina (100mg/m ² /dia) Citarabina (2 mg/m ² /dose) Ciclofosfamida (200 g/m ² /dose) MADIT | |
| Consolidação – Bloco B (1 semana) | Vincristina (1,5 mg/m ² /dose) Metotrexato (2 g/m ² /dose) 6-Mercaptopurina (150 mg/m ² /dia) Citarabina (2 mg/m ² /dose) MADIT | |
| Intensificação (8 semanas) | Dexametasona (6mg/m ² /dia) Vincristina (1,5 mg/m ² /dose) Doxorrubicina (30mg/m ² /dose) L-asparaginase (5000 UI/m ² /dose) Ciclofosfamida (1 g/m ² /dose) Citarabina (75 mg/m ² /dose) Tioguanina (60mg/m ² /dia) MADIT | |
| Consolidação – Bloco C (1 semana) | Metotrexato (2 g/m ² /dose) 6-Mercaptopurina (150 mg/m ² /dia) Etopósido (150 mg/m ² /dia) Citarabina (2 mg/m ² /dose) | |
| Consolidação – Bloco D (1 semana) | Ifosfamida (1,8 g/m ² /dia) Etopósido (150 mg/m ² /dia) MADIT | |
| Consolidação tardia (8 semanas) | Dexametasona (6mg/m ² /dia) Vincristina (1,5 mg/m ² /dose) Doxorrubicina (30mg/m ² /dose) L-asparaginase (5000 UI/m ² /dose) Ciclofosfamida (1 g/m ² /dose) Citarabina (75 mg/m ² /dose) Tioguanina (60mg/m ² /dia) MADIT | |
| Manutenção (1 ano e meio) | 6-Mercaptopurina (50 mg/m ² /dia) + Metotrexato (25 g/m ² /dose) contínuos Pulso de Vincristina (1,5 mg/m ² /dia) + Dexametasona (4mg/m ² /dia) MADIT | |

Nota: GBTLI = Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância;
MADIT = Combinação de Metotrexato, Citarabina e Dexametasona administrada intratecalmente.

A base terapêutica da leucemia linfoblástica aguda foi estabelecida por (PINKEL, 1971) e consiste na combinação de diferentes quimioterápicos. Esse autor determinou a administração de diferentes fármacos durante três fases de terapia; a indução, consolidação e manutenção em um período 2,5 a 3 anos de tratamento. Os nomes dessas fases variam dependendo do tipo de leucemia (linfóide ou mielóide), na LLA as fases são denominadas indução, consolidação, reindução, manutenção e tratamento dirigido ao sistema nervoso central (INCA, 2011).

A primeira etapa, indução, tem a finalidade de diminuir as células leucêmicas ao ponto de permitir o retorno do funcionamento normal da medula óssea e conseqüente melhoria do estado do paciente, o tratamento consiste na utilização de pelo menos três quimioterápicos: Glicocorticóide (Prednisona e/ou dexametasona) o antimetabólico vincristina e L-asparaginase e em caso de leucemias de alto risco, é administrada uma quarta medicação geralmente antraciclina. A remissão completa das células leucêmicas é conseguida entre um e dois meses após o início do tratamento. Isso ocorre quando os exames de sangue e da medula óssea (remissão morfológica) e o exame físico (remissão clínica) não demonstram mais anormalidades (INCA, 2011). As fases seguintes (consolidação, reindução, manutenção e tratamento dirigido ao sistema nervoso central) possuem a finalidade de eliminar definitivamente as células leucêmicas malignas da medula óssea (PUI; EVANS, 2006).

Daqueles que não atingem a conclusão da remissão até o final de indução, metade sofre falha de indução e o restante sucumbem à mortalidade relacionada com o tratamento. Para aqueles com falha de indução, um transplante de medula óssea alogênico é geralmente indicado, embora não exista uma norma de consenso dos cuidados em relação à quimioterapia usada para atingir remissão antes do transplante (SCHRAPPE *et al.*, 2012).

Na consolidação visa-se erradicar a doença residual que permanece após a remissão completa obtida; para isto, são administrados fármacos antimetabólitos, geralmente metotrexato (MTX) e 6-mercaptopurina (6-MP). Nas primeiras semanas após a remissão ser obtida, o tratamento da indução é repetido duas vezes em um intervalo de oito semanas o que é chamado de reindução (repetição dos medicamentos usados na fase de indução) (SEIBEL *et al.*, 2008; INCA, 2011).

O tratamento da manutenção varia de acordo com a severidade da LLA, em pacientes com alto risco o tratamento é mais intensivo, e em pacientes com baixo

risco são administrados semanalmente metotrexato e diariamente 6-mercaptopurina. O tratamento direcionado ao sistema nervoso tem a finalidade de evitar recidivas de células leucêmicas no sistema nervoso central, e é feito através de radioterapia ou quimioterapia intensiva (ZAGO *et al.*, 2004). Geralmente dura pelo menos 2 anos (prorrogado até três anos para os meninos em alguns protocolos), é administrado em regime de ambulatório, e normalmente está associada a toxicidade menos perturbadora. A grande dificuldade da terapia de manutenção é a terapia com metotrexato e mercaptopurina, ambos disponíveis em formulações orais, tornando a estrita observância crucial (BHATIA *et al.*, 2012). Além disso, novas evidências sobre os farmacogenômica destas drogas destaca a importância das diferenças interindividuais no metabolismo. Por exemplo, polimorfismos genotípicas na enzima tiopurina-metiltransferase está associada com o aumento da mielossupressão e outras toxicidades, ao passo que outros polimorfismos conferem um estado "hipermetabolizador", com níveis diminuídos do metabólito ativo (BRACKETT *et al.*, 2014). Entender essas diferenças no metabolismo é particularmente importante porque estudos mostraram que o grau de mielossupressão correlaciona com o risco de recaída (SCHMIEGELOW *et al.*, 1995, 2010). Conseqüentemente, muitos protocolos incluem orientações para ajustes de dose para ajudar a alcançar a meta de equilibrar os riscos de mielossupressão inadequada com os riscos de pancitopenia grave (infecção, sangramento, e assim por diante) . Alguns regimes também incluem vincristina mensal e esteroides (EDEN *et al.*, 2010).

O quarto componente do tratamento de todos é a terapia dirigida contra o Sistema nervoso central (SNC). Esta abordagem inclui tanto o tratamento de pacientes com doença clínica do SNC no diagnóstico e profilaxia de doentes com doença sub-clínica. A importância deste componente foi claramente demonstrado antes da década de 1970, quando o tratamento não tinham este componente. Embora a remissão da medula óssea fosse alcançada utilizando a quimioterapia sistêmica, a maioria das crianças desenvolveram eventualmente recidiva no SNC na ausência de terapia específica dirigida a esse local de refúgio (EVANS *et al.*, 1970).

Existem vários métodos de conseguir o objetivo de erradicação de doenças do SNC, incluindo a administração direta intratecal de quimioterapia, a administração sistêmica de quimioterapia capaz de penetrar a barreira hemato-encefálica, e a radiação craniana. Opções para quimioterapia intratecal incluem metotrexato, incluindo intratecal ou uma combinação de metotrexato intratecal, citarabina, e

hidrocortisona (conhecido como intratecal tripla) (MATLOUB *et al.*, 2006). Quimioterapia administrada sistemicamente com efeitos sobre o SNC inclui dexametasona, metotrexato em altas doses, citarabina, e asparaginase.

Dado o risco de toxicidade da radiação craniana, manifestando-se principalmente como deficiência intelectual (principalmente com pacientes mais jovens) e como segunda neoplasias malignas, a sua utilização tem sido progressivamente em declínio. Muitos protocolos reservam a sua utilização somente para aqueles com maior risco de recaída no SNC. Para os pacientes com doença do SNC evidente, vários estudos têm demonstrado o aumento das dosagens das medicações sistêmicas e intratecal, adiam ou suspendem o uso da radiação craniana. No entanto, estudos maiores são necessários para confirmar esta estratégia (PUI *et al.*, 2009; SIRVENT *et al.*, 2011).

O papel do transplante de células estaminais hematopoiéticas (TCEH) é considerado para aqueles pacientes com o mais alto risco de recidiva e/ou falha do tratamento. Princípios gerais de transplante para todos, incluem o uso de irradiação total do corpo (ITC) no regime preparatório. O doador ideal tem sido historicamente um irmão compatível, apesar de avanços com fontes de doadores alternativos estão agora também se mostrando uma boa opção (HOCHBERG *et al.*, 2013).

Apesar dos avanços significativos no tratamento, aproximadamente 15% a 20% dos pacientes sofre recaídas, a causa mais comum de recidiva é falha do tratamento. Com a terapia intensiva, que pode incluir o transplante, a sobrevida global da recaída de LLA é de aproximadamente 40% (LOCATELLI *et al.*, 2012). Para pacientes com recaída de LLA de células tipo B, dentro de 18 meses da data do diagnóstico é pior, aqueles que ocorrem entre 18 e 36 meses tem prognóstico intermediário, e recaídas tardias que ocorrem mais de 3 anos têm o melhor prognóstico, com sobrevida livre de eventos de 50% (CHESSELLS, 1998).

Sítio de recaída é outro fator de risco importante a considerar na recidiva da doença, com recorrências na medula como o local mais comum, ocorrendo em 50% a 60% dos casos. O restante compreende doença do SNC, em cerca de 20%, doença testicular em cerca de 5%, e uma combinação de medula e doença extramedular no restante. Recaídas extramedular tem o melhor prognóstico, com os piores resultados observados em recaídas de medula isoladas. Aquelas combinam recidiva medula combinada com a extramedular têm um prognóstico intermediário (NGUYEN *et al.*, 2008).

O grupo de risco no diagnóstico inicial demonstrou desempenhar também um papel na definição de recaída. Esta descoberta é particularmente verdadeira quando se considera aqueles com imunofenótipo de células T, que experimentam um prognóstico particularmente ruim após recaída. Tal como acontece com pacientes com diagnóstico recente de tudo, a resposta à quimioterapia tem significância prognóstica. Aqueles com doença morfológica persistente após o primeiro ciclo de quimioterapia de reindução tem mau prognóstico, e aqueles com uma remissão morfológica (COUSTAN-SMITH *et al.*, 2004; ECKERT *et al.*, 2013).

A aplicação de anormalidades citogenéticas na estratificação do risco de recidiva LLA tem sido limitada. Por exemplo, aqueles com recidiva de doença que demonstram mutação ETV6-RUNX1 têm um prognóstico relativamente favorável, com uma sobrevida livre de eventos de mais de 80% em 36 meses (GANDEMER *et al.*, 2012). Por outro lado, mutação TP53 mostrar um particularmente pobre prognóstico (HOF *et al.*, 2011).

Reindução quimioterápica após a primeira recaída é bem sucedido em induzir a remissão completa em 65% a 85% (PARKER *et al.*, 2010). Os regimes de quimioterapia utilizados variam por instituição e protocolo, mas é muitas vezes a mesma usada no diagnóstico inicial, porém ainda não existe consenso. Uma vez que uma segunda remissão completa foi obtido, o tratamento pós-remissão varia de acordo com o risco.

Os pacientes com imunofenótipo de células T ou doença de células tipo B são geralmente tratadas com o transplante. Aqueles com recaídas tardias de LLA de células tipo B pode ser curada com apenas quimioterapia (RIVERA *et al.*, 1996).

Doentes com recidiva no sistema nervoso central (SNC) isolada geralmente recebem uma combinação de quimioterapia e radioterapia craniana, com quimioterapia administrado em primeiro lugar para evitar uma recaída medular. Radiação espinhal não tem aumentado a eficácia, e, portanto, a adição de radiação espinhal tem sido amplamente abandonada em ensaios contemporâneos. Para as recidivas no SNC de LLA de células que ocorrem mais de 18 meses a partir do diagnóstico, as taxas de sobrevivência de 70% podem ser conseguido com radioquimioterapia sozinho e, portanto, o transplante geralmente não é necessária. Para aqueles com início recaídas isoladas no SNC e/ou imunofenótipo de células T, o prognóstico é pior, e o transplante é muitas vezes necessário, embora não existem dados claros sobre se o transplante leva a resultados superiores.

Tratamento de recaída isolada testicular também depende da duração da indução inicial, com piores resultados para os pacientes que experimentam uma recaída testicular isolado enquanto continua a receber a terapia inicial. A terapia para recaída testicular geralmente consiste de quimioterapia intensiva reindução (frequentemente incluindo metotrexato de dose elevada), seguida por radiação testicular ou orquidectomia se a remissão completa não é conseguida (WOFFORD *et al.*, 1992).

A terapia para a segunda e subsequentes recidivas é variada e sem orientação baseada em evidências claras. Sobrevivência à longo prazo é geralmente pobre para estes pacientes. Infusões de leucócitos doador são geralmente mal sucedida em conseguir remissões duradouras em recaída de LLA após o transplante, particularmente quando usado como monoterapia (LEVINE *et al.*, 2008).

1.2.4.1 GLICOCORTICÓIDES

No tratamento da LLA, os glicocorticóides (prednisona e dexametasona) são administrados no início do tratamento (Indução). O principal mecanismo de ação dos glicocorticóides é induzir a apoptose das células blásticas, portanto apresentam um papel fundamental no tratamento da LLA, os pacientes que não respondem a quimioterapia apresentam pior prognóstico de sobrevida (PIZZO; POPLACK, 2011).

O corticosteróide geralmente usado é a prednisona ou dexametasona, com dexametasona demonstrando melhorada penetração no SNC e com menor risco de recaída, mas com o aumento da incidência de toxicidade, incluindo a necrose avascular, infecção, e redução no crescimento linear, obesidade centrípeta, imunossupressão, miopatia, osteonecrose, ulcera péptica, pancreatite, desordens psiquiátricas, cataratas, hipertensão, déficit de crescimento, diabetes e amenorreia (PUI; EVANS, 2006; PIZZO; POPLACK, 2011).

1.2.4.2 ASPARAGINASE

Asparaginase sintetase (ASNS) é uma enzima que realiza a hidrólise da asparaginase em ácido aspártico um dos fármacos utilizados na terapia para LLA (PUI; EVANS, 2006).

A quimioterapia com ácido aspártico parte do princípio que células tumorais não são capazes de converter asparagina por apresentarem baixas expressão do gene *ASNS* em contraste com células normais. Desta forma a terapia com asparagina em pacientes com LLA induz apoptose celular direcionada as células tumorais. Logo níveis elevados de expressão do gene *ASNS* em células tumorais podem contribuir para um mecanismo de resistência a terapia (CHEOK *et al.*, 2009).

As principais manifestações clínicas associadas ao uso da asparaginase são em decorrência de reações alérgicas ao seu substrato, também são observadas Coagulopatias, diabetes, encefalopatia grave, trombose de seio cavernoso e pancreatite hemorrágica (PUI; EVANS, 2006; PIZZO; POPLACK, 2011).

1.2.4.3 METOTREXATO

O metotrexato (MTX) é amplamente utilizado no tratamento da LLA na infância. O MTX é um inibidor competitivo do ácido fólico, componente essencial na síntese de purinas e pirimidinas (JONSSON; KAMEN, 1991; CHEOK *et al.*, 2009). O gene *MTHFR* (Metiltetrahidrofolato redutase) codifica uma enzima importante no metabolismo do folato, que catalisa a conversão de 5,10-methilenotetra-hidrofolato (5,10-MTHF) a 5-metilenotetrahidrofolato (5-MTHF).

O gene *MTHFR* está associado à metabolização do Metotrexato, polimorfismos nesse gene provocam alterações no pool de folato que pode levar a um aumento de toxicidade em pacientes tratados com MTX durante o tratamento da LLA infantil (GOTO *et al.*, 2001).

A reação adversa do MTX geralmente está relacionada com a concentração da droga e período de exposição. Seu principal efeito é mielossupressão e mucosite gastrointestinal que ocorre 5 a 14 dias após a administração do fármaco. A nefrotoxicidade pode ocorrer direta ou indiretamente em nível de túbulos renais e prejudicar a excreção do MTX promovendo a piora de outros efeitos adversos. A toxicidade hepática é observada através do aumento transitório de transaminases, hiperbilirrubinemia e em casos raros é observado fibrose hepática em pacientes que utilizam baixas doses de MTX por longos períodos. Alterações dermatológicas como dermatite, reação alérgica podem ser notadas assim como pneumonites e osteopatia incluindo dor óssea, osteoporose com relatos de risco de fratura. Neurotoxicidade

com altas doses de MTX pode desencadear convulsões, encefalopatia aguda ou crônica (PUI; EVANS, 2006; PIZZO; POPLACK, 2011).

1.2.4.4 6-MERCAPTOPURINA

A 6-mercaptopurina (6-MP) é um dos principais medicamentos utilizados durante o tratamento da LLA, consisti em um antimetabólito que faz parte das Tiopurinas, fármacos utilizados em uma variedade de condições clínicas (Sahasranaman et al., 2008).

A 6-MP é amplamente estudado na literatura, com vários polimorfismos relacionados ao gene Tiopurina Metiltransferase (*TPMT*) (BOSON *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2003; STANULLA *et al.*, 2005; ZHOU, 2006; KAPOOR *et al.*, 2009; RELLING *et al.*, 2011). Mutações nesse gene podem alterar a resposta terapêutica do paciente ao 6-MP, resultando em sérios efeitos adversos, podendo ser fatal em muitos casos (RELLING *et al.*, 1999).

1.3 MECANISMO DE AÇÃO DA 6-MERCAPTOPURINA

A 6-MP é análoga das purinas e atuam como antagonista das purinas endógenas que são componentes essenciais do DNA, RNA e de algumas coenzimas. A 6-MP é um análogo da adenina e guanina, uma das bases necessárias para a biossíntese do ácido nucléico. Portanto age como antimetabólito e interfere na síntese dos ácidos nucléicos de células em proliferação (SWANN *et al.*, 1996; INAMOCHI *et al.*, 1999).

Como a maioria das bases púricas a 6- MP requerer passar por um processo de bioativação para ter os seus compostos citotóxicos ativos (SANDBORN *et al.*, 1999; CHABNER *et al.*, 2001). A conversão da 6-MP em nucleotídeos análogos da tioguanina é um processo gradativo e requer a participação de algumas enzimas (Figura 5).

A 6-MP sofre ativação metabólica, especialmente no fígado e no intestino, e após administração oral as transformações químicas sofridas pela droga ocorre por uma via com três passos competitivos. O primeiro metabolismo é realizado pela enzima Xantina Oxidase (XO) que converte a 6-MP em ácido tiúrico (6-TU) um

composto inativo, que pode ser observado na urina e no plasma após a administração da mercaptopurina (ELION, 1989).

O início da ativação é feito pela enzima Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) resultando em nucleotídeos citotóxicos (TGN) como o 6-tioguanina (6-TGN) responsável pela atividade imunossupressora (TIDD; PATERSON, 1974; LENNARD; SINGLETON, 1992).

A terceira via metabólica da 6-MP é realizado pela enzima TPMT formando compostos inativos chamados metilmercaptopurina (MMP) (CHALMERS et al., 1969; TAY et al., 1969; ELION, 1989; KRYNETSKI; EVANS, 1999). Uma via alternativa para a citotoxicidade é feita pela enzima TPMT por meio da reação de metilação da tiomecaptopurina (TIMP) que leva a formação dos 6-TGN. A formação da 6-metil tiomosina 5' monofosfato (6-MeTIMP) a partir da TIMP é um processo importante uma vez que este composto é um potente inibidor da síntese de novas purinas impedindo, portanto, o ciclo celular (CHALMERS et al., 1969; TAY et al., 1969; ELION, 1989; KRYNETSKI; EVANS, 1999).

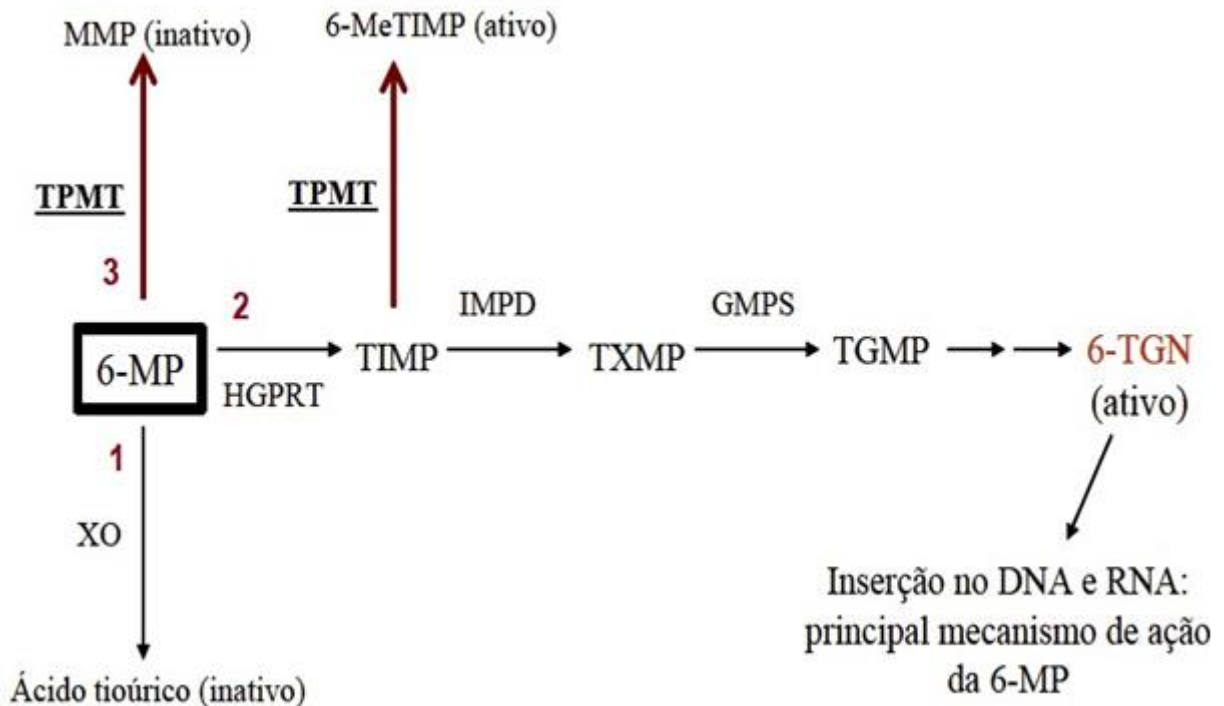


Figura 5 – Mecanismo de metabolização do fármaco 6-MP. 1, 2 e 3 evidenciam os passos da via metabólica da 6-MP. IMPD (Inosina monofosfato desitrogenase), TXMP (tioantina monofosfato), GMPS (Guanosina monofosfato sintase) e TGMP (Tioguanina monofosfato). Fonte: SILVA, 2007.

O principal mecanismo de ação do fármaco 6-MP é a incorporação dos metabólitos 6-TGN ao DNA e RNA, esses compostos são incorporados ao DNA pelo pareamento incorreto com a timina, essa incorporação anormal é reconhecida pelo sistema de reparo das células resultando na parada do ciclo celular das células em proliferação (SWANN *et al.*, 1996; GIVERHAUG *et al.*, 1999).

A deficiência no gene *TPMT* leva a um acúmulo excessivo de nucleotídeos tioguanina- TGNs nos tecidos hematopoiéticos, levando a uma grave toxicidade que pode ser observada em pacientes tratados com esse fármaco (EVANS *et al.*, 1991; RELLING *et al.*, 1999; ZHOU, 2006).

1.3.1 EFEITOS ADVERSOS AO FÁRMACO 6-MERCAPTOPURINA

É ampla a descrição na literatura especializada de diferentes efeitos adversos associados à administração da 6-MP (PRESENT *et al.*, 1980; LENNARD *et al.*, 1997; KIRSCHNER, 1998; DERVIEUX *et al.*, 1999; SANDBORN *et al.*, 1999; DUBINSKY, 2003; HERRLINGER *et al.*, 2004; MARINAKI *et al.*, 2004; SANDERSON *et al.*, 2004). O aparecimento de diferentes efeitos adversos e a intensidade das manifestações desses efeitos pode sofrer variações de indivíduo para indivíduo, em decorrência do nível de atividade do gene *TPMT*.

Pacientes que apresentam a atividade baixa ou intermediária da enzima *TPMT* possuem grande risco de desenvolver toxicidade, quando administrado doses padrões do 6-MP, para esses pacientes são administrados doses reduzidas desse medicamento, para que possam tolerar a terapia (LENNARD *et al.*, 1990, 1993; EVANS *et al.*, 2001; ARICÓ *et al.*, 2005; CHEOK; EVANS, 2006).

A 6-MP é amplamente utilizado no tratamento da LLA durante a fase de manutenção (PUI; EVANS, 2006; INCA, 2010). O principal efeito adverso associado a 6-MP é a mielotoxicidade, seguida de neutropenia. A 6-MP é hepatotóxico e a incidência de hepatotoxicidade em pacientes é variável e pode ocorrer na administração de qualquer dosagem, mais frequentemente quando se excede a dose recomendada diariamente de 50 mg/m² (ARICÓ *et al.*, 2005; CHEOK; EVANS, 2006).

Pacientes com leucemia aguda têm maior predisposição para desenvolver neutropenias geralmente associado à quimioterapia agressiva durante o tratamento por agentes antineoplásicos (PIZZO, 1993; DONOWITZ *et al.*, 2001).

Em pacientes com LLA observa-se com mais frequência neutropenia quando a contagem de neutrófilo é inferior a $500/\text{mm}^3$. Além da neutropenia, observam-se alterações na função fagocítica e dano da barreira da mucosa resultando em mucosite (COREY; BOECKH, 2002).

A neutropenia associada ao tratamento de leucemia é a principal causa relacionada a infecções, com um risco maior para bacteremia e sepse (NOSKIN *et al.*, 1997). As infecções decorrentes da neutropenia são as principais causas de mortes em crianças com câncer em tratamento quimioterápico (BROWN *et al.*, 1993; PAGANINI, 1999; RAY-COQUARD *et al.*, 2001; MIRANDA *et al.*, 2002).

Os principais efeitos adversos relatados em diferentes publicações, associados com o uso do 6-MP são: Neutropenia, mielossupressão, náuseas, episódios de vômito, icterícia, anorexia, febre, erupções cutâneas, pancreatite, hepatotoxicidade, leucopenia leve, sintomas gripais, trombocitopenia, granulocitopenia e anemia (PRESENT *et al.*, 1980; LENNARD *et al.*, 1997; KIRSCHNER, 1998; DERVIEUX *et al.*, 1999; DUBINSKY, 2003; HERRLINGER *et al.*, 2004; SANDERSON *et al.*, 2004; SANDBORN *et al.*, 2009).

1.4 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA NO ESTADO DO PARÁ

SILVA *et al.*, (2011) realizaram um estudo de levantamento de dados de 92 crianças portadoras de LLA na infância atendidos período de Janeiro de 2005 a Janeiro de 2008 no serviço de quimioterapia no Hospital Ophir Loyola, referência no tratamento de câncer da região Norte do Brasil. O estudo observou taxas de cura em torno de 34% em crianças submetidas ao tratamento para LLA, este índice é considerado baixo quando comparado a outras regiões nacionais e mesmo outros países onde a taxa de cura para LLA é de aproximadamente 80% (PUI; EVANS, 2006; SILVA *et al.*, 2011). Os protocolos de quimioterapia empregada no tratamento das crianças portadoras de LLA atendidas no Hospital Ophir Loyola foram as mesmas utilizadas em outros centros de tratamento de leucemias tanto nacionais (região Sul e Sudeste do Brasil) quanto internacionais (em populações Européias e americanas).

Este estudo demonstrou a procedência e número de casos de pacientes pediátricos com LLA no estado do Pará, 59% das crianças provem do interior do Pará, 30% da região metropolitana de Belém (Figura 6).

No estudo foi descrito os aspectos tóxicos da terapia submetida aos pacientes de LLA Hospital Ophir Loyola, segundo os critérios do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI/NIH). Observou-se que a maior incidência de toxicidades nos pacientes com LLA provinham de neutropenia e infecções, conforme evidenciado pela Figura 7. O índice de mortalidade dos pacientes com LLA nesse estudo foi de 55,5 %.

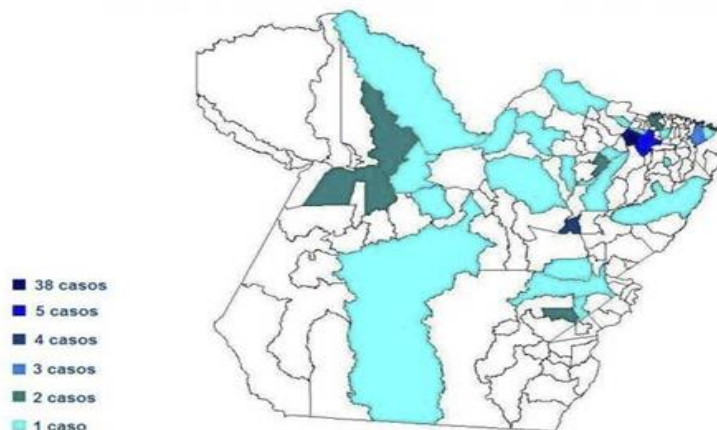


Figura 6 – Procedência e números de casos por município de pacientes pediátricos portadores de LLA no estado do Pará. Fonte: SILVA *et al.*, 2011.

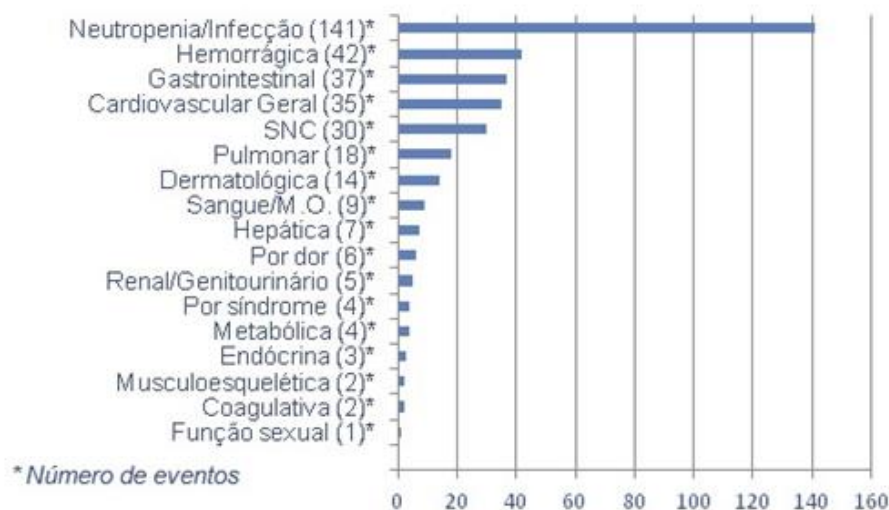


Figura 7 – Frequência de Toxicidade em pacientes pediátricos portadores de LLA provenientes do estado do Pará. Fonte: SILVA *et al.*, 2011.

A hipótese principal do presente estudo envolve a variabilidade genética em gene de resposta ao quimioterápico 6-MP a qual pode se explicar, em parte, a baixa taxa de sobrevivência de pacientes portadores de LLA. Pesquisas em farmacogenética podem contribuir para melhor caracterizar o perfil de resposta farmacológica desses pacientes e dessa forma, contribuir para um melhor prognóstico terapêutico.

1.5 FARMACOGENÉTICA

Em todo mundo é conhecido a grande variabilidade na eficácia e na toxicidade causadas pelos medicamentos usados no tratamento de diferentes enfermidades (EICHELBAUM *et al.*, 2006). Diversos fatores tais como: sexo, idade, etnia, fumo, etilismo e variações genéticas podem influenciar na resposta de um paciente ao medicamento (EVANS; JOHNSON, 2001; SADÉE; DAI, 2005). Neste contexto a farmacogenética se enquadra por estudar como as diferenças genéticas influenciam na resposta a agentes farmacológicos (EVANS *et al.*, 2001; MCLEOD; EVANS, 2001; MEYER, 2004).

Duas das primeiras investigações sobre farmacogenética envolviam a ação da enzima colinesterase sérica em resposta a administração de Suxametônio (anestésico) e o estudo em pacientes tratados com antimaláricos, com hemólise grave causada por deficiência da enzima glicose-6- fosfato desidrogenase (G6PD) (MEYER, 2004).

A abordagem tradicional da farmacogenética baseia-se em estudar polimorfismos na sequência de DNA de genes que, provavelmente, afetam a resposta aos medicamentos. Portanto, o objetivo dos estudos farmacogenéticos é buscar uma terapia individualizada que possa maximizar a eficácia dos medicamentos e minimizar os efeitos colaterais associados aos fármacos (WEINSHILBOUM; WANG, 2005).

É importante que em estudos de associação a população estudada seja homogênea com relação a ancestralidade. Em populações miscigenadas essa homogeneidade não é possível devido a elevada estratificação populacional. Logo compreender a diversidade genética das populações é importante em estudos farmacogenéticos. Desta forma, investigar a diversidade de polimorfismos farmacogenéticos em grupos miscigenados é importante uma vez que a maioria dos estudos são realizados em populações europeias. As investigações

farmacogenéticas em diferentes grupos humanos podem identificar populações que podem se beneficiar mais de um fármaco, ou identificar efeitos colaterais que não são vistos em outras populações (SUAREZ-KURTZ, 2005).

Desde o início, em meados do século passado, o objetivo das pesquisas em farmacogenética foi buscar uma terapia individualizada para maximizar a eficácia dos medicamentos e minimizar os efeitos colaterais associados à utilização destes. Mais recentemente, uma nova linha de ação tem sido desenvolvida, a farmacogenômica, a qual considera que o efeito farmacológico de um fármaco depende da interação de diferentes genes envolvidos na metabolização deste medicamento (WEINSHILBOUM; WANG, 2005; SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2010).

1.5.1 FARMACOGENÉTICA APLICADA AO CÂNCER

A quimioterapia emprega medicamentos ou substâncias químicas, que podem está em diferentes combinações, para matar ou lesar células cancerígenas. Essas substâncias interferem no crescimento das células atuando de maneiras distintas. A maioria dos medicamentos utilizados na quimioterapia não são seletivos, ou seja, afetam não só as células cancerígenas mas também as células normais. A baixa seletividade dos fármacos antineoplásicos contribui para a grande toxicidade que leva a uma frequente morbidade e mortalidade decorrente dos tratamentos, uma vez que os alvos moleculares dos quimioterápicos também estão presentes em células não-tumorais (REIS, 2006). A aplicação da farmacogenética na área oncológica é um processo complexo, por que envolve o difícil manejo clínico da quimioterapia aplicada a dois genomas: O do indivíduo (representada por mutações germinativa) e o do tumor (representada por mutações somáticas) este último apresenta um papel crítico na resposta a terapia antineoplásica (REIS, 2006; WANG *et al.*, 2011).

As variações farmacogenéticas em ambos os genomas podem interferir na reposta terapêutica, nesse quesito a farmacogenética pode ser aplicada na identificação de marcadores moleculares que ajudem na otimização de fármacos, dose e duração de tratamentos, fornecendo conhecimentos para o desenvolvimento de novas terapias (EICHELBAUM *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011).

Existe uma grande variedade de fármacos em que a farmacogenética pode contribuir para o aprimoramento da terapia oncológica, para esses medicamentos a FDA (Food and Drug Administration) recomenda a utilização de testes

farmacogenéticos específicos capazes de prever a resposta do paciente ao medicamento (WANG *et al.*, 2011). Desta forma é possível maximizar a eficácia terapêutica e evitar efeitos tóxicos decorrentes da terapia.

Diversos trabalhos no mundo associam polimorfismos genéticos, em especial SNP (Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos), em genes de metabolização de drogas a resposta terapêutica. (ULRICH *et al.*, 2003; ABRAHAM *et al.*, 2006; DANESI *et al.*, 2008; STEARNS; RAE, 2008). A identificação de genes (e de formas alternativas desses genes) responsáveis por efeitos adversos em resposta aos fármacos pode ser muito útil no estabelecimento de políticas de saúde pública e no desenho e interpretação de ensaios clínicos (SUAREZ-KURTZ, 2007).

A Figura 8 demonstra os principais modelos farmacogenéticos aprovados pela FDA utilizados na prática clínica para terapia antineoplásicas. Entre esse marcadores a FDA recomenda a investigação de polimorfismos no gene *TPMT* associado a resposta farmacológica do 6-MP e Tioguanina.

1.5.2 FARMACOGENÉTICA DA 6-MP

Um dos melhores exemplos da aplicação da farmacogenética na medicina clínica é caracterizado pelos polimorfismos presentes no gene *TPMT* que influencia tanto na toxicidade quanto na eficácia do tratamento terapêutico em diferentes fármacos (WEINSHILBOUM *et al.*, 1999).

A Tiopurina metiltransferase é uma enzima citosólica que participa da metabolização de vários quimioterápicos comumente usados no tratamento de diversas doenças. Entre os medicamentos metabolizados pela TPMT estão os análogos de purina como a azatioprina (AZA), 6-mercaptopurina (6-MP), e 6-tioguanina (6-TG) a estrutura química das tiopurinas é demonstrada na Figura 9 (WOODSON; WEINSHILBOUM, 1983). Esses fármacos são amplamente utilizados em uma variedade de condições clínicas, sendo comumente utilizadas no tratamento de doenças inflamatórias crônicas como inflamações intestinais, neoplasias hematológicas como leucemias, distúrbios auto-imunes e em receptores de transplantes de órgãos (TIDD; PATERSON, 1974; ZIMM *et al.*, 1983; LENNARD; SINGLETON, 1992).

| Tipo de Biomarcadores e Fármacos associados |
|--|
| <i>Biomarcadores com efeito farmacocinético</i> |
| TPMT |
| Mercaptopurina |
| Tioguanina |
| UGT1A1 |
| Irinotecano |
| Nilotinib |
| <i>Biomarcadores com efeitos farmacodinâmicos</i> |
| EGFR |
| Cetuximab |
| Erlotinib |
| Gefitinib |
| Panitumumab |
| KRAS |
| Cetuximab |
| Panitumumab |
| ABL |
| Imatinib |
| Dasatinibe |
| Nilotinib |
| C-Kit (Kit) |
| Imatinib |
| HER2 (ERBB2) |
| Lapatinib |
| Trastuzumab |
| RECEPTOR DE ESTROGÊNIO |
| Tamoxifeno |

Figura 8 – Fármacos aprovados pela FDA referentes a marcadores farmacogenômicos. Fonte: WANG et al., 2011.

O 6-MP é um dos quimioterápicos mais utilizados em todo mundo no tratamento de leucemia linfoblástica aguda na infância. O 6-TP é recomendado no tratamento de leucemia mielóide aguda e no tratamento mais intensivo de leucemia linfoblástica aguda em crianças. AZA é amplamente utilizada no tratamento de doenças inflamatórias intestinas, hepatite auto-imune, artrite reumatóide e em receptores de transplantes de órgãos (JOHNSON *et al.*, 1995; SHAPIRO *et al.*, 2005).

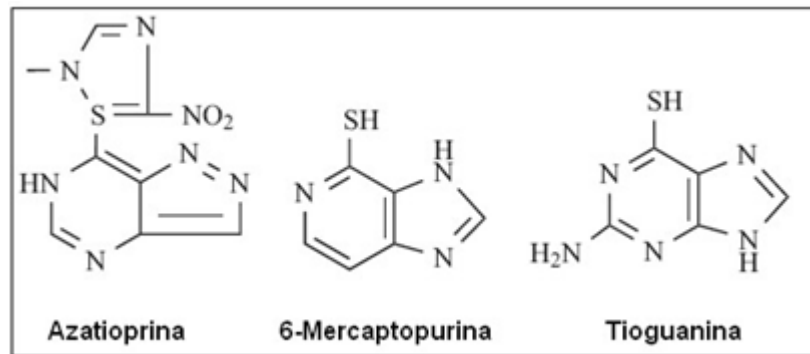


Figura 9 – Estrutura química dos fármacos tiopurina. Fonte: Modificado de Zhou (2006).

A metabolização desses fármacos ocorre a partir de um processo de S-metilação catalisada pela enzima TPMT (WOODSON; WEINSHILBOUM, 1983). Polimorfismos genéticos presentes na sequência de DNA do gene *TPMT* controlam os níveis de atividade dessa enzima nos tecidos humanos (WEINSHILBOUM; SLADEK, 1980).

Pacientes com LLA, submetidos a tratamento com 6-MP, que possuem atividade baixa ou intermediária dessa enzima apresentam risco elevado de desenvolver toxicidade hematopoiética quando submetidos a doses padrões desses medicamentos, enquanto os que apresentam uma alta atividade dessa enzima estão sujeitos a uma ineficácia terapêutica (LENNARD; LILLEYMAN, 1989; LENNARD *et al.*, 1990; WEINSHILBOUM *et al.*, 1999). Portanto, polimorfismos no gene *TPMT* influenciam na toxicidade e na eficácia terapêutica de diversos agentes metabolizados por essa enzima (ELION, 1989).

É importante identificar se o paciente que será submetido a um tratamento que envolva a 6-MP apresenta metabolização intermediária ou deficiente, para que haja uma redução da dose a ser administrada (LENNARD *et al.*, 1990, 1993; RELLING *et al.*, 1999; EVANS *et al.*, 2001).

São relatados na literatura diversos medicamentos que podem influenciar na resposta da atividade da enzima TPMT quando co-administrados com os fármacos tiopurinas. Por exemplo, Aspirina em doses terapêuticas pode levar a inibição da TPMT, assim como sulfassalazina e seus metabólitos, e a olsalazina são potentes inibidores da TPMT. Os diuréticos, furosemida, bendroflumetiazida e triclormetiazida também possuem efeito inibitório sobre TPMT (GLAUSER *et al.*, 1993; SZUMLANSKI; WEINSHILBOUM, 1995; LYSAA *et al.*, 1996; LEWIS *et al.*, 1997).

1.6 GENE *TPMT*- POLIMORFISMOS GENÉTICOS

A enzima *TPMT* é responsável pela metabolização do fármaco 6-MP. Diversas investigações na literatura especializada indicam que polimorfismos no gene *TPMT* influenciam intensamente a atividade da 6-MP no organismo levando a sérios efeitos adversos. Pacientes que apresentam atividade baixa dessa enzima estão sujeitos a sérias toxicidades hematopoiéticas devido ao acúmulo de compostos metabólitos ativos de 6-TGN (KRYNETSKI; EVANS, 1999; RELLING *et al.*, 1999; MCLEOD *et al.*, 2000; CHEOK; EVANS, 2006). A *TPMT* é uma enzima citosólica humana presente na maioria dos tecidos, como coração, células sanguíneas, placenta, pâncreas, intestino e fígado. O gene *TPMT* está localizado no cromossomo 6p22.3 e possui aproximadamente 25Kb com 10 exons e 9 introns (TAI *et al.*, 1997). As alterações na atividade do gene *TPMT* são decorrentes predominantemente de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). Atualmente já foram descritos mais de 30 variantes alélicas do *TPMT*. A tabela 8 demonstra a relação entre os alelos e seus respectivos genótipos.

Tabela 8 – Relação entre os alelos e seus respectivos genótipos.

| Alelo^a | Constituído pelo Genótipo |
|--------------------------|-------------------------------------|
| *1 | Tipo selvagem |
| *1S | G>A no rs2842934 |
| *2 | C>G no rs1800462 |
| *3A | C>T no rs1800460 e T>C no rs1144345 |
| *3B | C>T no rs1800460 |
| *3C | T>C no rs1142345 |
| *4 | C>T no rs1800584 |
| *5 | A>G no rs72552740 |
| *6 | T>A no rs75543815 |
| *7 | A>C no rs72552736 |
| *8 | C>T no rs56161402 |
| *9 | T>G no rs151149760 |
| *10 | C>G no rs72552737 |
| *11 | C>T no rs72552738 |
| *12 ^b | G>A (NM_000367.2:c.374 C>T) |
| *13 | T>A no rs72552742 |
| *14 | T>C no rs9333569 |
| *15 | C>T no rs9333570 |
| *16 | C>T no rs144041067 |
| *17 ^b | G>C (NM_000367.2:c.124 C>G) |
| *18 ^b | C>T (NM_000367.2:c.211 G>A) |
| *19 ^b | T>G (NM_000367.2:c.365 A>C) |
| *20 | T>C no rs150900439 |
| *21 ^b | G>C (NM_000367.2:c.205 C>G) |
| *22 ^b | C>G (NM_000367.2:c.488 G>C) |
| *23 | G>C no rs74423290 |
| *24 | C>A no rs6921269 |
| *25 ^b | A>G (NM_000367.2:c.634 T>c) |
| *26 | A>G no rs72556347 |
| *27 ^b | A>C (NM_000367.2:c.319 T>G) |
| *28 ^b | C>G (NM_000367.2:c.349 G>C) |
| *29 | A>G no rs267607275 |
| *30 (*24) ^b | C>T (NM_000367.2:c.106 G>A) |
| *31 (*28) ^b | A>G (NM_000367.2:c.611 T>C) |

Fonte: RELLING *et al.*, 2013.

Diversos estudos relatam que existe uma grande variação inter individual na atividade do *TPMT*. A atividade desse gene é herdada como uma característica autossômica co-dominante e os seus polimorfismos genéticos já foram descritos na maioria das grandes populações, conforme evidenciado na Tabela 9. Na Tabela 10 observa-se a relação entre as variantes alélicas e a atividade da enzima *TPMT* (WEINSHILBOUM, 2001; MCLEOD; SIVA, 2002; RELLING, 2013).

Tabela 9 – Frequência das variantes alélicas do *TPMT* em diferentes populações.

| Alelo | Caucasiano | Mediterrâneo | Sul americano | Africano | Médio Oriental | Mexicano | Asiático | Sudeste asiático |
|-------|-----------------|--------------|---------------|----------|----------------|----------|----------|------------------|
| *1 | 0,95726 | 0,95233 | 0,95233 | 0,93901 | 0,96987 | 0,92500 | 0,98347 | 0,97837 |
| *2 | 0,00190 | 0,00408 | 0,00876 | 0,000792 | 0,00749 | 0,00592 | 0 | 0,00250 |
| *3A | 0,0356 | 0,0254 | 0,0287 | 0,00198 | 0,0114 | 0,0533 | 0,000118 | 0,00583 |
| *3B | 0,000461 | 0,00426 | 0,000486 | 0 | 0,00562 | 0,00690 | 0 | 0 |
| *3C | 0,004205 | 0,00545 | 0,00924 | 0,0495 | 0,00562 | 0,00888 | 0,0157 | 0,0133 |
| | 0,0000576 (*7) | | | | | | | |
| | 0,0002304 (*9) | | | | | | | |
| *4 – | 0,0000576 (*11) | | 0,000486 | 0,00872 | N/A | N/A | 0,000706 | N/A |
| 26 | 0,0000576 (*12) | N/A | (*4) | (*8) | | | (*6) | |
| | 0,0000576 (*16) | | | | | | | |
| | 0,0000576 (*17) | | | | | | | |
| | 0,0000576 (*18) | | | | | | | |

Fonte:RELLING *et al.*, 2013.

Tabela 10 – Relação entre as variantes alélicas e atividade da enzima TPMT.

| Categoria Funcional | Alelos |
|---|---|
| Funcional / atividade normal / tipo selvagem ² | *1, *1S |
| Não funcional, variante ou mutante / sem atividade | *2, *3A, *3B, *3C, *4 |
| Provável função reduzida / decréscimo de atividade (muitos desses alelos são muito raros sendo que a maioria apresenta redução em vez de ausência de atividade) | *5, *6, *8, *9, *10, *11, *12, *13, *16, *17, *18 |
| Desconhecido / Incompreendido / Dados conflitantes | *7, *14, *15, *19, *20, *21, *22, *23, *24, *25, *26, *27, *28, *29, *30, *31 |

Fonte: RELLING *et al.*, 2013.

Aproximadamente 90% da população branca e afro-descendente possuem uma alta atividade da enzima devido à homozigose para alelos de alta atividade da TPMT, 6% a 11% apresentam uma atividade intermediária devido à heterozigose do locus *TPMT* e 0,33% apresenta a baixa atividade da enzima TPMT devido à homozigose para alelos de baixa atividade (WEINSHILBOUM; SLADEK, 1980; LENNARD *et al.*, 1990; MCLEOD *et al.*, 1994; GISBERT *et al.*, 2007). A Figura 10 demonstra a distribuição populacional da atividade da TPMT.

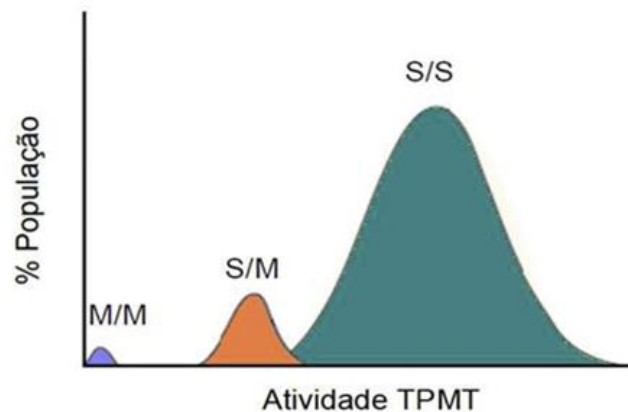


Figura 10 – Distribuição Populacional da Atividade da enzima TPMT. Indivíduos que apresentam atividade enzimática alta apresentam o genótipo homozigoto selvagem (S/S). Indivíduos que apresentam atividade intermediária apresentam genótipo heterozigoto (S/M). Indivíduos que apresentam atividade enzimática baixa ou indetectável apresentam dois alelos mutantes (M/M). Fonte: RELLING, 2013.

O alelo selvagem é denominado de *TPMT*1* e os indivíduos que apresentam uma alta atividade da enzima TPMT são homozigotos para este alelo. A mutação 474C, presente no Exon 7 do gene *TPMT* que caracteriza o alelo *TPMT*1S* corresponde a uma mutação silenciosa e também caracteriza uma alta atividade enzimática da TPMT. Essa mutação foi frequentemente encontrada em populações Norte Portuguesas, com frequência de 21% (ALVES *et al.*, 1999).

Os alelos mutantes mais frequentemente encontrados em diversas populações estudadas incluem o *TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B*, *TPMT*3C* (LOENNECHEN *et al.*, 1988; KRYNETSKI *et al.*, 1995; TAI *et al.*, 1997). Esses alelos já foram descritos em cerca de 80% a 95% das populações brancas, afro-descendentes, africanas e asiáticas estudada com atividade baixa e/ou intermediária para enzima TPMT (YATES *et al.*, 1997; EICHELBAUM *et al.*, 2006).

O alelo mutante *TPMT*2* é definido por uma mudança de um único nucleotídeo, G>C, na posição 238 do gene. Essa modificação leva a uma mudança do aminoácido Alanina por Prolina no códon 80, o que resulta em uma redução 100 vezes da atividade da TPMT em relação ao alelo selvagem (KRYNETSKI *et al.*, 1995).

O alelo *TPMT*3A* é caracterizado por duas mutações do tipo SNP (G460A e A719G) que resulta em mudança do aminoácido formado no códon 154 (mudança

da Alanina por Treonina) e no códon 240 (mudança da Treonina por Cisteína) (TAI *et al.*, 1996).

O alelo *TPMT*3B* resulta de uma mutação no códon 154 (mudança da Alanina por Treonina) e o alelo *TPMT*3C* resulta em uma mudança no códon 240 (mudança da Treonina por Cisteína) (KRYNETSKI *et al.*, 1995). A Figura 11 mostra as principais variantes alélicas no locus *TPMT*.

Existe um grande número de alelos mutantes raros do gene *TPMT* (*TPMT*3D*, **4*, **5*, **6*, **7*, **8*, **10*, **11*, **12*, **13*, **14*, **15*, **16* e **19*) que já foram descritos na literatura. Desses alelos a variante *TPMT*4* resulta de uma transposição (G>A) na junção do intro 9-exon 10, que interrompe o nucleotídeo final do intron 3' da sequência (OTTERNESS *et al.*, 1997, 1998; HON *et al.*, 1999; HAMDAN-KHALIL *et al.*, 2005).

O alelo *TPMT*8* apresenta um SNP (G644A) que resulta na mudança de um aminoácido no códon 215 (Arg>His) (HON *et al.*, 1999). A Tabela 11 descreve as 22 variantes alélicas do gene *TPMT* mais descritas na Literatura.

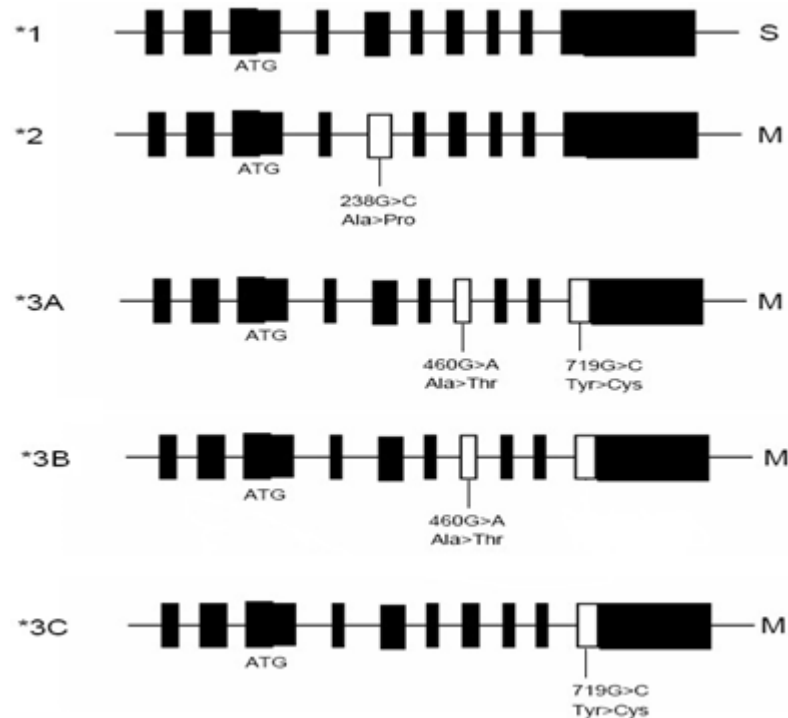


Figura 11 – Variantes alélicas predominantes do locus *TPMT*. O alelo selvagem *TPMT*1* codifica para alta atividade enzimática. Os alelos mutantes *TPMT*2*, **3A*, **3B* e **3C* codificam para baixa atividade da enzima. Modificado de Reis (2006).

A variante rs12201199 presente em uma região intrônica do gene *TPMT* vem sendo bastante associada com efeitos ototóxicos em pacientes pediátricos tratados com cisplatina (ROSS *et al.*, 2009; PUSSEGODA *et al.*, 2013; CARLETON *et al.*, 2014). Estudos têm sugerido que essa variante está em forte desequilíbrio de ligação com alelos de baixa metabolização do gene *TPMT* como os *TPMT*3C* (rs1142345) e *TPMT*3B* (rs1800460) (TAMM *et al.*, 2008; ROSS *et al.*, 2009, CARLETON *et al.*, 2014). A genotipagem das variantes do gene *TPMT* rs1142345 e rs1800460 é particularmente importante para identificar os indivíduos com maior probabilidade de toxicidade se tratados com doses padrão de mercaptopurina (AYDOGDU *et al.*, 2000) dessa forma, é concebível que a variante rs12201199 pode ser um potencial marcador para atestar toxicidades em pacientes tratados com 6-MP.

Tabela 11 – Alelos da Tiopurina metiltransferase e fenótipos associados à atividade da enzima TPMT.

| Alelos do Gene <i>TPMT</i> | Alteração de nucleotídeo | Mudança de aminoácido | Fenótipo associado |
|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| *1 | ----- | ----- | Alta |
| *2 | G238C | Ala 80 Pro | Baixa |
| *3A | G460A A719G | Ala 154 Ter Tri 240 Cis | Baixa |
| *3B | G460A | Ala 154 Ter | Baixa |
| *3C | A719G G292T | Tri 240 Cis Glu 985 TOP | Baixa |
| *3D | G460A A719G | Ala 154 Tri Tri 240 Cis | Intermediária |
| *4 | G19 (-1) A | ----- | Baixa |
| *5 | T156C | Leu 49 Ser | Intermediária |
| *6 | A539T | Tri 180 Fen | Baixa |
| *7 | T681G | His 227Gln | Intermediária |
| *8 | G644A | Arg 215 His | Intermediária |
| *9 | A356C | Lis 119 Tri | ----- |
| *10 | G430C | Gli 144 Arg | ----- |

| | | | |
|-----|-------|-------------|-------|
| *11 | G395A | Cis 132 Tri | Baixa |
| *12 | C374T | Ser 125 Leu | ----- |
| *13 | A83 T | Glu 28 Val | ----- |

Tabela 11 – Alelos da Tiopurina metiltransferase e fenótipos associados à atividade da enzima TPMT (continuação).

| | | | |
|-----|--|---------------------------------------|---------------|
| *14 | A1G | Met 1 Val | Baixa |
| *15 | Perda dos nucleotídeos 419-494 (Exon 7) | Perda dos aminoácidos de 140 a 165 | Baixa |
| *16 | G 488 A | Arg 163 His | Intermediária |
| *17 | C 142 G | Gln42 Glu | Intermediária |
| *18 | C121A | Gli 71 Arg | Intermediária |
| *19 | A365TC | Lis 122 Tri | Baixa |
| *20 | A712 G | Lis 238 Gli | Intermediária |
| *21 | C205G | Leu 69 Val | Intermediária |
| *22 | G488C | Arg 163 Pro | Intermediária |

Fonte: SALAVAGGIONE et al., 2005.

1.7 DOSAGEM RECOMENDADA DE 6-MP

A 6-MP possuem um papel único no tratamento da LLA. A abordagem para ajuste de dosagem com base na atividade enzimática da TPMT pode variar dependendo da indicação clínica da doença (ARICÓ *et al.*, 2005).

As doses convencionais de partida utilizado Tiopurinas, como 6-MP, são geralmente altas, uma vez que estas doses foram derivadas de ensaios pensadamente ponderados para a grande parcela da população (cerca de 90 %) que possuem alelos do *TPMT* com atividade enzimática alta (alelo tipo selvagem) (LENNARD; LILLEYMAN, 1996; STOCCO *et al.*, 2010; RELLING *et al.*, 2011).

Para os pacientes com LLA com atividade enzimática da TPMT alta a dose inicial de 6-MP tendem a ser elevadas (75 mg/m² de 6-MP). Doses iniciais menores que o normal devem ser administrados em pacientes heterozigotos e em pacientes homozigotos deficientes as doses iniciais de 6-MP devem ser reduzidas em pelo menos 10 vezes (SCHMIEGELOW *et al.*, 2009; RELLING *et al.*, 2011).

A abordagem de redução de dosagem para heterozigotos e homozigotos deficientes tem diminuído o risco de toxicidade aguda em pacientes com LLA, fortalecendo a necessidade de empregar ensaios clínicos para estudar o estado

enzimático do TPMT nesses pacientes, independentemente da raridade da doença e/ou dos polimorfismos no gene *TPMT* (RELLING *et al.*, 2011).

A Tabela 12 evidencia as doses recomendadas de 6-MP para pacientes com LLA de acordo com a atividade enzimática da TPMT, ressaltando as implicações clínicas de acordo com o fenótipo observado (RELLING *et al.*, 2011).

Tabela 12 – Dosagem recomendada de 6-MP de acordo com o fenótipo do TPMT.

| Fenótipo (Genótipo) | Ex. de haplótipos | Medidas farmacológicas: Implicações para mercaptopurina | Recomendações de dosagem para mercaptopurina | Classificação das recomendações |
|---|--|---|--|---------------------------------|
| Homozigotos tipo selvagem ou normal, atividade alta (dois alelos funcionais * 1) | *1/*1 | Concentrações mais baixas de metabólitos TGN, alta de metilTIMP, este é o padrão “normal” | Começar com dose inicial normal (por exemplo, 75 mg/m ² /d ou 1,5 mg/kg/d) e ajustar doses de mercaptopurina (e de qualquer outra terapia mielossupressora) sem qualquer ênfase especial em mercaptopurine comparado a outros agentes. Permitir duas semanas para alcançar o estado estável após cada ajuste de dosagem. | Altamente recomendado |
| Heterozigoto ou atividade intermediária (um alelo funcional - *1, além de um alelo não funcional - *2, *3A, *3B, *3C,*8, ou *4) | *1/*2, *1/*3A, *1/*3B, *1/*3C, *1/*4 | Concentrações moderadas a elevadas de metabólitos TGN, baixas concentrações de metilTIMP | Começar com doses reduzidas (início em 30-70% da dose total: por exemplo, a 50 mg/m ² /d ou 0,75 mg/kg/d) e ajustar doses de MP com base no grau de mielossupressão e orientações de doenças específicas. Permitir duas a quatro semanas para alcançar o estado estável após cada ajuste de dosagem. Naqueles que necessitam de uma redução da dose com base em mielossupressão, a dose mediana pode ser 40% menor (44 mg/m ²) do que tolerado em pacientes do tipo selvagem (75 mg/m ²). Na definição de mielossupressão, e dependendo de outras terapias, a ênfase deve ser na redução mercaptopurina sobre outros agentes. | Altamente recomendado |

Tabela 12 – Dosagem recomendada de 6-Mercaptopurina de acordo com o fenótipo do TPMT (continuação).

| | | | | |
|---|---|--|--|------------------------------|
| <p>Variante homocigótica, mutante, atividade baixa ou deficiente (dois alelos não-funcionais - *2, *3A, *3B, *3C, ou *4).</p> | <p>*3A/*3A, *2/*3A, *3C/*3A, *3C/*4, *3C/*2, *3A/*4</p> | <p>Concentrações extremamente elevadas de metabólitos TGN; possível toxicidade fatal sem decréscimo de dose; sem metilTIMP metabólitos</p> | <p>Para nocividade, começar com doses drasticamente reduzidas (redução diária das doses por 10 plissagens e redução para três vezes semanais ao invés de diárias, e.g., de 10mg/m²/d para 10mg/m²/3dias/semana) e ajustar doses de MP com base no grau de mielossupressão e orientações de doenças específicas. Permitir quatro a seis semanas para alcançar o estado estável após cada ajuste de dosagem. Na definição de mielossupressão a ênfase deve ser na redução mercaptopurina sobre outros agentes. Para condições não nocivas, considerar alternativas sem terapia tiopurina imunossupressora.</p> | <p>Altamente Recomendado</p> |
|---|---|--|--|------------------------------|

Fonte: www.pharmgkb.org.

1.8 INFLUÊNCIA ÉTNICA EM ESTUDOS FARMACOGENÉTICOS

A definição de raça e etnia tem uma história longa e tumultuada na pesquisa médica e um ponto focal de discórdia é se há ou não uma base biológica da classificação racial e étnica (BAMSHAD *et al.*, 2004; BLOCHE, 2004). Nos últimos cem mil anos, surgiu inevitavelmente variação genética em todo o genoma como resultado de mutação, seleção aleatória ou imposta por fatores ambientais, formando a base da variabilidade inter-individual em uma vasta gama de características fenotípicas. Os indivíduos eram mais propensos a acasalar com o outro se eles viviam em estreita proximidade e este padrão de acasalamento seja a provável força motriz de diferenças genéticas entre populações geograficamente divididas (RAMACHANDRAN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2008).

No entanto, é comum dividir os indivíduos em grupos, com base em sua aparência física, sem a valorização da genética humana (ou seja, ascendência genética). Portanto, dependendo dos critérios utilizados, raça e etnia podem ser completamente baseadas em genética (ascendência genética) ou não-genéticas (idioma). Isto introduz enorme heterogeneidade dentro de grupos raciais e étnicos auto-reportados. Com diferentes graus de mistura entre europeus, africanos e nativos americanos, a composição ascendência genética dos hispânicos é extremamente diversificada (MAO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007). Hispânicos na Flórida são mais propensos a ser de origem cubana e têm muito maior ascendência genética Africano, em comparação com os hispânicos na Califórnia de ascendência mexicana com altos níveis de ancestralidade genética do nativo americano. Por outro lado, a substituição raça autodeclarada ou etnia por ancestralidade genética pode ignorar contribuições potencialmente críticos de fatores ambientais ou culturais. Portanto, é prudente reconhecer as limitações do uso de raça auto-referida e etnia, bem como aqueles associados com ascendência genética. A discussão sobre as disparidades raciais e étnicas na câncer não seria abrangente sem considerar recursos genéticos e não-genéticos, bem como as interações entre os dois.

A etiologia da LLA é provável que seja complexo com fatores genéticos e ambientais contribuindo coletivamente para oncogênese. Várias anomalias genéticas congênitas têm sido associados à predisposição à LLA na infância. Por

exemplo, as crianças com Síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21) correm um risco significativamente elevado de desenvolver leucemia aguda (HASLE *et al.*, 2000; MULLIGHAN; COLLINS-UNDERWOOD; *et al.*, 2009).

Variações genéticas herdadas inter-individuais (por exemplo, as diferenças na seqüência de DNA entre os indivíduos) são comum em todo o genoma humano e estão frequentemente relacionadas com ascendência geográfica dos grupos raciais ou étnicos (LI *et al.*, 2008). Assim, polimorfismos genéticos podem contribuir para diferenças raciais e étnicas em todas as incidências se a frequência de uma variante à susceptibilidade difere por raça ou etnia, e/ou quando variantes genéticas associadas a todas de uma maneira específica população.

A contribuição das variações genéticas nas vias (por exemplo: o metabolismo carcinogênico, metabolismo do folato, reparo de DNA) foi extensamente examinado ao longo das últimas duas décadas, com resultados inconsistentes. Uma recente meta-análise de 47 estudos resumidos de 25 polimorfismos em 16 genes e observou estatisticamente significativa ($P < 0,05$) embora associações modestas suscetibilidade para LLA para apenas 8 variantes (por exemplo: *GSTM1* eliminação, *SLC19A1* G80A), com uma probabilidade de falso-positivo estimado de 20% (VIJAYAKRISHNAN; HOULSTON, 2010). A análise agrupada semelhante de polimorfismos *MTHFR* em 12 estudos observaram uma associação significativa para a variante C677T mas não ao polimorfismo A1298C (KOPPEN *et al.*, 2010). Germline SNPs no *IL12A* e os genes *HLA-DP* também foram ligados a todos os riscos em hispânicos (CHANG *et al.*, 2010; URAYAMA *et al.*, 2012), sugerindo que a modulação imune desempenha um papel na etiologia da LLA. No entanto, uma análise abrangente do complexo principal de histocompatibilidade em 824 pacientes com LLA de células tipo B e 4.737 controles de ascendência genética Europeia não encontrou associação estatisticamente significativa entre variantes de *HLA* e suscetibilidade ALL (HOSKING *et al.*, 2011).

Avanços na genotipagem agora permite que os estudos de associação do genoma para interrogar um grande número de variações genéticas em todo o genoma humano para as associações com uma variedade de características fenotípicas. A genotipagem não dependem de conhecimento prévio sobre a biologia da doença, mas examina sistematicamente variantes genéticas de forma agnóstica. O estudo de associação do genoma de LLA na infância têm descobertos 5 loci

genômica ao nível de significância de todo o genoma ($P < 5 \times 10^{-8}$) (PAPAEMMANUIL *et al.*, 2009; TREVIÑO *et al.*, 2009; SHERBORNE *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2013): *ARID5B* (10q21.2), *IKZF1* (7p12.2), *CEBPE* (14q11.2), *CDKN2A* (9p21.3), e *Bmi1-PIP4K2A* (10p12.31-12.2).

Há evidências convincentes implicando todos os 5 genes na patogênese LLA. Por exemplo, variantes da linha germinativa em *ARID5B* tem a associação mais forte com susceptibilidade para LLA em todo o genoma e a perda de *ARID5B* no rato conduz a defeitos significativos no desenvolvimento de células linfóides (LAHOUD *et al.*, 2001). *IKZF1*, um importante fator de transcrição em todas as linhagens linfóides, é frequentemente alterado em células blásticas neoplásicas (particularmente em alto risco LLA), e a deleção *IKZF1* está associado a um mau prognóstico (MULLIGHAN; SU; *et al.*, 2009). Perda de *CDKN2A/CDKN2B* ocorre em até 40% do LLA de células tipo B (MULLIGHAN *et al.*, 2007). *CEBPE* está relacionado especificamente à maturação mielóide e diferenciação celular terminal (YAMANAKA *et al.*, 1997; NAKAJIMA *et al.*, 2006), mas translocações intracromossomal envolvendo *IGH* e *CEBPE* também foram descritas na LLA na infância (AKASAKA *et al.*, 2007).

A heterogeneidade de miscigenação da população brasileira, entre os três grupos ancestrais: os Ameríndios, Europeus e Africanos, proporciona grande implicações na implementação de ensaios clínicos de resposta farmacológica. A frequência alélica de importantes *locus* farmacogenéticos varia entre diferentes populações geográficas. Essas variações entre populações provavelmente são o resultado de deriva genética, mas podem também refletir na adaptação ao local e a fatores seletivos como condições climáticas e dieta alimentar (PENA *et al.*, 2011).

Baseado nisso, a resposta a alguns medicamentos, cujos polimorfismos farmacogenéticos já estão descritos em resposta aos mesmos, tem algumas indicações para determinadas populações. Entre os exemplos mais proeminentes está o Coumadin (Warfarina) medicamento utilizado no tratamento para evitar coágulos (anticoagulante), a resposta a esse medicamento sofre grande influência dos polimorfismos presentes no gene *VKORC1*. A frequência desses polimorfismos varia muito em todo mundo sendo extremamente alta em populações asiáticas (89%) dessa forma é recomendada a redução da dose administrada nessas populações (PENA *et al.*, 2011). Outro exemplo é representado pelo gene *CYP3A5*,

cuja enzima é responsável pela inativação de vários fármacos utilizados frequentemente na medicina atual, como os imunossupressores: Tacrolimus e Ciclosporina. As variantes polimórficas não funcionais dessa enzima são mais frequentes em populações europeias (90%) (PENA *et al.*, 2011).

Um exemplo importante na observação de tolerância farmacológica entre diferentes populações étnicas está na implementação do esquema S-1, que é ativo contra câncer de estômago, colorretal, pulmão, pâncreas, cabeça e pescoço (PENA *et al.*, 2011). A dose máxima tolerada de S-1 é substancialmente menor em pacientes ocidentais do que em pacientes japoneses (AJANI *et al.*, 2005). Essa diferença de tolerância pode estar associada a polimorfismos presentes no gene *CYP2A6*, cuja atividade mostra variabilidade interindividual considerável (FUJITA, 2006).

Diferenças étnicas na sobrevivência de pacientes com LLA infantil foram relatadas em vários estudos (PUI *et al.*, 2003), com piores resultados reportados para as crianças negras do que para crianças brancas (PUI *et al.*, 2003). Adicionalmente, poucos estudos relatam resultados do tratamento na LLA infantil entre outros grupos étnicos, como ameríndios ou asiáticos (YANG *et al.*, 2011). Yang *et al.* 2011, relatou piores resultados terapêuticos em crianças com LLA com maior ascendência ameríndia.

1.8.1 CONTROLE GENÔMICO DE ANCESTRALIDADE

A existência de diferenças interétnicas em relação à variabilidade encontrada em genes envolvidos com resposta aos fármacos, pode ser um fator importante para a interpretação errônea dos resultados (SUAREZ-KURTZ, 2005). O controle genômico é particularmente importante nas amostras que serão investigadas, pois foi estimado na população do Norte brasileiro um elevado grau de subestruturamento populacional que justifica a utilização deste controle em estudos de associação com doenças (SANTOS *et al.*, 2010).

Desta maneira é importante empregar tecnologias capazes de realizar um controle genômico entre casos e controles. Quantificando individualmente a proporção de mistura entre as populações ancestrais, logo corrigir o provável efeito do subestruturamento populacional na amostra investigada.

Uma ferramenta importante que pode ser empregada nestas análises são os Marcadores Informativos de Ancestralidade (MIAs), também chamados de “marcadores população-específicos” (PARRA *et al.*, 2003).

Para atingir o objetivo proposto o presente trabalho utilizará um painel de 48 Marcadores Informativos de Ancestralidade (MIAs), capazes de estimar com precisão a mistura individual e global interétnica em populações miscigenadas com diferentes grupos étnicos (SANTOS *et al.*, 2010).

1.9 APLICABILIDADE CLÍNICA

Na região norte do Brasil, a Leucemia Linfoblástica Aguda é a neoplasia infantil mais frequente, com percentuais superiores a outras regiões do país (INCA, 2011). O estado do Pará apresenta alta mortalidade à LLA por conta de casos de resistência e toxicidade relacionada à quimioterapia ao quais os fatores predisponentes são mal compreendidos (SILVA *et al.*, 2011).

A Leucemia linfóide aguda representa mais de 80% dos casos de leucemias infantis, sendo a região Norte do Brasil a que apresenta maiores percentuais para esse tipo de neoplasia, acima de 39%. Embora nos últimos anos as taxas de sobrevivência dos pacientes com LLA tenham aumentando devido ao progresso terapêutico, cerca de 30% das crianças não respondem ao tratamento quimioterápico convencional, apresentando sérias complicações toxicológicas.

Nesse contexto, pesquisas voltadas para a identificação de indivíduos com maior risco de apresentar reações adversas na terapêutica melhorariam o aconselhamento e as opções de tratamento, podendo garantir um aumento nas taxas de sobrevivência da doença (KISHI *et al.*, 2007).

Levantamentos epidemiológicos realizados em pacientes tratados para LLA na região Norte do Brasil mostrou que cerca de 70% dos pacientes oriundos dessa região não respondem ao tratamento quimioterápico convencional, o que contribui para um maior índice de mortalidade nessa região se comparado com outras regiões do Brasil. Os estudos de como as variações genéticas do gene *TPMT* podem interferir na resposta ao medicamento 6-MP, um dos fármacos mais importantes usados no tratamento da LLA, é de extrema importância para o desenvolvimento de novas drogas e ajuste da dosagem recomendada a esses pacientes, o que

melhoraria a sobrevida das pessoas submetidas ao tratamento da LLA, pela diminuição dos efeitos adversos decorrentes da terapia convencional. Para prever a frequência desses polimorfismos relacionados a respostas aos fármacos, pesquisas farmacogenéticas necessitam serem empregadas em populações brasileiras miscigenadas, como é caso das populações da região Norte do Brasil. O presente trabalho pretende investigar a frequência dos polimorfismos genéticos no gene *TPMT* em uma população de pacientes com LLA em tratamento com 6-MP.

O emprego de métodos capazes de identificar precocemente a predisposição genética à doença e aos feitos terapêuticos são os primeiros passos para possibilitar a criação de políticas públicas capazes de realizar um tratamento personalizado para o câncer de maneira a maximizar a eficácia terapêutica e diminuir as toxicidades (SUAREZ-KURTZ, 2005).

A aplicação de biomarcadores moleculares na prática clínica como fator de risco no desenvolvimento neoplásico pode revolucionar o entendimento das neoplasias, criar subsídios para novos alvos terapêuticos e reduzir custos desnecessários com terapias e internações (THUMAR *et al.*, 2012; WILLARD; KOOCHKPOUR, 2012; CRAVEN *et al.*, 2013; HAWLEY *et al.*, 2013). Dessa forma, estudos que investigam polimorfismos em genes que codificam enzimas metabolizadoras de carcinógenos e que podem modificar não só a susceptibilidade à LLA infantil como também o risco de malignidade recorrente e resposta à terapia, podem ser válidos. A hipótese principal do presente estudo envolve a identificação de polimorfismos relacionados ao risco de desenvolver toxicidades à terapia da doença. Nosso grupo de pesquisa é pioneiro na região Norte do Brasil nesse tipo de investigação voltada para a Leucemia Linfoblástica Aguda.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do nosso trabalho foi associar polimorfismos do gene *TPMT*: *TPMT**2 (238G>C), *TPMT**3A (460G>A e 719A>G), *TPMT**3B (460G>A), *TPMT**3C (719A>G), *TPMT**8 (644G>A) e a variante intrônica rs12201199 (94T>A) com a ocorrência de toxicidades graves em pacientes com LLA tratados com 6-MP, na Região Norte do Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar o grau de desequilíbrio de ligação, para identificar os haplótipos derivados dos polimorfismos do gene *TPMT* nas amostras de pacientes com LLA.

2. Investigar e comparar a distribuição de frequências dos alelos *TPMT**2 (238G>C), *TPMT**3A (460G>A e 719A>G), *TPMT**3B (460G>A), *TPMT**3C (719A>G), *TPMT**8 (644G>A) e a variante intrônica rs12201199 (94T>A) entre os pacientes com LLA que apresentarem e não apresentarem toxicidades graves no tratamento com o 6-MP.

3. Investigar a associação entre o genótipo do paciente com LLA com a presença de toxicidades graves nos pacientes com LLA tratados com 6-MP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS ESTUDADAS

Na investigação foi utilizada amostras de 137 pacientes os quais tiveram como critérios de inclusão: pacientes com diagnóstico confirmado de LLA; com idade inferior a 18 anos; em tratamento convencional para Leucemia Linfóide Aguda no período de 2006 à 2012; que apresentaram toxicidade grau 3 e 4, englobando as fases de consolidação e manutenção do tratamento para LLA infantil; atendidos no Hospital Ophir Loyola, referência no tratamento de câncer da região Norte do Brasil, localizado na cidade de Belém, no Estado do Pará. Os dados clínicos foram obtidos por meio de pesquisa em prontuários cedidos pelo serviço de arquivo médico do hospital.

As toxicidades foram classificadas de acordo com NCI Common Toxicity Criteria versão 2.0, incluindo: gastrointestinal (diarreia ou estomatite), infecção, neurotoxicidade e hematológica. Foram incluídas exclusivamente as toxicidades de grau 3 a 4 englobando as fases de consolidação e manutenção do tratamento para LLA infantil (Indução, Consolidação, Manutenção).

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para o isolamento do DNA genômico foram utilizados como material sangue periférico. O sangue total foi obtido no momento das coletas de rotina para realização de hemogramas. Portanto o sangue não foi coletado exclusivamente para a realização do estudo. O anticoagulante utilizado é o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

O material genético foi extraído a partir de uma amostra de 300 µL do sangue total pelo método convencional com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol, conforme descrito por Sambrook et al. (1989).

O sangue foi processado inicialmente com tampão salino PBS (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 5,4 M; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 8,4) em uma proporção de 2 partes de tampão para uma parte de camada celular, agitando a mistura suavemente. Após essa etapa, centrifuga-se o material a 4.000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante (solução + restos orgânicos indesejáveis) é retirado e adicionado 500 µL de solução de lise celular (NaCl 0,3 M; EDTA 100 mM com pH 7,5 e uréia 7,0 M) que promove a ruptura dos leucócitos. A solução é homogeneizada e adiciona-se 500 µL de SDS a 20% e, em seguida, incuba-se a solução em banho-maria a 37°C por 16 horas.

Após o período de incubação, adiciona-se 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1), agitando a mistura suavemente por 10 minutos e, posteriormente, centrifuga-se a 4.000 rpm por minuto. A primeira fase é transferida para outro tubo onde se repete a utilização do fenol-clorofórmio (1:1).

O sobrenadante obtido é adicionado a uma solução de clorofórmio-isopropanol (24:1), homogeneizado por 10 minutos e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Depois é repetido o procedimento por mais uma vez. Em seguida, transfere-se a primeira fase para outro tubo e adiciona-se uma solução de acetato de sódio a 3,0 M (pH: 5,2) na proporção de 10% do valor obtido. Esta solução precipita o DNA juntamente com o Etanol absoluto gelado (2,5 vezes o volume da mistura), agitando-se suavemente até a observação do precipitado de DNA.

A hidratação do material extraído, DNA, é realizada em água deionizada estéril, agitando-se até homogeneização total. O material extraído é deixado à temperatura ambiente por 24 horas para a completa diluição. Após a extração é processada a quantificação do DNA, após o processo de quantificação o DNA é diluído para 10 ng/µL, a concentração de uso.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A concentração do DNA das amostras foi calculado pelo índice de absorvância (A) das bases a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific).

3.4 SELEÇÃO DOS SNP

Foi selecionados polimorfismos do tipo SNP no gene *TPMT* descritos na literatura como associados a resposta ao 6-MP no tratamento da LLA. A Tabela 13 estão descritos os polimorfismos selecionados e com seus respectivos fenótipos associados a atividade enzimática da TPMT.

Tabela 13 – Polimorfismos farmacogenéticos selecionados do gene *TPMT* associados a resposta terapêutica do 6-MP.

| Polimorfismo Gene <i>TPMT</i> | rs da mutação | Fenótipo associado | Alelos | |
|--|--------------------------|-------------------------------|---------------|---|
| 238G>C (TPMT *2) | 1800462 | Baixa | G | C |
| 460G>A (TPMT*3B) | 1800460 | Baixa | G | A |
| 644G>A (TPMT*8) | 56161402 | Intermediária | G | A |
| 719A>G(TPMT*3C) | 1142345 | Baixa | A | G |
| 94T>A | 12201199 | Baixa | G | T |

3.5 DESENHO DOS INICIADORES

Foram selecionados três iniciados empregando-se o Programa Primer 3. Os parâmetros utilizados na escolha dos iniciadores são: número de nucleotídeos=25, tamanho do produto=200-400 pares de bases, temperatura de fusão=60°C. A Tabela 14 descreve os iniciadores utilizados e as mutações correspondentes a cada iniciador.

Tabela 14 – Descrição dos iniciados utilizados na genotipagem dos polimorfismos do gene.

| Primer | Sequência dos Primes | Mutações investigadas | Tamanho dos primes | Temperatura (°C) |
|------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------|------------------|
| PRIMER 1 F | 5'TTTCCAAATTTTTATTGTTTCCTGA3' | 238G>C | 25 | 54,7 |
| PRIMER 1 R | 5'TACCCAAATCAAAACAAACCTTAAA3' | | 25 | 56,4 |
| PRIMER 2 F | 5' AACGCAGACGTGAGATCCTAAT 3' | 460G>A | 22 | 60,8 |
| PRIMER 2 R | 5' CACAGCTTGAAAGTGATTGAGC 3' | 644G>A | 22 | 60,8 |
| PRIMER 3 F | 5' AGAATCCCTGATGTCATTCTTCAT 3' | 719A>G | 24 | 59,4 |
| PRIMER 3 R | 5' ACAGGTAACACATGCTGATTGGT 3' | | 23 | 61 |

3.6 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A amplificação foi realizada em um termociclador ABI Verity (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O protocolo padrão para os três primers utilizados emprega: 20 pmol de cada oligonucleotídeo, 2,5 mM de MgCl₂, 0,25mM de dNTP, 3 mM de Taq polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl e 10 ng de DNA genômico em cada 25 µL de volume de reação. As amostras são incubadas a 95°C por 3 minutos, posteriormente por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 62°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, com a extensão final de 70°C por 30 minutos e 4° por 5 minutos.

As regiões de interesse foram amplificadas com a utilização de pares de primers específicos para as sequências analisadas no presente trabalho, as quais têm suas sequências complementares às regiões que flanqueiam os sítios estudados (Tabela 14). O produto da amplificação é analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% para posterior sequenciamento direto das amostras.

3.7 SEQUENCIAMENTO DIRETO DO DNA

O sequenciamento direto do DNA, utilizando ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, sequencia uma região em torno de 446 pb do gene *TPMT* por reação. A reação se desenvolve em um volume de 15 µL, contendo 10 µL de água; 1 µL do produto amplificado (PCR); 0,5 µL do Kit Big Dye® (Terminator Cycle Sequence v 3.0) 3,0µL do tampão Save Money; e 0,5 µL de iniciador por 35 ciclos (96°C por 50 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 3 minutos).

As sequências foram analisadas e comparadas com sequências já descritas de referência para posterior detecção dos seis SNP associados com variação da atividade enzimática da TPMT. Através das técnicas de PCR e sequenciamento foi possível analisar conjuntamente os seis polimorfismos estudados em três reações por indivíduo.

3.8 GENOTIPAGEM DA VARIANTE RS12201199

A análise molecular do polimorfismo 94T>A (rs12201199) foi realizada por PCR em tempo real com sondas TaqMan® (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA) utilizado o equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O protocolo utilizou 3,5 µL de Master Mix, 0,157 µL de sonda TaqMan, 3,325 µL de água e 1,0 µL de DNA. O mix final foi amplificado com o seguinte programa: 10' a 95°C, 40 ciclos de 15" a 92°C, e 1' a 60°C.

3.9 GENOTIPAGEM DOS MARCADORES DE ANCESTRALIDADE

As análises de ancestralidade foram realizadas empregando um painel de 48 Marcadores autossômicos Informativos de Ancestralidade (MIAs), conforme o descrito por SANTOS *et al.*, (2010). O software STRUCTURE v.2.3.3 foi empregado para estimar as proporções individuais de ancestralidade genética de Europeu, Africano e Ameríndio.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de ancestralidade foram realizadas empregando um painel de 48 Marcadores autossômicos Informativos de Ancestralidade, conforme o descrito por Santos *et al.* (2010). O software STRUCTURE v.2.3.3 foi empregado para estimar as proporções individuais de ancestralidade genética de Europeu, Africano e Ameríndio.

A frequência dos alelos foi estimada por contagem gênica. Os haplótipos entre os SNPs investigados foram derivados através de estimativas de máxima verossimilhança utilizando o programa PHASE (STEPHENS *et al.*, 2001).

Todas as outras análises estatísticas foram realizadas usando o programa estatístico SPSS v.20.0 (SPSS, Chicago, IL). Os grupos foram comparados por variáveis categóricas utilizando o teste do χ^2 , enquanto o teste t Student é utilizado para as análises de variáveis contínuas. A taxa de risco (Odds ratios-OR) e o Intervalo de confiança (IC= 95%) também são calculados. A utilização da regressão logística considera como variável dependente: os desfechos clínicos e toxicidades decorrentes do tratamento da LLA, e como variáveis independentes são empregadas: idade, sexo e outras variáveis clínicas que pudessem ser fator de confusão nas análises.

Todos os testes estatísticos considerarão probabilidade (p-valor) significativa quando $\leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES

Um total de 137 pacientes foram incluído no estudo (90 do sexo masculino e 47 do sexo feminino). Na tabela 15 são apresentadas as características clínica dos indivíduos estudados, a média de idade dos pacientes foi de $4,86 \pm 2.88$ anos (variando de 1 a 15 anos), 92, 5% dos pacientes com LLA eram imunofenotipicamente do tipo B.

Tabela 15 – Característica clínica dos pacientes com LLA.

| Característica | Número de pacientes (%) |
|--|--------------------------------|
| Sexo | |
| Masculino | 90 (65, 7) |
| Feminino | 47 (34, 3) |
| Média de Idade | 4, 86±2.88 |
| Idade ao diagnóstico (anos) | |
| <10 | 113 (87, 6) |
| ≥10 | 16 (12, 4) |
| Contagem de Leucócitos no momento do diagnóstico /μl | |
| <50,000 | 105 (85, 4) |
| ≥50,000 | 18 (14, 6) |
| Imunofenotipagem | |
| Células B | 123 (92, 5) |
| Células T | 10 (7, 5) |
| Grupo de Risco | |
| Standard | 9 (6, 8) |
| Alto | 77 (56, 6) |
| Baixo | 50 (36, 8) |

Em relação à ascendência genômica, observou-se que a composição étnica dos pacientes com LLA foi de 43,6% Europeu, 22% Africano e 34% Ameríndio (Figura 12), conforme descrito na Tabela 16.

Tabela 16 – Média de ancestralidade genética dos pacientes com LLA

| Ancestralidade Genética | Média |
|-------------------------|---------------|
| Europeu | 0,436 ± 0,117 |
| Africano | 0,222 ± 0,971 |
| Ameríndio | 0,343 ± 0,112 |

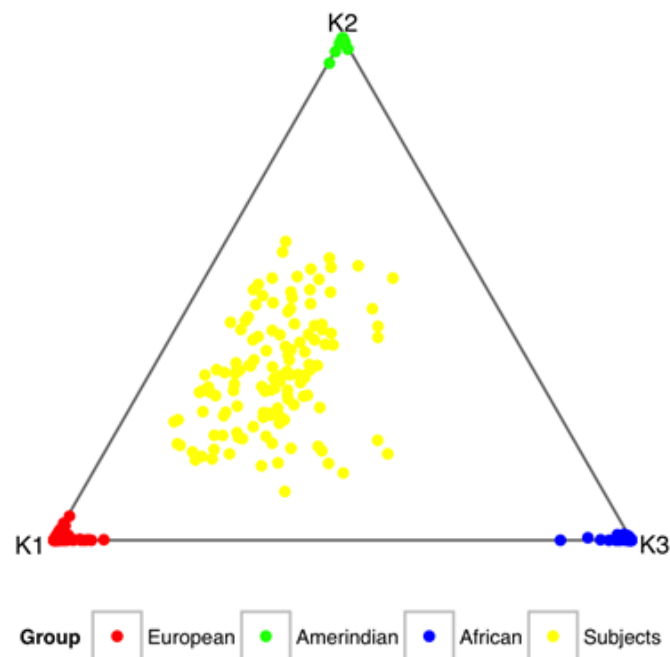


Figura 12 – Representação de mistura interétnica individual. Os pacientes com LLA são representadas por pontos em amarelo e sua localização no gráfico corresponde às proporções de mistura. A mistura é estimada por comparação com populações-mães de indivíduos representados nos vértices do triângulo: Europeia (vermelho), Ameríndio (verde) e Africano (azuis).

Na tabela 17 é apresentado os dados de frequência de toxicidade grave (grau 3 e 4) nos pacientes investigados durante o tratamento para LLA infantil. Entre as toxicidades relatadas, a infecciosa foi a mais prevalente (86%), seguida da hematológica (65%), da gastrointestinal (64,8%) e toxicidade no sistema nervoso central (29,9%).

A presença de toxicidade no tratamento da LLA também foi testada em relação à ancestralidade genômica dos pacientes, entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa para as toxicidades estudadas ($p > 0,05$).

Table 17 – Toxicidade grave 3 e 4, relatada nos pacientes com LLA durante o tratamento.

| Toxicidades | N (%) |
|---------------------------------------|--------------|
| <i>Toxicidade Gástrica</i> | |
| <i>Presença</i> | 83 (64, 8) |
| <i>Ausência</i> | 45 (35, 2) |
| <i>Toxicidade Infeciosa</i> | |
| <i>Presença</i> | 111 (86) |
| <i>Ausência</i> | 18 (14) |
| <i>Toxicidade SNC</i> | |
| <i>Presença</i> | 38 (29, 9) |
| <i>Ausência</i> | 89 (70, 1) |
| <i>Toxicidade Hematológica</i> | |
| <i>Presença</i> | 84 (65, 1) |
| <i>Ausência</i> | 45 (34, 9) |

4.2 FREQUÊNCIA DOS ALELOS DO GENE *TPMT* EM PACIENTES COM LLA

A tabela 18 descreve a frequência em pacientes com LLA para as quatro polimorfismos principais do gene *TPMT* e seus respectivos haplótipos associados com a resposta terapêutica da 6-MP. Nossos dados demonstraram que o haplótipo mais frequente foi *TPMT*3A* (7,6%) caracterizado pelos polimorfismos 460A e 719G, seguido pelo haplótipo *TPMT* 3C* e *TPMT* 8*, ambos com 7,3%.

Tabela 18 – Frequência estimada nos pacientes com LLA para os haplótipos derivados do gene *TPMT*.

| Nucleotídeo* | 238 C | 460 A | 644 A | 719 G | | |
|----------------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|---------------|
| Mod.Amin** | Ala80Pro | Ala154Thr | Arg215His | Tyr240Cys | | |
| Frequência | 0, 058 | 0, 112 | 0, 073 | 0, 149 | | |
| Haplótipos | G238C | G460A | G644A | A719G | Frequência | Fenótipo |
| <i>TPMT*1</i> | G | G | G | A | 0, 682 | Alta |
| <i>TPMT*2</i> | C | . | . | . | 0, 058 | Baixa |
| <i>TPMT*3A</i> | . | A | . | G | 0, 076 | Baixa |
| <i>TPMT*3B</i> | . | A | . | . | 0, 036 | Baixa |
| <i>TPMT*3C</i> | . | . | . | G | 0, 073 | Baixa |
| <i>TPMT*8</i> | . | . | A | . | 0, 073 | Intermediário |

Nota: *polimorfismos definidores do fenótipo.

** Modificação do aminoácido.

A tabela 19 apresenta a frequência genotípica e alélica do polimorfismo *rs12201199* do gene *TPMT* entre os pacientes com LLA. A frequência do alelo mutante foi de 0, 482 entre os indivíduos estudados.

Tabela 19 – Frequência genotípica e alélica do polimorfismo *rs12201199* do gene *TPMT* nos pacientes com LLA.

| Genótipo | No. | (%) |
|----------------|-----|--------|
| AA | 60 | 43, 8 |
| AT | 22 | 16, 1 |
| TT | 55 | 40, 1 |
| <i>Alelo T</i> | | 0, 518 |
| <i>Alelo A</i> | | 0, 482 |

A Tabela 20 apresenta a distribuição dos indivíduos estudados de acordo com o genótipo e sua capacidade de metabolização do 6-MP. Três grupos de genótipos foram definidos conforme a atividade enzimática da TPMT: a) Atividade baixa ou deficiente; portadores de dois alelos de baixa ou intermediária atividade da TPMT; b) Intermediária; Indivíduos portadores de um alelo de atividade alta e um alelo de atividade baixa ou intermediária da TPMT; c) Atividade alta; Indivíduos portadores de dois alelos de alta atividade da TPMT.

Na amostra total investigada representada por 137 indivíduos, 58 (43, 3 %) apresentam atividade alta da TPMT, 42 (30, 6%) apresentam atividade intermediária e 43 (31,3%) apresentaram atividade deficiente da TPMT. O genótipo mais frequente entre os portadores de atividade deficiente foi o TPMT*3A/TPMT*3A, encontrado em 7,3% e entre os indivíduos de atividade intermediária o genótipo mais frequente foi TPMT*1/ TPMT*3A, encontrado em 16,8% na amostra estudada.

Tabela 20 - Distribuição dos pacientes estudados de acordo com o genótipo do TPMT e sua capacidade de metabolização do 6-MP.

| Fenótipo | Pacientes com LLA N=137 |
|---|----------------------------|
| | No. (%) |
| Dois alelos de atividade baixo-intermediária | 43 (31, 3) |
| <i>TPMT*3A / TPMT*3A</i> | 10 (7, 3) |
| <i>TPMT*3A / TPMT*3B</i> | 3 (2, 2) |
| <i>TPMT*3A / TPMT*3C</i> | 5 (3, 6) |
| <i>TPMT*3A / TPMT*2</i> | 2 (1, 5) |
| <i>TPMT*3A / TPMT*8</i> | 3 (2, 2) |
| <i>TPMT*3B / TPMT*3B</i> | 1 (0, 7) |
| <i>TPMT*3B / TPMT*8</i> | 1 (0, 7) |
| <i>TPMT*3C / TPMT*3C</i> | 3 (2, 2) |
| <i>TPMT*3C / TPMT*8</i> | 1 (0, 7) |
| <i>TPMT*2 / TPMT*2</i> | 7 (5, 1) |
| <i>TPMT*8/ TPMT*8</i> | 7 (5, 1) |
| Um alelo de atividade baixo-intermediária | 42 (30, 6) |
| <i>TPMT*1/ TPMT*3A</i> | 23 (16,8) |
| <i>TPMT*1/ TPMT*3B</i> | 4 (2, 9) |
| <i>TPMT*1/ TPMT*3C</i> | 8 (5, 8) |
| <i>TPMT*1/ TPMT*8</i> | 7 (5, 1) |
| Dois alelos de atividade alta | 58 (42, 3) |
| <i>TPMT*1/ TPMT*1</i> | 58 (42, 3) |

4.3 ASSOCIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DAS VARIANTES DO GENE *TPMT* EM RELAÇÃO ÀS TOXICIDADES GRAVE DURANTE O TRATAMENTO ANTILEUCÊMICO.

A Tabela 21 mostra a distribuição dos indivíduos estudados que tiveram toxicidades graves durante o tratamento para LLA infantil (toxicidade gastrointestinal, infecciosa, do sistema nervoso central e hematológico) de acordo com o respectivo genótipo e o seu estado de metabolização previsto para metabolização do 6-MP. Entre os pacientes que tiveram toxicidade gastrointestinal, 33, 7% eram metabolizadores deficientes da *TPMT*, dos que apresentaram toxicidade infecciosa 30, 6% eram metabolizadores deficientes do gene, e entre os que apresentaram toxicidade do SNC e hematológica 23, 7% e 32, 1% respectivamente, tinham atividade baixa da *TPMT*.

Não foi observada uma associação significativa entre o perfil de metabolização deficiente da *TPMT* com nenhuma das toxicidades graves relatadas nos pacientes com LLA estudados ($P > 0,05$).

Tabela 21 – Caracterização do genótipo do gene *TPMT* e determinação do perfil de metabolização do 6-MP em pacientes com LLA com e sem toxicidades grave.

| Fenótipo | Toxicidades 3 e 4 | | P value ^a | OR (IC95%) ^a |
|---|--|--|----------------------|-------------------------|
| | Toxicidade Gastrointestinal No. (%) N=83 | Sem toxicidade Gastrointestinal No. (%) N=45 | | |
| Dois alelos de atividade baixo-intermediária | 28 (33, 7) | 13 (29) | 0,530 | 1, 424 (0, 610-3, 324) |
| <i>TPMT*3A / TPMT*3A</i> | 6 (7, 2) | 4 (8, 9) | | |
| <i>TPMT*3A / TPMT*3B</i> | 2 (2, 4) | 0 | | |
| <i>TPMT*3A / TPMT*3C</i> | 2 (2, 4) | 2 (4, 4) | | |
| <i>TPMT*3A / TPMT*2</i> | 2 (2, 4) | 0 | | |
| <i>TPMT*3A / TPMT*8</i> | 2 (2, 4) | 1 (2, 2) | | |
| <i>TPMT*3B / TPMT*3B</i> | 1 (1, 2) | 0 | | |
| <i>TPMT*3B / TPMT*8</i> | 1 (1, 2) | 0 | | |
| <i>TPMT*3C / TPMT*3C</i> | 2 (2, 4) | 1 (2, 2) | | |
| <i>TPMT*3C / TPMT*8</i> | 0 | 1 (2, 2) | | |
| <i>TPMT*2 / TPMT*2</i> | 6 (7, 2) | 1 (2, 2) | | |
| <i>TPMT*8 / TPMT*8</i> | 4 (4, 9) | 3 (6, 7) | | |
| Um alelo de atividade baixo-intermediária | 21 (25, 3) | 14 (31) | | |
| <i>TPMT*1 / TPMT*3A</i> | 11 (13, 3) | 11 (24, 4) | | |

Tabela 21 – Caracterização do genótipo do gene *TPMT* e determinação do perfil de metabolização do 6-MP em pacientes com LLA com e sem toxicidades grave (continuação).

| | | | | |
|---|--|---|--------|------------------------|
| <i>TPMT*1/TPMT*3B</i> | 3 (3, 6) | 1 (2, 2) | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*3C</i> | 6 (7, 2) | 2 (4, 4) | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*8</i> | 1 (1, 2) | 0 | | |
| Dois alelos de atividade alta | 34 (41) | 18 (40) | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*1</i> | 34 (41) | 18 (40) | | |
| | Toxicidade Infecciosa No. (%) N=111 | Sem toxicidade Infecciosa No. (%) N=18 | | |
| Dois alelos de atividade baixo-intermediária | 34 (30, 6) | 7 (39) | 0, 565 | 0, 675 (0, 232-1, 966) |
| <i>TPMT*3A/TPMT*3A</i> | 7 (6, 3) | 3 (16, 7) | | |
| <i>TPMT*3A/TPMT*3B</i> | 2 (2, 7) | 0 | | |
| <i>TPMT*3A/TPMT*3C</i> | 3 (2, 7) | 1 (5, 5) | | |
| <i>TPMT*3A/TPMT*2</i> | 2 (0, 9) | 0 | | |
| <i>TPMT*3A/TPMT*8</i> | 3 (2, 7) | 0 | | |
| <i>TPMT*3B/TPMT*3B</i> | 1 (0, 9) | 0 | | |
| <i>TPMT*3B/TPMT*8</i> | 1 (0, 9) | 0 | | |
| <i>TPMT*3C/TPMT*3C</i> | 2 (2, 7) | 1 (5, 5) | | |
| <i>TPMT*3C/TPMT*8</i> | 1 (0, 9) | 0 | | |
| <i>TPMT*2/TPMT*2</i> | 6 (5, 4) | 1 (5, 5) | | |
| <i>TPMT*8/TPMT*8</i> | 6 (5, 4) | 1 (5, 5) | | |
| Um alelo de atividade baixo- intermediária | 33 (29, 7) | 2 (11) | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*3A</i> | 21 (18, 9) | 1 (5, 5) | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*3B</i> | 4 (3, 6) | 0 | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*3C</i> | 7 (6, 3) | 1 (5, 5) | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*8</i> | 1 (0, 9) | 0 | | |
| Dois alelos de atividade alta | 44 (39, 6) | 9 (50) | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*1</i> | 44 (39, 6) | 9 (50) | | |
| | Toxicidade SNC No. (%) N=38 | Sem toxicidade SNC No. (%) N=89 | | |
| Dois alelos de atividade baixo-intermediária | 9 (23,7) | 31 (34, 8) | 0, 510 | 0, 683 (0, 276-1, 690) |
| <i>TPMT*3A/TPMT*3A</i> | 3 (7, 9) | 7 (7, 9) | | |
| <i>TPMT*3A/TPMT*3B</i> | 1 (2, 6) | 1 (1, 1) | | |
| <i>TPMT*3A/TPMT*3C</i> | 0 | 4 (4, 5) | | |
| <i>TPMT*3A/TPMT*2</i> | 1 (2, 6) | 1 (1, 1) | | |
| <i>TPMT*3A/TPMT*8</i> | 1 (2, 6) | 1 (1, 1) | | |
| <i>TPMT*3B/TPMT*3B</i> | 1 (2, 6) | 0 | | |
| <i>TPMT*3B/TPMT*8</i> | 0 | 1 (1, 1) | | |
| <i>TPMT*3C/TPMT*3C</i> | 0 | 3 (3, 4) | | |
| <i>TPMT*3C/TPMT*8</i> | 0 | 1 (1, 1) | | |
| <i>TPMT*2/TPMT*2</i> | 1 (2, 6) | 6 (6, 7) | | |
| <i>TPMT*8/TPMT*8</i> | 1 (2, 6) | 6 (6, 7) | | |
| Um alelo de atividade baixo- intermediária | 12 (31, 6) | 23 (25, 8) | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*3A</i> | 12 (31, 6) | 10 (11, 2) | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*3B</i> | 0 | 4 (4, 5) | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*3C</i> | 0 | 8 (9) | | |
| <i>TPMT*1/TPMT*8</i> | 0 | 1 (1, 1) | | |
| Dois alelos de atividade alta | 17 (44, 7) | 35 (39, 4) | | |

Tabela 21 – Caracterização do genótipo do gene *TPMT* e determinação do perfil de metabolização do 6-MP em pacientes com LLA com e sem toxicidades grave (continuação).

| <i>TPMT</i> *1/ <i>TPMT</i> *1 | 17 (44, 7) | 35 (39, 4) | | |
|---|--------------------------------|------------------------------------|--------|------------------------|
| | Toxicidade Hematológica | Sem toxicidade Hematológica | | |
| | No. (%) | No. (%) | | |
| | N=84 | N=45 | | |
| Dois alelos de atividade baixo-intermediária | 27 (32, 1) | 14 (31) | 0, 835 | 1, 165 (0, 507-2, 678) |
| <i>TPMT</i> *3A / <i>TPMT</i> *3A | 4 (4, 8) | 6 (13, 3) | | |
| <i>TPMT</i> *3A / <i>TPMT</i> *3B | 2 (2, 4) | 0 | | |
| <i>TPMT</i> *3A / <i>TPMT</i> *3C | 4 (4, 8) | 0 | | |
| <i>TPMT</i> *3A / <i>TPMT</i> *2 | 2 (2, 4) | 0 | | |
| <i>TPMT</i> *3A / <i>TPMT</i> *8 | 2 (2, 4) | 1 (2, 2) | | |
| <i>TPMT</i> *3B / <i>TPMT</i> *3B | 0 | 1 (2, 2) | | |
| <i>TPMT</i> *3B / <i>TPMT</i> *8 | 1 (1, 2) | 0 | | |
| <i>TPMT</i> *3C / <i>TPMT</i> *3C | 2 (2, 4) | 1 (2, 2) | | |
| <i>TPMT</i> *3C / <i>TPMT</i> *8 | 1(1, 2) | 0 | | |
| <i>TPMT</i> *2 / <i>TPMT</i> *2 | 5 (5, 9) | 2 (4, 4) | | |
| <i>TPMT</i> *8/ <i>TPMT</i> *8 | 4 (4, 8) | 3 (6, 7) | | |
| Um alelo de atividade baixo-intermediária | 23 (27, 4) | 13 (29) | | |
| <i>TPMT</i> *1/ <i>TPMT</i> *3A | 13 (15, 5) | 10 (22, 2) | | |
| <i>TPMT</i> *1/ <i>TPMT</i> *3B | 3 (3, 6) | 1 (2, 2) | | |
| <i>TPMT</i> *1/ <i>TPMT</i> *3C | 6 (7, 1) | 2 (4, 4) | | |
| <i>TPMT</i> *1/ <i>TPMT</i> *8 | 1 (1, 2) | 0 | | |
| Dois alelos de atividade alta | 34 (40, 5) | 18 (40) | | |
| <i>TPMT</i> *1/ <i>TPMT</i> *1 | 34 (40, 5) | 18 (40) | | |

^a Dois alelos de atividade baixa/intermediária vs. outros fenótipos.

A tabela 22 mostra a distribuição do genótipo da variante rs12201199 do gene *TPMT* entre os pacientes com toxicidade grave ao tratamento para LLA. Foi observado que os pacientes que possuem o genótipo homozigoto mutante AA para essa variante têm um risco de 4, 098 vezes maior de apresentar toxicidade grave infecciosa durante o tratamento para LLA infantil em relação aos que apresentam os outros genótipos (P=0, 037; OR=4, 098; IC95%=1, 123-14, 959).

Tabela 22 – Distribuição das frequências da variante RS12201199 do gene *TPMT* em relação à presença de toxicidades grave durante o tratamento para LLA infantil.

| Genótipos | Toxicidade Gastrointestinal N=83 No. (%) | P value ^a | OR (IC95%) ^a | Toxicidade Infecçiosa N=111 No. (%) | P value ^a | OR (IC95%) ^a | Toxicidade SNC N=38 No. (%) | P value ^a | OR (IC95%) ^a | Toxicidade Hematológica N=84 No. (%) | P value ^a | OR (IC95%) ^a |
|-----------|--|----------------------|---------------------------|---|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------------|--|----------------------|-------------------------|
| TT | 33 (39, 8) | 0, 708 | 0, 825 (0, 396-1, 719) | 50 (45) | | | 18 (47, 4) | | | 35 (41, 7) | | |
| TA | 9 (10, 8) | | | 12 (10, 8) | | | 2 (5, 3) | | | 10 (11, 9) | | |
| AA | 41 (49, 4) | | | 49 (44, 1) | 0, 037 | 4, 098 (1, 123-14, 959) | 18 (47, 4) | 0, 431 | 1, 456 (0, 676-3, 135) | 39 (46, 4) | 1 | 0, 977 (0, 469-,469) |

Nota: ^a genótipo homozigoto mutante AA vs. outros genótipos.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi investigada a relação de polimorfismos do gene *TPMT* com a presença de toxicidades graves (3 e 4) em pacientes pediátricos com LLA tratados com 6-MP.

A incidência de LLA é aproximadamente 20% maior no sexo masculino do que do sexo feminino (MEISSNER *et al.*, 2014), e o subtipo imunofenotípico de linfoblastos de células B (LLA-B) é o mais prevalente, responsável por 80% dos casos da expansão clonal das células leucêmicas na LLA e está em muitos casos ligados a uma melhor resposta terapêutica do paciente (ONCIU, 2009). De forma semelhante, o sexo masculino e o subtipo de linhagem de linfócitos B foram predominantes entre os pacientes com LLA aqui estudados.

A literatura relata que o tratamento da LLA pode sofrer influências étnicas (PUI *et al.*, 2003; FOUCAR *et al.*, 1991; POLLOCK *et al.*, 2000; STILLER *et al.*, 2000; BHATIA *et al.*, 2002; Relling *et al.*, 2011). Crianças hispânicas e negras geralmente apresentam piores resultados no tratamento do que crianças brancas (PUI *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2011; POLLOCK *et al.*, 2000; BHATIA *et al.*, 2002). Dessa forma, é concebível que variações genômicas relacionadas com ancestralidade podem contribuir para as disparidades étnicas no tratamento da LLA (YANG *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2012).

Estudos populacionais concluíram que os caucasianos mostraram a maior frequência de variantes *TPMT*, e eles contêm também algumas variantes que são raramente relatados em qualquer outro grupo (*TPMT*2*, *TPMT*20*, *TPMT*21*, *TPMT*22*, *TPMT*23*, *TPMT*24*, *TPMT*25*). Ocorre com maior frequência da variante *TPMT*3C* neste grupo. Asiáticos são menos propensos a ter variantes do gene *TPMT*. Poucos casos de variantes *TPMT* foram relatados em chineses e japoneses, sendo a variante *TPMT*3C* a mais frequente. Indianos e Paquistaneses são os menos propensos a compartilhar variantes *TPMT*. Através de estudos de população, torna-se claro que caucasiano e afro-americanos são os grupos mais afetados e permanecem em alto risco de reação adversa ao medicamento quando submetidos à dosagem padrão de medicamentos tiopurina. Nestes sentido, os asiáticos, especialmente o sudoeste asiático (indianos, paquistaneses) têm atividade de *TPMT*

normal, não são suscetíveis de experimentar qualquer reação adversa ao medicamento a partir das doses normais de tiopurinas (KATARA *et al.*, 2015).

Dessa forma, no presente trabalho foi aplicado um painel de 48 marcadores informativos de ancestralidade (SANTOS *et al.*, 2010) como controle genômico da ancestralidade, a fim de evitar interpretações espúrias resultantes da subestrutura da população. O papel importante do controle de ancestralidade genômica em estudos de associação é claro, especialmente em populações com um elevado grau de mistura entre grupos étnicos, tais como a população brasileira.

A presença de toxicidades graves no tratamento da LLA foi testada em relação à ancestralidade genômica, e não foi observada diferença estatisticamente significativa para as toxicidades relatadas ($p > 0,05$). Ou seja, a presença de toxicidades graves não sofreu distorção da influência ancestralidade genômica na amostra estudada.

Em relação às toxicidades relatadas no estudo, a infecciosa foi a mais prevalente (86%), seguida da hematológica (65%), da gastrointestinal (64,8%) e toxicidade no sistema nervoso central (29,9%).

As toxicidades representam um dos principais desafios enfrentados pelos oncologistas no tratamento da LLA pediátrica, reações adversas graves podem levar à interrupção do tratamento com efeitos importantes sobre o resultado e, assim, afetar a qualidade de vida do paciente, mesmo dos que sobrevivem, em longo prazo (SCHMIEGELOW *et al.*, em 2010; AIRTUM, 2012; FRANCA *et al.*, 2015).

As infecções constituem a principal causa de mortalidade em crianças oncológicas, incluindo as com LLA (TAMBURRO, 2005; LUND *et al.*, 2010). Nossos resultados corroboram o trabalho de Silva *et al.* (2011) que observou uma alta frequência de mortalidade (55%) em pacientes pediátricos da região Amazônica decorrente principalmente de toxicidade infecciosa e hematológica.

O tratamento da LLA infantil envolve a combinação de uma grande variação de fármacos em diferentes dosagens, que compreende glicocorticoides, análogos de purina, antimetabólitos, agentes alquilantes, medicamentos antimitóticos e antraciclinas (PUI; EVANS, 2006; BHATIA *et al.*, 2012). Toxicidades graves ao tratamento são decorrentes de fatores que envolvem a administração prolongada do fármaco, uso intensivo e simultâneo dos medicamentos, efeitos farmacológicos sobre o tecido alvo e ao tecido saudável, além de fatores do hospedeiro, incluindo

polimorfismos genéticos que influenciam a metabolização de drogas e função imunológica (SCHRAPPE *et al.*, 2011; OHTA; SITKOVSKY, 2001; KISHI *et al.*, 2007; HELLER *et al.*, 2004). Portanto, em terapias com múltiplos fármacos, pode ser muito difícil de identificar o agente causador de reações adversas, dessa forma a genética do paciente pode ter um papel importante para definir os efeitos tóxicos decorrentes da terapia (GERVASINI; VAGACE *et al.*, 2012; STOCCO *et al.*, 2012).

O fármaco 6-MP é um antimetabólito, componente essencial na terapia de manutenção/consolidação da LLA pediátrica (RELLING *et al.*, 1999; EL-RASHEDY *et al.*, 2015). A variabilidade individual de toxicidade relacionada a 6-MP pode ser atribuída em parte a polimorfismos genéticos presentes no gene *TPMT* (ZHOU, 2006; KAPOOR *et al.*, 2009; RELLING *et al.*, 2011; EL-RASHEDY *et al.*, 2015). Mais de 30 variantes do *TPMT* foram descritos (UJIIE *et al.*, 2008; RELLING *et al.*, 2013), as variantes mais comuns incluem a *TPMT*3C* (A719G), *TPMT*3B* (G460A), *TPMT*3A* (G460A e A719G) e *TPMT*2* (G238C), sendo responsável por 89-95% dessas variações genéticas (UJIIE *et al.*, 2008; EVANS, 2002; RUTHERFORD; Daggett, 2008; KATARA *et al.*, 2015). variantes genéticas de *TPMT*

Tem sido reportado que aproximadamente 11% na população global possui algum grau de diminuição na atividade da *TPMT* e 0,3% têm uma verdadeira deficiência de *TPMT* (KATARA *et al.*, 2015). Entre 36 variante do gene *TPMT*, a mais comum é *TPMT*3A*, que é comum em caucasianos (frequência de 5%). A segunda variante mais frequente é *TPMT*3C*, que é mais comum em populações asiáticas (2% de frequência) (KATARA *et al.*, 2015).

No presente trabalho as variantes mais prevalentes foram *TPMT*3A* (7, 6%), seguido pelo *TPMT*3C* e *TPMT*8*, ambos com 7,3%. As variantes menos frequentes foram *TPMT*2* (5,08%) e *TPMT*3B* (3%).

Na literatura consultada foram encontrados alguns trabalhos envolvendo investigações do gene *TPMT* em populações brasileiras (BOSON *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2008; CHIABAI, 2010; GASTAL *et al.*, 2012).

O trabalho de Boson *et al.* (2003) investigou 202 indivíduos com idade de 18 anos ou mais, que frequentavam o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nenhum dos indivíduos investigados tinham diagnóstico de leucemia. A frequência das variantes estudadas foi *TPMT*2* 2,2%, *TPMT*3A* 1,5%, *TPMT*3B* 0,2%, *TPMT*3C* 1,0%, *TPMT*5* e *TPMT*6* não foram encontrados na análise.

Um estudo desenvolvido por Silva *et al.* (2008) estimou a frequência das principais variantes alélicas do gene *TPMT* em uma população de 116 crianças e adolescentes com LLA, tratados com 6-MP, no Hospital das Clínicas de Minas Gerais - Belo Horizonte. As frequências das variantes alélicas foram: *TPMT**3A 3,9 %, *TPMT**3C 0,9%, *TPMT**2 0,4%. Não foi detectado o alelo *TPMT** 3B.

O estudo desenvolvido por Chiabai (2010) investigou três polimorfismos (*TPMT**2, *TPMT**3B, *TPMT**4) relacionados à resposta farmacogenética do gene *TPMT* em 95 pacientes atendidos pelo Núcleo de Onco-Hematologia Pediátrica da secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES/DF) que se encontrava em diferentes fases de tratamento para a LLA. Nesse estudo a frequência encontrada do polimorfismo *TPMT**2 foi 1,6%, não foram encontrados os alelos *TPMT**3B e *TPMT**4 na população estudada.

O trabalho de Gastal *et al.* (2012) analisou um amostra de 199 doadores de sangue do Hemocentro Regional de Joinville, SC, Brasil. A frequência encontrada das variantes do gene *TPMT* foi: *TPMT**3A 3,5%, *TPMT**3B 1%, *TPMT**2 1% e *TPMT**3C 0,5%.

De maneira geral em todos os trabalhos em populações brasileiras (BOSON *et al.*, 2003; SILVA; 2008; CHIABAI, 2010; GASTAL *et al.*, 2012) a variante *TPMT**3A foi a mais frequente, enquanto que um dos alelos menos frequente foi o *TPMT**3B, corroborando com os nossos achados.

A frequência das variantes do gene *TPMT* foi mais alta no nosso trabalho, do que nos observados em outros estudos das populações brasileiras (BOSON *et al.*, 2003; SILVA; 2008; CHIABAI, 2010; GASTAL *et al.*, 2012). Esse fato pode ser justificado por existirem diferenças étnicas nas frequências dos alelos variantes de baixa atividade da *TPMT* (COLLIE-DUGUID *et al.*, 1999; RELLING *et al.*, 2011). Dessa forma, o perfil genético do gene *TPMT* pode variar dependendo da região geográfica estudada, já que a população brasileira sofre grande influência do efeito da subestruturação genética, gerada pela contribuição desigual dos agrupamentos ancestrais formadores da população (europeus, africanos e ameríndios) em cada região geográfica brasileira (SANTOS *et al.*, 2010).

Nenhum dos trabalhos encontrados nas populações brasileiras associou as variantes de baixa atividade da *TPMT* com a presença de toxicidades a terapia da LLA infantil. No presente trabalho não foi observada uma associação significativa

entre o perfil de metabolização deficiente da TPMT (*TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B*, *TPMT*3C*, *TPMT*8*) com nenhuma das toxicidades graves (infeciosa, hematológica, gastrointestinal e toxicidade no sistema nervoso central) relatadas nos pacientes com LLA estudados ($P > 0,05$).

No entanto, os dados encontrados mostram que há uma significativa relação entre o polimorfismo do gene *TPMT* (rs12201199) e a ocorrência de toxicidade infecciosa grave durante o tratamento da LLA infantil. Foi observado que os pacientes que possuem o genótipo homocigoto mutante AA para o polimorfismo no gene *TPMT* têm um risco de 4,098 vezes maior de apresentar toxicidade grave infecciosa durante o tratamento para LLA infantil em relação aos que apresentam os outros genótipos ($P = 0,037$; $OR = 4,098$; $IC95\% = 1,123-14,959$).

A variante do gene *TPMT* rs12201199 vem sendo bastante estudada em associação com ototoxicidade em crianças oncológicas tratadas com cisplatina (ROSS *et al.*, 2009; PUSSEGODA *et al.*, 2013; CARLETON *et al.*, 2014). A cisplatina é um agente quimioterapêutico largamente utilizado para o tratamento de tumores sólidos, incluindo hepatoblastoma, tumores cerebrais e tumores de células germinativas, e tem contribuído para um aumento significativo na taxa de sobrevivência dos pacientes (PERILONGO *et al.*, 2009). Um dos fatores que podem influenciar a ototoxicidade por cisplatina é o uso concomitante de vincristina. Se a própria vincristina é ototóxica ainda não está claro. Estudos sugerem que a vincristina pode ser ototóxica (LUGASSY; SHAPIRA *et al.*, 1990; AYDOGDU *et al.*, 2000) ou transientemente ototóxico em doses elevadas (BOKEMEYER *et al.*, 1998), ao passo que ensaios clínicos sistemáticos têm relatado que a vincristina sozinha não é ototóxica (LUGASSY; SHAPIRA, 1996; RIGA *et al.*, 2006). Bokemeyer *et al.* (1998) relataram um aumento da prevalência dos sintomas ototóxicos nos pacientes que receberam vincristina em conjunto com cisplatina.

A variante rs 94T>A rs12201199 do gene *TPMT* está presente em uma região intrônica do gene e alguns estudos têm sugerido que essa variante está em forte desequilíbrio de ligação com alelos de baixa metabolização do gene *TPMT* como os *TPMT*3C* (rs1142345) e *TPMT*3B* (rs1800460) (TAMM *et al.*, 2008; ROSS *et al.*, 2009, CARLETON *et al.*, 2014). O trabalho de Ross *et al.* (2009) investigou os polimorfismos do gene *TPMT* e *COMT* com o efeito ototóxico da cisplatina em pacientes oncológicos, os resultados revelaram que a variante rs12201199 estava

presente em 17 dos 25 (68%) indivíduos que tiveram ototoxicidade, assim como a variante rs1142345 (*TPMT*3C*) que esteve presente em todos os 17 indivíduos com ototoxicidade, e a variante rs1800460 (*TPMT*3B*) presente em 15 desses indivíduos e nenhum dos controles (sem ototoxicidade). Indivíduos que carregam tanto a variante rs1142345 (*TPMT*3C*) e rs1800460 (*TPMT*3B*) são definidas como portadores do haplótipo *TPMT*3A*. O trabalho de Ross et al. (2009) sugere que a associação de efeitos ototóxicos da cisplatina com rs12201199 é provavelmente devido à ligação com rs1142345 e rs1800460 (ROSS *et al.*, 2009).

A genotipagem das variantes do gene *TPMT* rs1142345 e rs1800460 é particularmente importante para identificar os indivíduos com maior probabilidade de de toxicidade se tratados com doses padrão de 6-MP (AYDOGDU *et al.*, 2000) dessa forma é concebível que a variante rs12201199 pode ser um marcador candidato para atestar toxicidades em pacientes tratados com 6-MP. Além disso, a pesar de pacientes com LLA infantil não fazerem uso de cisplatina durante a terapia padrão, a vincristina é um fármaco importante utilizado durante o tratamento da LLA pediátrica o que pode justificar o a investigação da variante rs12201199 nesses pacientes.

Poucos trabalhos têm investigado a variante rs12201199 em associação com o metabolismo de tiopurina e da resposta clínica da leucemia linfoblástica aguda em crianças (MATIMBA *et al.*, 2014), portanto nossos dados precisam ser confirmado em estudos posteriores. Apesar disso, este resultado pode ser importante para ajudar a prever riscos de toxicidade durante o tratamento, contribuindo para um melhor prognóstico individual dos pacientes com LLA infantil.

É bem estabelecido na literatura que as variantes polimórficas do gene *TPMT* desempenham um papel importante na resposta terapêutica do 6-MP (MCLEOD *et al.*, 2000; ADAM *et al.*, 2012), no entanto, ainda existe uma grande variabilidade interindividual na farmacocinética dos metabolitos ativos do 6-MP, uma vez que algumas toxicidades permanecem inexplicáveis (ADAM *et al.*, 2012). Assim, é recomendável que além da monitorização através de genotipagem das variações genéticas do *TPMT*, a medição das concentrações de metabolitos ativos de 6-MP seja empregada, como uma ferramenta complementar ao genótipo do *TPMT* na previsão de toxicidade em pacientes em tratamento com tiopurinas, como o 6-MP (ADAM *et al.*, 2012).

Além disso, apesar dos polimorfismos do gene *TPMT* explicarem em parte a variabilidade farmacocinética do 6-MP, outros genes podem estar envolvidos no metabolismo do 6-MP, e polimorfismos nesses genes podem ter um grande impacto sobre a resposta terapêutica da LLA (FRANCA *et al.*, 2015) Dessa forma fica claro que estudos mais amplos devem ser empregados para melhor descrever o efeito farmacogenético na resposta terapêutica do 6-MP no tratamento da LLA infantil.

6 CONCLUSÃO

Não foi observada uma associação significativa entre o perfil de metabolização deficiente da TPMT (*TPMT*2*, *TPMT*3A*, *TPMT*3B*, *TPMT*3C*, *TPMT*8*) com nenhuma das toxicidades graves (3-4) relatadas nos pacientes com LLA estudados ($P>0,05$).

Há uma significativa relação entre o polimorfismo do gene *TPMT* (rs12201199) e a ocorrência de toxicidade infecciosa grave durante o tratamento da LLA infantil.

Os pacientes que possuem o genótipo homocigoto mutante AA para o polimorfismo no gene *TPMT* têm um risco de 4,098 vezes maior de apresentar toxicidade grave infecciosa durante o tratamento para LLA infantil em relação aos que apresentam os outros genótipos ($P=0,037$; $OR=4,098$; $IC95\%=1,123-14,959$).

Este resultado pode ser importante para ajudar a prever riscos de toxicidade durante o tratamento, contribuindo para um melhor prognóstico individual dos pacientes com LLA infantil.

7 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J. et al. **Pharmacogenetics of cancer chemotherapy**. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 2006.
- ADAM DE BEAUMAIS, T.; JACQZ-AIGRAIN, E. **Pharmacogenetic determinants of mercaptopurine disposition in children with acute lymphoblastic leukemia**. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2012. p. 1233-1242.
- AIRTUM Working Group; CCM; AIEOP Working Group. **Italian cancer figures, report 2012: Cancer in children and adolescents**. *Epidemiologia e Prevenzione*, 2013. 225 p.
- AJANI, J. A. et al. **Phase I pharmacokinetic study of S-1 plus cisplatin in patients with advanced gastric carcinoma**. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2005. p. 6957-6965.
- AKASAKA, T. et al. **Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)**. *Blood*, 2007. p. 3451–3461.
- ALVES, S. et al. **Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: alternative molecular diagnosis and preliminary data from Northern Portugal**. *Pharmacogenetics*, 1999. p. 257–261.
- APPELBAUM, F. R. **Molecular diagnosis and clinical decisions in adult acute leukemia**. *Seminars in hematology*, 1999. p. 401–410.
- ARICÓ, M. et al. **The seventh international childhood acute lymphoblastic leukemia workshop report**: Palermo, Italy, January 29-30, 2005. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 2005.
- AYDOGDU, I., et al. **Bilateral transient hearing loss associated with vincristine therapy**: case report. *Journal of Chemotherapy*, 2000. p. 530–532.
- BABA, S. et al. **Incidence and survival trends for childhood cancer in Osaka, Japan, 1973-2001**. *Cancer Science*, 2010. p. 787–792.
- BAMSHAD, M. et al. **Deconstructing the relationship between genetics and race**. *Nature reviews. Genetics*, 2004. p. 598–609.

BENNETT, J. M. et al. **Proposals for the classification of the acute leukaemias.** French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Hematology*, 1976. p. 451–458.

BHATIA, S. et al. **Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia.** *Blood*. 2002. p. 1957-64.

BHATIA, S. et al. **Nonadherence to oral mercaptopurine and risk of relapse in Hispanic and non-Hispanic white children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's oncology group.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2012. p. 2094–101.

BLOCHE, M. **Health care disparities – science, politics, and race.** *The New England journal of medicine*, 2004. p. 1568–70.

BOKEMEYER, C. et al. **Analysis of risk factors for cisplatin-induced ototoxicity in patients with testicular cancer.** *British Journal of Cancer*, 1998. p. 1355–1362.

BOSETTI, C. et al. **Childhood cancer mortality in Europe, 1970-2007.** *European Journal of Cancer*, 2010. p. 384–394.

BOSON, W. L. et al. **Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a Brazilian population.** *The pharmacogenomics journal*, 2003. p. 178–182

BRACKETT, J. et al. **Use of allopurinol in children with acute lymphoblastic leukemia to reduce skewed thiopurine metabolism.** *Pediatric Blood & Cancer*, 2014. p. 1114–7.

BRAGA, P. E.; LATORRE, M. R. D. O.; CURADO, M. **Câncer na infância: análise comparativa da incidência, mortalidade e sobrevida em Goiânia (Brasil) e outros países.** *Cadernos de saúde pública*, 2002. p. 33–44.

BROWN, B. W.; BRAUNER, C.; MINNOTTE, M. C. **Noncancer deaths in white adult cancer patients.** *Journal of the National Cancer Institute*, 1993. p. 979–987.

CARLETON, B.C. et al. **Genetic markers of cisplatin-induced hearing loss in children.** *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2014. p. 296-8.

CHABNER, B.A. et al. **Antineoplastic agents.** *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, New York: McGraw- Hill, 2001.

CHALMERS, A. H.; KNIGHT, P. R.; ATKINSON, M. R. **6-Thiopurines as substrates and inhibitors of purine oxidases: a pathway for conversion of azathioprine into 6-thiouric acid without release of 6-mercaptopurine.** *Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science*, 1969. p. 263–73.

CHANG, J.S. et al. **Genetic polymorphisms in adaptive immunity genes and childhood acute lymphoblastic leukemia**. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2010. p. 2152–2163.

CHATENOUD, L. et al. **Childhood cancer mortality in America, Asia, and Oceania, 1970 through 2007**. *Cancer*, 2010. p. 5063–5074.

CHEOK, M. H.; EVANS, W. E. **Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy**. *Nature reviews. Cancer*, 2006. p. 117–129.

CHEOK, M. H. et al. **Pharmacogenetics in Acute Lymphoblastic Leukemia**. *Seminars in Hematology*, 2009. p. 39–51

CHESSELLS, J. **Relapsed lymphoblastic leukaemia in children: a continuing challenge**. *British Journal of Haematology*, 1998. p. 423–38.

CHIABAI, M. A. **Polimorfismos farmacogenéticos relacionados a drogas utilizadas no tratamento da leucemia linfóide aguda na população brasileira**. *Dissertação de Mestrado*. Brasília. Universidade Católica de Brasília, 2010, 85 p.

COREY, L.; BOECKH, M. **Voriconazole as Empirical Antifungal Therapy in Patients with Neutropenia and Persistent Fever**. *The New England journal of medicine*, 2002. p. 221–22.

COUSTAN-SMITH, E. et al. **Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse**. *Leukemia*, 2004. p. 499-504.

CRAVEN, R. A.; VASUDEV, N. S.; BANKS, R. E. **Proteomics and the search for biomarkers for renal cancer**. *Clinical Biochemistry*, 2013. p. 456-465.

CROCE, C. M. **Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer**. *Nature reviews. Genetics*, 2009. p. 704–714.

CURADO, M. P. et al. **Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America**. *Revista panamericana de saúde pública - Pan American journal of public health*, 2011. p. 96–102.

DANESI, R. et al. **Pharmacogenetics in oncology**. *European Journal of Cancer*, 2008. p. 74–78.

DERVIEUX, T. et al. **Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients**

treated with azathioprine. British Journal of Clinical Pharmacology, 1999. p. 793–800.

DONOWITZ, G. R. et al. **Infections in the neutropenic patient-new views of an old problem.** Hematology/The Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2001. p. 113–139.

DUBINSKY, M. C. **Optimizing immunomodulator therapy for inflammatory bowel disease.** Current gastroenterology reports, 2003. p. 506–511.

ECKERT, C. et al. **Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia-Long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96.** European Journal of Cancer, 2013. p. 1346–1355.

EDEN, T. et al. **Systematic review of the addition of vincristine plus steroid pulses in maintenance treatment for childhood acute lymphoblastic leukaemia – an individual patient data meta-analysis involving 5,659 children.** British Journal of Haematology, 2010. p. 722–33.

EICHELBAUM, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; EVANS, W. E. **Pharmacogenomics and individualized drug therapy.** Annual review of medicine, 2006. p. 119–137.

ELION, G. B. **The purine path to chemotherapy.** In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1989. p. 321–330.

EL-RASHEDY F.H. et al. **Clinical implication of thiopurine methyltransferase polymorphism in children with acute lymphoblastic leukemia: A preliminary Egyptian study.** Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology, 2015. p. 265-70.

EVANS, A.; GILBERT, E.; ZANDSTRA, R. **The increasing incidence of central nervous system leukemia in children.** Cancer, 1970. 404 p.

EVANS, W. E. et al. **Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia.** Journal of Pediatrics, 1991. p. 985–989.

EVANS, W. E.; JOHNSON, J. A. **Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response.** Annual review of genomics and human genetics, 2001. p. 9–39.

EVANS, W. E. et al. **Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine.** Journal of Clinical Oncology, 2001. p. 2293–2301.

Evans, W.E. **Comprehensive assessment of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) alleles in three ethnic populations.** Journal of Pediatric Hematology/Oncology, 2002. p. 335–6.

Foucar, K. et al. **Survival of children and adolescents with acute lymphoid leukemia.** A study of American Indians and Hispanic and non-Hispanic whites treated in New Mexico (1969 to 1986). Cancer. 1991. p. 2125-30.

FRANCA, R. et al. **Pharmacogenetics and induction/consolidation therapy toxicities in acute lymphoblastic leukemia patients treated with AIEOP-BFM ALL 2000 protocol.** The pharmacogenomics journal, 2015.

FUJITA, K. **Cytochrome P450 and anticancer drugs.** Current drug metabolism, 2006. p. 23–37.

GAJJAR, A. et al. **Persistence of circulating blasts after 1 week of multiagent chemotherapy confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia.** Blood, 1995. p. 1292–1295.

GALLAGHER, D. J.; PHILLIPS, D. J.; HEINRICH, S. D. **Orthopedic manifestations of acute pediatric leukemia.** The Orthopedic clinics of North America, 1996. p. 635–644.

GANDEMER, V. et al. **Excellent prognosis of late relapses of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: Lessons from the FRALLE 93 protocol.** Haematologica, 2012. p. 1743–1750.

GASTAL G.R. et al. **Toxicity of azathioprine: why and when? Analysis of the prevalence of polymorphism in Joinville, SC, Brazil.** Arquivos de Gastroenterologia. 2012. p. 130-134.

GATTA, G. et al. **Childhood cancer survival in Europe and the United States.** Cancer, 2002. p. 1767–1772.

GAYNON, P. S. et al. **Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983–2002: A Children's Oncology Group Report.** Leukemia, 2010. p. 285-297.

GERR, H. et al. **Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: Characterization, prognosis and therapy recommendations.** British Journal of Haematology, 2010. p. 84–92.

GERVASINI, G.; VAGACE, J.M. **Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia.** Frontiers in genetics, 2012; p. 249.

GISBERT, J. P. et al. **Thiopurine methyltransferase activity in Spain: A study of 14,545 patients.** Digestive Diseases and Sciences, 2007. p. 1262–1269.

GIVERHAUG, T.; LOENNECHEN, T.; AARBAKKE, J. **The interaction of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX).** General Pharmacology, 1999. p. 341–346.

GLAUSER, T. A. et al. **Diethyldithiocarbamate S-methylation: evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase.** The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1993. p. 23–32.

GOTO, Y. et al. **A novel single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression.** Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2001. p. 1952–1956.

GRABOIS, M. F.; OLIVEIRA, E. X. G.; CARVALHO, M. S. **Childhood cancer and pediatric oncologic care in Brazil: access and equity.** Cadernos de saúde pública/Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 2011. p. 1711–20.

GRANDE, A. G. **Mortalidad por cáncer en niños y adolescentes de la Comunidad de Madrid, 1977-2001.** An Pediatr (Barc), 2005. p. 420–426.

HAMDAN-KHALIL, R. et al. **Identification and functional analysis of two rare allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase gene, TPMT*16 and TPMT*19.** Biochemical Pharmacology, 2005. p. 525–529.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation.** Cell, 2011. p. 646-674.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer.** University of California at San Francisco. Cell, 2000. p. 57–70.

HARRIS, M. et al. **Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low**

risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. Blood, 1992. p. 3316–24.

HASLE, H.; CLEMMENSEN, I. H.; MIKKELSEN, M. **Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome.** Lancet, 2000. p. 165–169.

HAWLEY, S. et al. **A model for the design and construction of a resource for the validation of prognostic prostate cancer biomarkers: the Canary Prostate Cancer Tissue Microarray.** Advances in anatomic pathology, 2013. p. 39–44.

HAYDU, J.; FERRANDO, A. **Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia.** Current Opinion in Hematology, 2013. p. 369–73.

HEEREMA, N. et al. **Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children's oncology group studies: a report from the children's oncology group.** Journal of Clinical Oncology, 2013. p. 3397–402.

HELLER, T. et al. **Rapid detection of ITPA 94C4A and IVS2+21A4C gene mutations by real-time fluorescence PCR and in vitro demonstration of effect of ITPA IVS2+21A4C polymorphism on splicing efficiency.** Clinical chemistry, 2004. p. 2182–2184.

HERRLINGER, K. R. et al. **6-thioguanine-buried alive?** Gastroenterology, 2004. p. 9410–11.

HOCHBERG, J. et al. **Criteria for and outcomes of allogeneic haematopoietic stem cell transplant in children, adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission.** British Journal of Haematology, 2013. p. 27-42.

HOF, J. et al. **Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia.** Journal of Clinical Oncology, 2011. p. 3185–3193.

HON, Y. Y. et al. **Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans.** Human Molecular Genetics, 1999. p. 371–376.

HOSKING, F. J. et al. **MHC variation and risk of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.** Blood, 2011. p. 1633–1640.

HOWARD, S. C. et al. **Childhood cancer epidemiology in low-income countries.** Cancer, 2008. p. 461-72.

INAMOCHI, H. et al. **Delayed cytotoxicity of 6-mercaptopurine is compatible with mitotic death caused by DNA damage due to incorporation of 6-thioguanine into DNA as 6-thioguanine nucleotide.** Journal of experimental & Clinical Cancer Research : CR, 1999. p. 417–424.

INCA. **Câncer da criança e adolescente no Brasil:** dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Rio de Janeiro, 2008.

INCA. **Estimativa 2010:** incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2010.

INCA. **Estimativa 2011:** incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

INCA. **Estimativa 2014:** incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014.

INCA. **Estimativa 2016:** incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015.

JABBOUR, E. J.; FADERL, S.; KANTARJIAN, H. M. **Adult Acute Lymphoblastic Leukemia.** Mayo Clinic Proceedings, 2005. p. 1517–1527.

JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** Annals of Oncology, 2001. p. 490–491.

JOHNSON, P. J.; MCFARLANE, I. G.; WILLIAMS, R. **Azathioprine for long-term maintenance of remission in autoimmune hepatitis.** The New England journal of medicine, 1995. p. 958-63

JONSSON, O. G.; KAMEN, B. A. **Methotrexate and childhood leukemia.** Cancer Investigation, 1991. p. 53–61.

KAPOOR, G. **Application of SNaPshot for analysis of thiopurine methyltransferase gene polymorphism.** Indian Journal of Medical Research, 2009. p. 500–505.

KATARA, P.; KUNTAL H. **TPMT Polymorphism: When Shield Becomes Weakness.** Interdiscip Sci. *no prelo*, 2015.

KIRSCHNER, B. S. **Safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease.** Gastroenterology, 1998. p. 813–821.

KISHI, S. et al. **Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity.** Blood, 2007. p. 4151–4157.

KOPPEN, I. J. N.; HERMANS, F. J. R.; KASPERS, G. J. L. **Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia.** British Journal of Haematology, 2010. p. 3-14.

KRYNETSKI, E. Y.; EVANS, W. E. **Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy:** The thiopurine S-methyltransferase paradigm. Pharmaceutical Research, 1999. p. 342-349.

KRYNETSKI, E. Y. et al. **A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. p. 949–953.

LAHOUD, M. H. et al. **Gene targeting of Desrt, a novel ARID class DNA-binding protein, causes growth retardation and abnormal development of reproductive organs.** Genome Research, 2001. p. 1327–1334.

LENNARD, L. et al. **Congenital thiopurine methyltransferase deficiency and 6-mercaptopurine toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukaemia.** Archives of Disease in Childhood, 1993. p. 277-279.

LENNARD, L.; LILLEYMAN, J. S. **Variable mercaptopurine metabolism and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukemia.** Journal of Clinical Oncology, 1989. p. 1816–1823.

LENNARD, L.; LILLEYMAN, J. S. **Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism.** Therapeutic drug monitoring, 1996. p. 328–334.

LENNARD, L. et al. **Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia.** Lancet, 1990. p. 225–229.

LENNARD, L.; SINGLETON, H. J. **High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine:** Quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. Journal of Chromatography - Biomedical Applications, 1992. p. 83–90.

LENNARD, L.; WELCH, J. C.; LILLEYMAN, J. S. **Thiopurine drugs in the treatment of childhood leukaemia:** the influence of inherited thiopurine methyltransferase activity on drug metabolism and cytotoxicity. 1997. p. 455-461.

LEVINE, J. E. et al. **Donor leukocyte infusions to treat hematologic malignancy relapse following allo-SCT in a pediatric population.** Bone marrow transplantation, 2008. p. 201–205.

LEWIS, L. D. et al. **Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: A possible drug-drug interaction.** *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1997. p. 464–475.

LI, J. Z. et al. **Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation.** *Science (New York, N.Y.)*, 2008. p. 1100–1104.

LINABERY, A. M.; ROSS, J. A. **Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004).** *Cancer*, 2008. p. 416–432.

LOCATELLI, F. et al. **How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Blood*, 2012. p. 2807-2816.

LOENNECHEN, T. et al. **Isolation of a human thiopurine S Methyltransferase (TPMT) complementary DNA with a single nucleotide transition A719G (TPMT*3C) and its association with loss of TPMT protein and catalytic activity in humans.** *Clinical pharmacology and therapeutics*, 1988. p. 46 – 51.

LUGASSY, G.; SHAPIRA, A. **Sensorineural hearing loss associated with vincristine treatment.** *Blut*.1990. p. 320–321.

LUGASSY, G.; SHAPIRA, A. **A prospective cohort study of the effect of vincristine on audition.** *Anticancer Drugs*. 1996. p. 525–526.

LUND, B. et al. **Risk factors for treatment related mortality in childhood acute lymphoblastic leukaemia.** *pediatric blood & cancer*. 2011.

LYSAA, R. A. et al. **Inhibition of human thiopurine methyltransferase by furosemide, bendroflumethiazide and trichlormethiazide.** *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1996. p. 393–396.

MAO, X. et al. **A genomewide admixture mapping panel for Hispanic/Latino populations.** *American journal of human genetics*, 2007. p. 1171–1178.

MARINAKI, A. M. et al. **Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase).** *Pharmacogenetics*, 2004. p. 181–187.

MATIMBA, A. et al. **Thiopurine pharmacogenomics: association of SNPs with clinical response and functional validation of candidate genes.** *Pharmacogenomics*, 2014. p. 433-447.

MATLOUB, Y. et al. **Intrathecal triple therapy decreases central nervous system relapse but fails to improve event-free survival when compared with intrathecal**

methotrexate: results of the Children's Cancer Group (CCG) 1952 study for standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2006. p. 1165–73.

MCLEOD, H. L.; EVANS, W. E. **Pharmacogenomics:** unlocking the human genome for better drug therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2001. p. 101–121.

MCLEOD, H.L. et al. **Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Leukemia*, 2000. p. 567–572.

MCLEOD, H. L. et al. **Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects.** *Clinical pharmacology and therapeutics*, 1994. p. 15–20.

MCLEOD, H. L.; SIVA, C. **The thiopurine S-methyltransferase gene locus – implications for clinical pharmacogenomics.** *Pharmacogenomics*, 2002. p. 89–98.

MEISSNER, B. et al. **Frequent and sex-biased deletion of SLX4IP by illegitimate V(D)J-mediated recombination in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Human molecular genetics*. 2014. p. 590-601.

MEYER, U. A. **Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity.** *Nature reviews. Genetics*, 2004. p. 669–676.

MILLER, R. W.; MCKAY, F. W. **Decline in US childhood cancer mortality: 1950 though 1980.** *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 1984. p. 1567–70.

MIRANDA, R. P. A. et al. **Neutropenia febril:** experiência do serviço de oncologia pediátrica do centro de cirurgia pediátrica do Hospital Universitário da Universidade de Brasília. *Brasília Médica*, 2002. p. 16–21.

MONDIAL, C. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <<http://www-dep.iarc.fr/>>. Acesso em: 2/3/2015.

MONTEIRO, G. T. R.; KOIFMAN, R. J.; KOIFMAN, S. **Confiabilidade e validade dos atestados de óbito por neoplasias.** Confiabilidade da codificação para o conjunto das neoplasias no Estado do Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública*, 1997.

MÖRICKE, A. et al. **Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia:** Data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. *Klinische Padiatrie*, 2005. p. 310–320.

MULLIGHAN, C. G. **Genomic analysis of acute leukemia.** International Journal of Laboratory Hematology, 2009.

MULLIGHAN, C. G. et al. **Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia.** Nature genetics, 2009. p. 1243–1246.

MULLIGHAN, C. G. et al. **Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia.** Nature, 2007.

MULLIGHAN, C. G. et al. **Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia.** The New England journal of medicine, 2009. p. 470–480.

NAKAJIMA, H. et al. **N-terminal region of CCAAT/enhancer-binding protein epsilon is critical for cell cycle arrest, apoptosis, and functional maturation during myeloid differentiation.** The Journal of biological chemistry, 2006. p. 14494–14502.

NGUYEN, K. et al. **Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study.** Leukemia, 2008.

NOSKIN, G. A.; PHAIR, J. P.; MURPHY, R. L. **Diagnosis and management of infection in the immunocompromised host.** Infectious Diseases, 1997. p.361–381.

OHTA, A.; SITKOVSKY, M. **Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage.** Nature 2001. p. 916–920.

ONCIU, M. **Acute Lymphoblastic Leukemia.** Hematology/Oncology Clinics of North America, 2009.

OTTERNESS, D. M. et al. **Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics.** Kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. Journal of Clinical Investigation, 1998. p. 1036–1044.

OTTERNESS, D. et al. **Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Gene sequence polymorphisms.** Clinical Pharmacology and Therapeutics, 1997. p. 60–73.

PAGANINI, H. R. **Diez pautas básicas para el manejo del paciente oncológico con neutropenia y fiebre.** Archivos Argentinos de Pediatría, 1999. p. 116–123.

PAPAEMMANUIL, E. et al. **Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia.** Nature genetics, 2009. p. 1006–1010.

PARKER, C. et al. **Effect of mitoxantrone on outcome of children with first relapse of acute lymphoblastic leukaemia (ALL R3):** An open-label randomised trial. The Lancet, 2010. p. 2009–2017.

PARRA, F. C. et al. **Color and genomic ancestry in Brazilians.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. p. 177–182.

PENA, S. D. J. et al. **The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected.** PLoS ONE, 2011.

PERILONGO, G., et al. **Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma.** The New England journal of medicine, 2009. p. 1662–1670.

PIÑEROS, M.; GAMBOA, O.; SUÁREZ, A. **Mortalidad por cáncer infantil en Colombia durante 1985 a 2008.** Rev Panam Salud Pública, 2011. p. 15–21.

PINKEL, D. **Five-year follow-up of “total therapy” of childhood lymphocytic leukemia.** JAMA : the journal of the American Medical Association, 1971. p. 648–52.

PIZZO, P. A. **Management of Fever in Patients with Cancer and Treatment-Induced Neutropenia.** The New England journal of medicine, 1993. p. 1323–1332.

PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G. **Principles and Practice of Pediatric Oncology.** 6th ed. 2011.

POLLOCK, B. H. et al. **Racial differences in the survival of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study.** J Clin Oncol. 2000. P. 813-23.

PRESENT, D. H. et al. **Treatment of Crohn’s disease with 6-mercaptopurine.** A long-term, randomized, double-blind study. 1980.

PUI, C. H. **Acute lymphoblastic leukemia in children.** Curr Opin Oncol, 2000. p. 3–12.

PUI, C.H. et al. **Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation.** The New England journal of medicine, 2009. p. 2730–2741.

PUI, C.-H.; EVANS, W. E. **Treatment of acute lymphoblastic leukemia.** The New England journal of medicine, 2006. p. 166–178.

PUI, C.H.; RELLING, M. V; DOWNING, J. R. **Acute lymphoblastic leukemia.** The New England journal of medicine, 2004. p. 1535–1548.

PUI, C.H., et al. **Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children.** JAMA. 2003. p. 2001-2007.

PUSSEGODA, K. et al. **Replication of TPMT and ABCC3 genetic variants highly associated with cisplatin-induced hearing loss in children.** Clin Pharmacol Ther. 2013. p. 243-51.

RAMACHANDRAN, S. et al. **Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. p. 15942–15947.

RAY-COQUARD, I. et al. **Identification of patients at risk for early death after conventional chemotherapy in solid tumours and lymphomas.** Br J Cancer, 2001. p. 816–822.

REIS, M. **Farmacogenética aplicada ao câncer.** Quimioterapia Individualizada e especificidade molecular. Simpósio: Farmacogenética, 2006. p. 577–586.

REIS, M.; SANTORO, A.; SUAREZ-KURTZ, G. **Thiopurine methyltransferase phenotypes and genotypes in Brazilians.** Pharmacogenetics, 2003. p. 371–373.

REITER, A. et al. **Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients.** Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. 1994.

RELLING, M. V. et al. **Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing.** Clinical pharmacology and therapeutics, 2011. p. 387–391.

RELLING, M. V. et al. **Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update.** Clinical pharmacology and therapeutics, 2013. p. 324–325.

RELLING, M. V. et al. **Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia.** Blood, 1999.

RIBEIRO, K. B. et al. **Trends in childhood leukemia mortality in Brazil and correlation with social inequalities.** *Cancer*, 2007. p. 1823–1831.

RIGA, M. et al. **The effect of treatment with vincristine on transient evoked and distortion product otoacoustic emissions.** *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006. p. 1003–1008.

RIVERA, G. K.; HUDSON, M. M.; LIU, Q.; et al. **Effectiveness of intensified rotational combination chemotherapy for late hematologic relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Blood*, 1996. p. 831–837.

ROSS, C.J. et al. **Genetic variants in TPMT and COMT are associated with hearing loss in children receiving cisplatin chemotherapy.** *Nat Genet.* 2009. p. 1345-9.

ROWLEY, J. D. **Molecular genetics in acute leukemia.** *Leukemia*, 2000.

RUBNITZ, J. E. et al. **Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study.** *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2008. p. 2186–2191.

RUTHERFORD, K.; DAGGETT, V. **Four human thiopurine s-methyltransferase alleles severely affect protein structure and dynamics.** *J Mol Biol*, 2008. p. 803–14.

SACHS, L. **The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. p. 4742–4749.

SADÉE, W.; DAI, Z. **Pharmacogenetics/genomics and personalized medicine.** *Human Molecular Genetics*, 2005.

SALAVAGGIONE, O. E. et al. **Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: Variant allele function and comparative genomics.** *Pharmacogenetic genomics*, 2005. p. 801–815.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Second edition. 1989.

SANDBORN, W. J. et al. **Lack of effect of intravenous administration on time to respond to azathioprine for steroid-treated Crohn's disease.** *North American Azathioprine Study Group.* 1999.

SANDBORN, W. et al. **Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease.** Cochrane Database Syst Rev, 2009.

SANDERSON, J. et al. **Thiopurine methyltransferase: should it be measured before commencing thiopurine drug therapy?** Annals of clinical biochemistry, 2004. p. 294–302.

SANTOS, N. P. C. et al. **Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel.** Human Mutation, 2010. p. 184–190.

SCHMIEGELOW, K. et al. **Risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is related to RBC methotrexate and mercaptopurine metabolites during maintenance chemotherapy.** Journal of Clinical Oncology, 1995. p. 345–351.

SCHMIEGELOW, K. et al. **Thiopurine methyltransferase activity is related to the risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study.** Leukemia, 2009.

SCHMIEGELOW, K. et al. **The degree of myelosuppression during maintenance therapy of adolescents with B-lineage intermediate risk acute lymphoblastic leukemia predicts risk of relapse.** Leukemia, 2010.

SCHMIEGELOW K. et al. **Long-term results of NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies of childhood acute lymphoblastic leukemia.** Leukemia. 2010a. p. 345-54.

SCHRAPPE M., et al. **Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study,** Blood 2011. p. 2077–2084.

SCHRAPPE, M. et al. **Outcomes after Induction Failure in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.** New England Journal of Medicine, 2012.

SEEGER, K. et al. **Relapse of TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia in childhood: A matched-pair analysis.** Journal of Clinical Oncology, 2001. p. 3188–3193.

SEIBEL, N. L. et al. **Early postinduction intensification therapy improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: A report from the children's oncology group.** Blood, 2008. p. 2548–2555.

SHAPIRO, R. et al. **Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1993-2003.** american journal of transplant, 2005. p. 874–86.

SHERBORNE, A. L. et al. **Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk.** Nature genetics, 2010. p. 492–494.

SILVA, D. S.; MATTOS, I. E.; TEIXEIRA, L. R. **Tendência de mortalidade por leucemias e linfomas em menores de 20 anos, Brasil.** Revista Brasileira de Cancerologia, 2013. p. 165–173.

SILVA, M. R. **Polimorfismo do gene da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) em uma população de crianças e adolescentes com Leucemia Linfocítica Aguda (LLA).** Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

SILVA, M.R. et al. **Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene polymorphism in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: association with clinical and laboratory data.** Ther Drug Monit. 2008. p. 700-704.

SILVA, W. L. et al. **Perfil clínico dos efeitos tóxicos oriundos da quimioterapia e sobrevida em pacientes pediátricos portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda em municípios da Região Amazônica.** Simpósio de Hematologia, Belém, PA. UFPA, 2011.

SIRVENT, N. et al. **Prognostic significance of the initial cerebrospinal fluid (CSF) involvement of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) treated without cranial irradiation: results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Children L.** Eur J Cancer, 2011. p. 239–47.

SMITH, M. A. et al. **Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century.** Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2010. p. 2625–2634.

STANULLA, M.; et al. **Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia.** JAMA : the journal of the American Medical Association, 2005. p. 1485–1489.

STEARNS, V.; RAE, J. M. **Pharmacogenetics and breast cancer endocrine therapy: CYP2D6 as a predictive factor for tamoxifen metabolism and drug response?** Expert reviews in molecular medicine, 2008. p. 34.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. **A new statistical method for haplotype reconstruction from population data.** American journal of human genetics, 2001. p. 978–989.

STILLER, C.A., BUNCH, K.J., LEWIS, I.J. **Ethnic group and survival from childhood cancer**: report from the UK Children's Cancer Study Group. *Br J Cancer*. 2000. p. 1339-43.

STOCCO, G.; CREWS, K. R.; EVANS, W. E. **Genetic polymorphism of inosine-triphosphate-pyrophosphatase influences mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment of acute lymphoblastic leukemia individualized for thiopurine-S-methyl-transferase status**. *Expert opinion on drug safety*, 2010. p. 23–37.

STOCCO, G. et al. **Pharmacogenomic approaches for tailored anti-leukemic therapy in children**. *Curr Med Chem* 2012. p. 2237–2253.

SUAREZ-KURTZ G. et al. **VKORC1 polymorphisms in Brazilians**: comparison with the Portuguese and Portuguese-speaking Africans and pharmacogenetic implications. *Pharmacogenomics*, 2010. p. 1257-1267.

SUAREZ-KURTZ, G. **Pharmacogenomics in admixed populations**. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2005.

SWANN, P. F. et al. **Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine**. *Science (New York, N.Y.)*, 1996. p. 1109–1111.

SZUMLANSKI, C. L.; WEINSHILBOUM, R. M. **Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase**: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *British journal of clinical pharmacology*, 1995. p. 456–459.

TAI, H. L. et al. **Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. p. 6444–6449.

TAMBURRO, R. **Pediatric cancer patients in clinical trials of sepsis: factors that predispose to sepsis and stratify outcome**. *Pediatr Crit Care Med*. 2005. p. 1234-40.

TAMM, R. et al. **Thiopurine S methyltransferase (TPMT) pharmacogenetics: three new mutations and haplotype analysis in the Estonian population**. *Clin Chem Lab Med*. 2008. p. 974-979.

TAY, B. S. et al. **Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides**. *Biochemical Pharmacology*, 1969. p. 136–138.

THUMAR, J.; GIESEN, E.; KLUGER, H. M. **Drug targets and predictive biomarkers in the management of metastatic melanoma.** Pharmacogenomics and Personalized Medicine, 2012. p. 139–148.

TIDD, D. M.; PATERSON, A. R. **A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine.** Cancer research, 1974. p. 738–46.

TREVIÑO, L. R. et al. **Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia.** Nature genetics, 2009. p. 1001–1005.

UJIE S. et al. **Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*3 - *24).** Pharmacogenet Genomics. 2008. p. 887–93.

ULRICH, C. M.; ROBIEN, K.; MCLEOD, H. L. **Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond.** Nature reviews. Cancer, 2003. p. 912–920.

URAYAMA, K. Y. et al. **HLA-DP genetic variation, proxies for early life immune modulation and childhood acute lymphoblastic leukemia risk.** Blood, 2012. p. 3039–3047.

VECCHIA, C. et al. **Trends in childhood cancer mortality as indicators of the quality of medical care in the developed world.** Cancer, 1998. p. 2223–2227.

VIJAYAKRISHNAN, J.; HOULSTON, R. S. **Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: A systematic review and meta-analysis.** Haematologica, 2010. p. 1405–1414.

WANG, L.; MCLEOD, H. L.; WEINSHILBOUM, R. M. **Genomics and drug response.** The New England journal of medicine, 2011. p. 1144–1153.

WANG, S. et al. **Genetic variation and population structure in Native Americans.** PLoS Genetics, 2007. p. 2049–2067.

WAYNE, A. S.; BAIRD, K.; EGELER, R. M. **Hematopoietic stem cell transplantation for leukemia.** Pediatric Clinics of North America, 2010.

WEINBERG, R. A. **A biologia do Câncer.** Porto Alegre: Artmed, 2008.

WEINSHILBOUM, R. **Thiopurine pharmacogenetics: Clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase.** Drug Metabolism and Disposition. Anais, 2001. p.601–605.

WEINSHILBOUM, R. M.; OTTERNESS, D. M.; SZUMLANSKI, C. L. **Methylation pharmacogenetics**: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 1999. p. 19–52.

WEINSHILBOUM, R. M.; SLADEK, S. L. **Mercaptopurine pharmacogenetics**: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *American journal of human genetics*, 1980. p. 651–662.

WEINSHILBOUM, R.; WANG, L. **Pharmacogenomics**: Bench to bedside. *Discovery medicine*, 2005. p. 30–36.

WIEMELS J. **Perspectives on the causes of childhood leukemia**. *Chemico-biological Interactions*, 2012. p. 59–67.

WILLARD, S. S.; KOOCHEKPOUR, S. **Regulators of gene expression as biomarkers for prostate cancer**. *American journal of cancer research*, 2012. p. 620–57.

WOFFORD, M. M. et al. **Treatment of occult or late overt testicular relapse in children with acute lymphoblastic leukemia**: A pediatric oncology group study. *Journal of Clinical Oncology*, 1992. p. 624–630.

WOODSON, L. C.; WEINSHILBOUM, R. M. **Human kidney thiopurine methyltransferase**. Purification and biochemical properties. *Biochemical pharmacology*, 1983. p. 819–826.

XU, H. et al. **Novel susceptibility variants at 10p12.31-12.2 for childhood acute lymphoblastic leukemia in ethnically diverse populations**. *Journal of the National Cancer Institute*, 2013. p. 733–742.

XU, H. et al. **ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia**. *J Clin Oncol*, 2012. p. 751-757.

YAMANAKA, R. et al. **CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. p.6462–6467.

YANG, L. et a. **Childhood cancer in Japan**: Focusing on trend in mortality from 1970 to 2006. *Annals of Oncology*, 2009. p. 166–174.

YANG, J.J. et al. **Ancestry and pharmacogenomics of relapse in acute lymphoblastic leukemia.** Nat Genet, 2011. p.237-241.

YASUI, W. et al. **Molecular pathobiology of gastric cancer.** Scandinavian Journal of Surgery, 2006. p.225-231.

YATES, C. R. et al. **Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency:** Genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. Annals of Internal Medicine, 1997. p. 608–614.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia:** Fundamentos e Prática. 1st ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

ZHOU, S. **Clinical pharmacogenomics of thiopurine S-methyltransferase.** Current clinical pharmacology, 2006. p. 119–128.

ZIMM, S. et al. **Inhibition of first-pass metabolism in cancer chemotherapy:** interaction of 6-mercaptopurine and allopurinol. Clinical pharmacology and therapeutics, 1983. p. 810–817.