



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**FARMACOGENÉTICA NA TERAPÊUTICA DAS LEUCEMIAS**

Trabalho submetido por  
**João Pedro Pereira**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Outubro de 2014**









**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**FARMACOGENÉTICA NA TERAPÊUTICA DAS LEUCEMIAS**

Trabalho submetido por  
**João Pedro Pereira**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Professora Doutora Ana Clara Ribeiro**

**Outubro de 2014**



## Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais e à minha irmã por toda a ajuda que me proporcionaram durante estes cinco anos, mantendo sempre a confiança nas minhas capacidades quando as coisas não correram tão bem, e também pelos reparos que fizeram sempre que achavam que eu não estava a seguir o melhor caminho.

Todos os professores que me acompanharam durante o percurso académico merecem, sem excepção, uma nota de profundo agradecimento pois foi devido aos seus ensinamentos que consegui atingir o patamar em que hoje me apresento. No entanto, não posso deixar de destacar a minha orientadora, a professora Ana Clara Ribeiro, pois sem ela não teria sido possível fazer uma boa dissertação. Um agradecimento especial por toda a ajuda e disponibilidade sempre revelados durante todo o ano. Os meus colegas de ano, e especialmente os elementos da turma 1 merecem também um lugar de destaque nos meus agradecimentos, pois foram eles que me acompanharam durante estes cinco anos, partilhando comigo bons e maus momentos, relevando em todas as situações um espírito de entreajuda e amizade pouco comuns em colegas de curso.

Um agradecimento à Liliana Coelho, que ao longo destes cinco anos me ajudou a conseguir toda e qualquer fonte de informação essenciais para estudar e para a realização de trabalhos, em especial durante o período em que fiz a dissertação, fornecendo-me muitos artigos científicos que contribuíram para o enriquecimento do trabalho.

Por fim, um agradecimento à Cláudia, pelos 7 anos de paciência e carinho.



## Resumo

A leucemia é uma doença neoplásica que afecta a normal produção, desenvolvimento e diferenciação das células sanguíneas, apresentando uma incidência relevante a nível mundial, especialmente no sexo masculino. Existem quatro tipos fundamentais de leucemia: a leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crónica, leucemia linfoblástica aguda e leucemia linfoblástica crónica. Todos estes tipos de leucemia diferem entre si na etiologia, epidemiologia e tratamento.

Em relação ao seu tratamento, existem fármacos considerados de primeira linha no tratamento de cada um dos tipos de leucemia, como por exemplo o imatinib na leucemia mielóide crónica ou o metotrexato na leucemia linfoblástica aguda. O imatinib é um inibidor selectivo do domínio BCR-ABL tirosina quinase, sendo muito eficaz no tratamento da leucemia mielóide crónica uma vez que o principal mecanismo etiológico desta doença consiste numa translocação (9;22), da qual resulta o rearranjo do gene BCR (cromossoma 22), e do gene ABL (cromossoma 9).

Outro exemplo, o metotrexato foi o primeiro fármaco a induzir remissão total em crianças diagnosticadas com leucemia linfoblástica aguda, e cujo mecanismo de acção consiste na sua intervenção no ciclo do ácido fólico.

Para além da importância dos fármacos mencionados no tratamento da leucemia, sabe-se que outro factor condicionante da resposta terapêutica é o próprio genótipo de cada indivíduo, uma vez que se verificam variações inter-individuais na resposta aos fármacos utilizados no tratamento de qualquer doença. O principal mecanismo de variação são os denominados SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Sabe-se que as enzimas de metabolização (como a CYP3A5, GST e a MTHFR) e as proteínas transportadoras (como a ABCB1 e a SLC22A1), entre outras, têm um papel fundamental na captação, biodisponibilidade e eficácia terapêutica de todos os fármacos, pelo que se pretende avaliar se os polimorfismos nos genes codificadores destas proteínas terão alguma influência na resposta terapêutica oferecida pelos fármacos utilizados na terapêutica da leucemia.

**Palavras-Chave:** Leucemia, farmacogenética, SNP, imatinib



## **Abstract**

Leukemia is a neoplastic disease that affects the normal production, development and differentiation of blood cells, presenting a considerable impact worldwide, especially in males. There are four main types of leukemia: acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphoblastic leukemia. All these types of leukemia differ in etiology, epidemiology and treatment.

Regarding its treatment, there are first-line drugs in the treatment of each type of leukemia, such as chronic myeloid leukemia imatinib or methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. Imatinib is a selective inhibitor of the BCR-ABL domain tyrosine kinase, being very effective in the treatment of chronic myeloid leukemia as the most important etiologic mechanism of this disease is a translocation between the BCR gene on chromosome 22 and chromosome 9 ABL gene.

Moreover, the mechanism of action of methotrexate is at intervention in the folic acid cycle and was the first drug to induce complete remission in children diagnosed with acute lymphoblastic leukemia.

Apart from the importance of the drugs mentioned in the treatment of leukemia, it is known that another constraint factor of therapeutic response is each individual genotype, in the sense that there is an inter-individual variation in the response to drugs in the treatment of any disease. The main mechanism of variation is called SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

It is known that metabolizing enzymes (CYP3A5, GST and MTHFR) and transporters (ABCB1 and SLC22A1), among others, have a fundamental role in the uptake, bioavailability and therapeutic efficacy of all drugs for which it is intended to evaluate whether polymorphisms in the genes encoding these enzymes have a strong influence on the response offered by the therapeutic agents used in the treatment of leukemia.

**Keywords:** Leukemia, pharmacogenetics, SNP, imatinib



## Índice Geral

<b>Índice Geral</b> .....	<b>9</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>12</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>12</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>13</b>
<b>1 – Introdução</b> .....	<b>17</b>
<b>2 – Leucemia</b> .....	<b>21</b>
2.1 – O que é a leucemia.....	21
2.2 – Tipos de leucemia .....	22
2.2.1 – Leucemia Mielóide Aguda (AML).....	22
2.2.2 – Leucemia Mielóide Crónica (CML).....	22
2.2.3 – Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL).....	23
2.2.4 – Leucemia Linfoblástica Crónica (CLL) .....	24
2.3 – Incidência e Epidemiologia .....	25
2.3.1 - Leucemia Mielóide Aguda.....	25
2.3.2 - Leucemia Mielóide Crónica.....	25
2.3.3 - Leucemia Linfoblástica Aguda .....	25
2.3.4 - Leucemia Linfoblástica Crónica .....	26
2.3.5 – Dados epidemiológicos da leucemia em Portugal.....	27
2.4 – Diagnóstico .....	28
2.4.1 – Leucemia Mielóide Aguda .....	28
2.4.2 – Leucemia Mielóide Crónica .....	29
2.4.3 – Leucemia Linfoblástica Aguda .....	29
2.4.4 – Leucemia Linfoblástica Crónica .....	30
2.5 – Tratamento com recurso a quimioterapia .....	30
2.5.1 – Leucemia Mielóide Aguda .....	30
2.5.2 – Leucemia Mielóide Crónica .....	31
2.5.3 – Leucemia Linfoblástica Aguda .....	32

2.5.4 – Leucemia Linfoblástica Crónica .....	33
<b>3- Farmacogenética e Polimorfismos .....</b>	<b>35</b>
3.1 – Nota Introdutória.....	35
3.2 – Enzimas de metabolização .....	37
3.2.1 – Enzimas de Fase I.....	38
3.2.2 – Enzimas de fase II .....	40
3.3 – Proteínas transportadoras .....	41
3.4 – O papel da farmacogenética no tratamento de doenças: o exemplo da TPMT..	43
<b>4 – Imatinib e a Leucemia Mielóide Crónica .....</b>	<b>45</b>
4.1 – Mecanismo de Acção .....	45
4.2 – Farmacocinética .....	45
4.3 – Outras aplicações clínicas .....	46
4.4 – Farmacogenética do Imatinib no tratamento da Leucemia Mielóide Crónica ...	47
4.4.1 – Polimorfismo no gene ABCB1.....	47
4.4.2 – Polimorfismo no gene ABCG2 .....	48
4.4.3 – Polimorfismo no gene SLC22A1 .....	48
4.4.4 – Polimorfismo no gene CYP3A5.....	49
<b>5 – Metotrexato e a Leucemia Linfoblástica Aguda.....</b>	<b>51</b>
5.1 – Mecanismo de acção .....	51
5.2 – Farmacocinética .....	53
5.3 – Outras aplicações clínicas .....	53
5.4 – Farmacogenética do Metotrexato no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda.....	53
5.4.1 – Polimorfismos nos intervenientes no ciclo dos folatos .....	54
5.4.2 – Polimorfismos nas proteínas de transporte.....	57
<b>6– Leucemia Mielóide Aguda: biomarcadores e polimorfismos .....</b>	<b>59</b>
<b>7 – Leucemia Linfoblástica Crónica: biomarcadores e polimorfismos .....</b>	<b>63</b>
<b>8 – Perspectivas futuras .....</b>	<b>67</b>
<b>9 – Conclusão .....</b>	<b>73</b>

**Anexos**

**Anexo I** – Critérios de resposta em pacientes com Leucemia Mielóide Crónica, de acordo com o ELN (2009) e o NCCN (2012).

**Anexo II** – Recomendações para a monitorização e avaliação temporal dos pacientes com Leucemia Mielóide Crónica, de acordo com o ELN e o NCCN.

**Anexo III** – Definições de resposta do tratamento de primeira linha com o Imatinib na Leucemia Mielóide Crónica de fase crónica, de acordo com o ELN.

**Anexo IV** – Sítios da Internet com relevância em farmacogenética.

**Anexo V** - Resumo dos estudos de eficácia do tratamento com Imatinib e a sua relação com os variantes farmacocinéticos.

**Anexo VI** – Genótipo das enzimas DCK e CDA e a sua relação com a resposta ao tratamento nos pacientes com AML.

## **Índice de Figuras**

<b>Figura 1</b> - Número de novos casos de leucemia linfóide nos hospitais de Portugal Continental, entre 2007-2011. ....	27
<b>Figura 2</b> - Número de novos casos de leucemia mielóide nos hospitais de Portugal Continental, entre 2007-2011. ....	28
<b>Figura 3</b> - Processo de metabolização mediado pelas enzimas de fase I e fase II.....	38
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da acção do Metotrexato.....	52
<b>Figura 5</b> - Novos agentes terapêuticos e os seus alvos nas células da leucemia linfoblástica crónica.....	69

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1</b> - Método de diagnóstico da Leucemia Mielóide Crónica.....	29
<b>Tabela 2</b> - Alguns tipos de polimorfismos identificados no metotrexato, de acordo com a base de dados do PharmgKB.....	54
<b>Tabela 3</b> - Principais SNP identificados nas enzimas DCK e CDA.....	62
<b>Tabela 4</b> - Alguns dos principais genes na CLL.....	63

## **Lista de Abreviaturas**

**ABCB1** – *ATP-binding cassette*, sub-família B membro 1

**ABCC2** – *ATP-binding cassette*, sub-família C membro 2

**ABCG2** – *ATP-binding cassette*, sub-família G membro 2

**ALL** – Leucemia linfoblástica aguda

**AML** – Leucemia mielóide aguda

**BCR-ABL** – *Breakpoint Cluster Region – Abelson (gene BCR-ABL)*

**BCRP** – *Breast Cancer Resistance Protein*

**BTK** – *Bruton's Tyrosine Kinase*

**CCyR** – Resposta citogenética completa

**CD38** – Cluster de diferenciação 38

**CDA** – Deaminase de citidina

**CLL** – Leucemia linfoblástica crónica

**CML** – Leucemia mielóide crónica

**CMR** – Resposta molecular completa

**CyR** – Resposta citogenética

**DCK** – Deoxicitidina quinase

**DHFR** – Dihidrofolato redutase

**ELN** – *European LeukemiaNet*

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**FISH** – Hibridação fluorescente *in situ*

**GST** – Glutathione-S-Transferase

**hENT1** - *Human equilibrative nucleoside transporter 1*

**hOCT1** – *Human Organic Cation Transporter 1*

**IGHV** – *Immunoglobulin heavy-chain gene*

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-17** – Interleucina 17

**MAF** – Alelo de menor frequência

**MALDI-TOF MS** – *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

**MCyR** – Resposta citogenética major

**MDR** – *Multidrug Resistance gene*

**miRNA** – micro RNA

**MMR** – Resposta molecular major

**MR** – Resposta molecular

**MS** – Metionina sintetase

**MTHFD** – Metilenotetrahidrofolato desidrogenase

**MTHFR** – Metilenotetrahidrofolato redutase

**MTRR** – Metionina sintetase redutase

**MTX** – Metotrexato

**NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*

**NCCN** – *National Comprehensive Cancer Network*

**NOTCH1** – Gene humano que codifica para receptores transmembranares

**NT5C2** – 5'- Nucleotidase II

**PCR** – Reacção de polimerização em cadeia

**PEST** – Péptido rico em prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T)

**RFC** – *Reduced Folate Carrier*

**RH** – Resposta Hematológica

**RT-PCR** – PCR de transcriptase reversa

**SF3B1** – *Splicing Factor 3B*, sub-unidade 1

**SLC19A1** – *Solute Carrier* família 19 membro 1

**SLC22A1** – *Solute Carrier* família 22 membro 1

**SNP** – *Single Nucleotide Polymorphism*

**SLCO1B1** – *Solute carrier organic anion transporter* família 1 membro 1

**SRC** – *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*

**TKI** – Inibidores da tirosina quinase

**TNF- $\alpha$**  – Factor de Necrose Tumoral Alfa

**TPMT** – Tiopurina S-metiltransferase

**VEGF** – Factor de crescimento vascular e endotelial

**VEGFR2** - Factor de crescimento vascular e endotelial receptor 2

**ZAP-70** - *Zeta-chain-associated protein kinase 70*



## **1 – Introdução**

Estima-se que em cada ano ocorram cerca de 57.000 mil novos casos de leucemia, a nível mundial. Não existe unanimidade acerca da etiologia exacta de cada tipo de leucemia, mas sabe-se que o desenvolvimento desta pode estar intimamente relacionado com agentes externos, como radiação ionizante, benzenos ou como consequência de tratamentos longos e exaustivos de quimioterapia. Outros factores, como por exemplo o ciclo do ácido fólico nas células malignas, está relacionado com o desenvolvimento de alguns tipos de leucemia (Qin et al., 2014).

Todos os tipos de cancro, nos quais se inclui a leucemia, apresentam bases genéticas muito fortes, quer na sua predisposição quer no desenvolvimento e progressão da doença. O conhecimento do cancro a nível molecular tem sido desbloqueado ao longo dos últimos anos com o projecto de sequenciação do genoma humano bem como pelo desenvolvimento de áreas de estudo fundamentais, como a farmacogenética e a farmacogenómica. Com o grande avanço nestas áreas foi possível desenvolver fármacos direccionados para o alvo terapêutico, contribuindo para um tratamento mais personalizado e preciso (Gonzalez de Castro, Clarke, Al-Lazikani, e Workman, 2013).

Durante a última década os avanços nestas duas áreas foram de extrema importância na compreensão de alguns fenómenos relacionados com as diferenças entre indivíduos na resposta aos fármacos, maioritariamente na área da quimioterapia (Weng, Zhang, Peng e Huang, 2013).

A toxicidade e eficácia dos fármacos utilizados no tratamento do cancro, nos quais se inserem naturalmente os compostos utilizados em quimioterapia no tratamento da leucemia, podem ser afectadas pela existência de polimorfismos presentes em genes que codificam para as proteínas transportadoras, receptores, alvos terapêuticos, e ainda para as enzimas responsáveis pela metabolização desses fármacos (Kishi et al., 2007).

Os SNP (single nucleotide polymorphism) são mutações pontuais que podem ocorrer no DNA de indivíduos pertencentes a uma determinada população. Os estudos farmacogenéticos comprovam que estas pequenas alterações são o suficiente para originar modificações no genoma, alterações que serão traduzidas em discrepâncias e diferenças na resposta terapêutica a um determinado tratamento, oscilações no grau de toxicidade dos fármacos e ainda alterações na taxa de sobrevivência dos doentes (Pei-pei et al., 2012).

No âmbito desta dissertação, e tendo em conta o elevado número de fármacos susceptíveis de integrarem os protocolos de tratamento dos quatro tipos de leucemia mencionados ao longo do trabalho, verificou-se a impossibilidade de mencionar todos eles. Deste modo, optei por focar dois fármacos, igualmente considerados de primeira linha no tratamento da leucemia mielóide crónica e da leucemia linfoblástica aguda. São eles respectivamente, o imatinib e o metotrexato. A escolha recaiu sobre estes dois fármacos uma vez que, e de acordo com a literatura consultada, apresentavam maior interesse para o trabalho, dado o elevado número de polimorfismos existentes ao nível da sua metabolização e transporte. Tal como será possível observar ao longo da dissertação, estes polimorfismos são de extrema importância para a compreensão do grau de eficácia e toxicidade apresentada por estes fármacos.

Em relação aos outros dois tipos de leucemia que não foram mencionados, a leucemia mielóide aguda e a leucemia linfoblástica crónica, estes serão obviamente alvo de estudo. No entanto, a análise destes dois tipos de leucemia não terá como foco apenas um fármaco, mas será sim um sumário das características farmacogenéticas por eles apresentadas e será feito um levantamento dos principais biomarcadores existentes para estas doenças, o que vai contribuir igualmente para a compreensão dos melhores mecanismos para o seu tratamento.

O imatinib é um inibidor específico do domínio BCR-ABL com elevada taxa de eficácia no tratamento de doentes com leucemia mielóide crónica (Nambu et al., 2011). Este fármaco apresenta excelentes níveis de resposta a nível hematológico e citogenético, chegando mesmo a ser fundamental para se obter uma resposta molecular completa, caracterizada pela redução de pelo menos 4 log, que corresponde à não detecção da transcrição do domínio BCR-ABL através da técnica de RT-PCR. Esta resposta molecular completa é o primeiro passo para a cura e para a descontinuação do tratamento com o imatinib (Angelini et al., 2012).

Vários polimorfismos têm sido associados à acção do imatinib. De facto, para explicar esta variabilidade entre indivíduos, têm sido feitos vários estudos com o objectivo de descobrir quais os determinantes genéticos com influência na resposta farmacológica do fármaco. Associados à eficácia do fármaco, foram detectados vários polimorfismos em genes que codificam para proteínas transportadoras (ABCB1, ABCG2, SLC22A1), enzimas de metabolização (CYP3A5), entre outros (Gervasini e Vagace, 2012).

Por outro lado, o metotrexato é um inibidor do ciclo dos folatos que tem sido ao

longo dos anos alvo de diversos estudos farmacogenéticos com vista a identificar possíveis determinantes genéticos associados à toxicidade deste fármaco. A determinação de polimorfismos associados a este fármaco é importante para promover a segurança no tratamento, a eficácia e para contribuir para a instituição de terapêuticas individualizadas. Tal como no imatinib, foram descobertos diversos polimorfismos quer em genes codificadores de enzimas envolvidas no metabolismo do fármaco, quer em genes codificadores para as suas proteínas transportadoras. Destes, destacam-se os genes MTHFR, DHFR, ABCG2, SLC19A1, RFC1, SLCO1B1 e ABCC2 (Gervasini e Vagace, 2012; Ramsey et al., 2012; Liu et al., 2014).

A metodologia usada na pesquisa de informação para a realização da dissertação consistiu na utilização de bancos de dados bibliográficos, ente os quais o PubMed e o B-on. A pesquisa foi realizada em 100 artigos datados entre 2001 e 2014.



## **2 – Leucemia**

### **2.1 – O que é a leucemia**

A leucemia é uma neoplasia que afecta o normal desenvolvimento e diferenciação das células sanguíneas, nomeadamente através da acumulação dos blastos na medula óssea. Os blastos são por definição as células sanguíneas (leucócitos) que se encontram num estado imaturo da sua formação e desenvolvimento, o que se traduz por um crescimento anormal e uma acumulação descontrolada destes precursores na medula óssea. Para além destes factos, a acumulação destas células imaturas na medula óssea impede a formação das células sanguíneas normais, tais como os glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e as plaquetas (Chiabai, Lins, Pogue, e Pereira, 2012).

Para além da medula óssea e das células sanguíneas, a leucemia pode ainda afectar diversas zonas do tecido linfático, tais como os nódulos linfáticos. De um ponto de vista genético a leucemia pode ser definida como resultado de um conjunto de mutações genéticas ao nível do DNA das denominadas *stem-cell* ou células precursoras, originando alterações nos glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas que podem ser traduzidos para quadros de anemia, sangramento, aumento da susceptibilidade imunológica, e consequentemente morte (Leukemia & Lymphoma Society, 2014).

Existem quatro tipos principais de leucemia: a leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielóide aguda (AML), leucemia linfoblástica crónica (CLL), e a leucemia mielóide crónica (CML). Sabe-se que a medula óssea é responsável quer pela formação de linfócitos quer pela formação de células mielóides (glóbulos vermelhos e plaquetas), razão pela qual foram criadas as definições dos vários tipos de leucemia, de acordo com o tipo de células afectadas (Leukemia & Lymphoma Society, 2012).

## 2.2 – Tipos de leucemia

### 2.2.1 – Leucemia Mielóide Aguda (AML)

O desenvolvimento deste tipo de leucemia está relacionado com uma sucessão de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem nas células hematopoiéticas, e que são responsáveis pela alteração dos processos celulares convencionais ao nível do crescimento, proliferação e diferenciação celular (Mrózek, Marcucci, Paschka, Whitman, e Bloomfield, 2007). É nos adultos que esta doença apresenta maior incidência, por volta dos 65 anos, podendo ainda ser encontrada em crianças mas numa taxa muito mais reduzida. Esta patologia pode surgir na forma “*de novo*”, ou sob a forma de leucemia mielóide aguda secundária, em doentes com historial clínico de síndromes mielodisplásicas ou com neoplasia mieloproliferativa. A sua exacta etiologia ainda não é totalmente conhecida, mas crê-se que a susceptibilidade genética e as agressões externas podem ser um factor chave para o desenvolvimento da doença. Por outro lado, sabe-se que as enzimas metabolizadoras como por exemplo as GST e a família das CYP são outro factor de risco para a doença, pois a acção destas enzimas liberta no organismo metabolitos potencialmente nocivos (Daraki et al., 2014).

Os tipos de AML com melhor prognóstico de tratamento são a leucemia pró-mielocítica aguda com t(15;17) (q22;q12), e a AML com t(8;21) (q22;q22), ou com inv(16) (p13.1q22) (Fey e Buske, 2013).

Alguns dos principais sintomas da doença são a neutropenia, anemia e a trombocitopenia (Tallman, Gilliland, e Rowe, 2005).

### 2.2.2 – Leucemia Mielóide Crónica (CML)

A leucemia mielóide crónica (CML) pode ser definida como uma desordem ao nível das células hematopoiéticas precursoras (*stem-cell*), e que se caracteriza por uma translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22. Esta mutação tem como resultado a formação do cromossoma Ph (Philadelphia Chromosome) (Singh, Chan, Lin, Heng, e Chowbay, 2012). A translocação ocorre entre o gene BCR do cromossoma 22 e o

oncogene ABL do cromossoma 9. Desta fusão resulta o gene BCR-ABL, que é responsável pela produção activa de tirosina quinase que por sua vez será responsável pela proliferação descontrolada e desregulada de células da linhagem mielóide (Rizzieri e Moore, 2012).

Mais especificamente, sabe-se que o gene BCR-ABL codifica para uma oncoproteína P210, localizada no citoplasma, e é esta oncoproteína que apresenta intensa actividade como tirosina quinase, sendo consequentemente responsável pela alteração das *stem-cell* sanguíneas. Os sintomas da doença não são muito específicos, destacando-se a perda de peso, astenia e a febre (Baccarani et al., 2012).

### **2.2.3 – Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL)**

Este tipo de leucemia, que afecta essencialmente crianças, é, de um ponto de vista etiológico, resultado de alterações genéticas que podem ocorrer num linfoblasto, e que são posteriormente transmitidas à linhagem celular seguinte. A acumulação no compartimento medular destas células com capacidade proliferativa acrescida origina situações de pancitopenia, em que os elementos sanguíneos se encontram reduzidos, e, se não for tratada com urgência, pode mesmo levar à morte. As alterações genéticas mencionadas não têm ainda uma razão de fundo, mas pensa-se que podem ser despoletadas por factores externos como a radiação, alimentos, tabaco, agente químicos ou até infecções (Gregers, 2012).

A leucemia linfoblástica aguda corresponde a cerca de 25% de todos os cancros diagnosticados em crianças, e engloba cerca de 75% de todos os casos de leucemia. No entanto, é também o que apresenta maior taxa de remissão, fixada nos 80%. Por outro lado sabe-se que a resposta ao tratamento e o aparecimento de efeitos secundários estão dependentes de factores como a idade, sexo e outras condições genéticas (Chiabai et al., 2012).

O metabolismo do ácido fólico apresenta também um papel de relevo no desenvolvimento da doença, na medida em que os metabolitos do ácido fólico podem provocar desordens ao nível da expressão genética e da estabilidade do DNA. Do mesmo modo, o metabolismo do folato tem um importante papel em diversas funções celulares, como a metilação do DNA, síntese e reparação do DNA, podendo desta forma dar origem a translocações, deleções e inversões nas stem cells hematopoiéticas, que

posteriormente evoluem para leucemia (Qin et al., 2014).

A idade preferencial para este tipo de leucemia situa-se entre os três e os cinco anos de vida. O que torna esta patologia mais difícil de tratar prende-se com a disseminação das células cancerígenas na corrente sanguínea, acumulando-se em órgãos como o fígado, baço, rins, cérebro e órgãos reprodutores, dificultando assim o tratamento. Os principais sintomas desta doença estão intimamente relacionados com a falta de elementos sanguíneos, destacando-se a anemia, falta de força, falta de ar, hemorragias, febre e maior susceptibilidade a infecções (Manual Merck para a Família, 2009).

#### **2.2.4 – Leucemia Linfoblástica Crónica (CLL)**

A leucemia linfoblástica crónica é caracterizada pela acumulação de linfócitos-B CD5+ com predisposição para evitarem o processo de apoptose (Willander et al., 2013). Ainda pouco se sabe acerca dos mecanismos etiológicos da doença, mas sabe-se que a história familiar de doença é um importante factor de risco para as gerações seguintes. A leucemia linfoblástica crónica é uma doença autossómica dominante, e, nos EUA, 12% das pessoas diagnosticadas revelaram ter familiares com historial de anomalias linfoproliferativas, e cerca de 6-9% apresentam casos na família de CLL. Deste modo, conclui-se facilmente que familiares de primeiro grau apresentam maior probabilidade de transmissão da doença (Brown, 2013).

Outros estudos evidenciam também a importância da angiogénese no desenvolvimento da leucemia linfoblástica crónica. Sabe-se que a desregulação deste processo contribuiu para o desenvolvimento do cancro, pois o desenvolvimento de qualquer massa tumoral necessita da produção de novos vasos para o seu enriquecimento e desenvolvimento, o que pode também afectar o normal desenvolvimento das células hematopoiéticas. O factor VEGF é essencial no processo de angiogénese, e sabe-se que apresenta um papel importante na manutenção das células B leucémicas, através de mecanismos de inibição da apoptose (Wróbel et al., 2013).

Através de métodos de imunofluorescência (FISH), foram detectadas várias anomalias na grande maioria das células tumorais dos pacientes com CLL, destacando-se as deleções dos cromossomas 11q, 13q e 17p e ainda casos de trissomia no cromossoma 12 (Willander et al., 2013).

## **2.3 – Incidência e Epidemiologia**

### **2.3.1 - Leucemia Mielóide Aguda**

Na Europa, a incidência anual da AML atinge os 5-8 casos por cada 100.000 indivíduos, com um ligeiro aumento na população acima dos 70 anos, onde a incidência cresce consideravelmente para os 15-25 casos em cada 100.000 pessoas. Relativamente à taxa de mortalidade, verificam-se em média 4 a 6 mortes por cada 100.000 indivíduos (Fey e Buske, 2013).

### **2.3.2 - Leucemia Mielóide Crónica**

Este tipo de leucemia apresenta uma incidência entre os 10 e os 15 casos por ano, em cada 10<sup>6</sup> indivíduos, não se verificando diferenças significativas em termos de raça, ou na área geográfica onde se verifica a doença. Na Europa o diagnóstico mais frequente é feito entre os 60 e os 65 anos de idade, apesar de ser mais baixo em países com uma população menos envelhecida. Tem-se verificado que a prevalência da leucemia mielóide crónica tem aumentado, também em função do aumento da taxa de remissão e sobrevivência, que é resultado de mais e melhores tratamentos (Baccarani et al., 2012).

### **2.3.3 - Leucemia Linfoblástica Aguda**

O cancro infantil é uma doença que afecta 1 em cada 70.000 crianças com menos de 14 anos. A leucemia linfoblástica aguda é um dos principais tipos de cancro diagnosticados em crianças, representando cerca de 40% de todos os cancros infantis (Fukushima et al., 2013).

Comparativamente à leucemia linfoblástica aguda, a leucemia mielóide aguda é menos comum, representando apenas 18% dos casos de leucemia identificados em crianças. A incidência da AML nos EUA, entre os anos 2005-2009, era de 7,7 casos em cada 1 milhão de crianças de idades compreendidas entre os 0 e os 14 anos. Por outro

lado, a taxa de sobrevivência em crianças com menos de 15 anos diagnosticadas com AML encontrava-se nos 64,3% nos EUA, entre os anos de 2002 e 2008 (Puumala, Ross, Aplenc, e Spector, 2013).

#### **2.3.4 - Leucemia Linfoblástica Crónica**

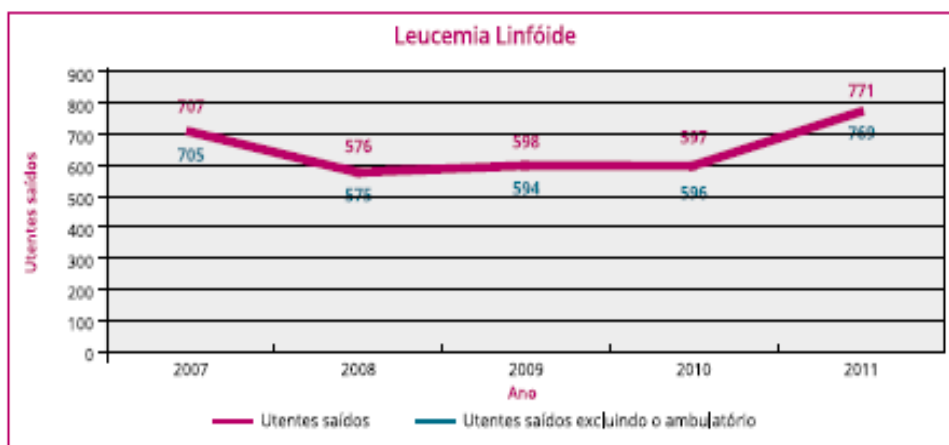
Nos países ocidentais, a leucemia linfoblástica crónica é o tipo de leucemia com maior taxa de incidência (4.2 casos por ano, em cada 100.000 indivíduos). Contudo, esta aumenta para mais de 30, caso nos estejamos a referir a indivíduos com mais de 80 anos. Em média, o diagnóstico é feito aos 72 anos, sendo que apenas 10% dos doentes apresentam uma idade inferior a 55 anos (Eichhorst, Dreyling, Robak, Montserrat, e Hallek, 2011). Este tipo de leucemia é o mais comum em países como os EUA, com cerca de 16.000 novos casos durante o ano de 2013 (Brown, 2013).

Os países com maior incidência de leucemia linfoblástica crónica são a Austrália, EUA, Irlanda e Itália. Por exemplo, nos EUA a incidência desta doença é estimada em 3,7 novos casos por ano, em cada 100.000 habitantes, correspondendo este tipo específico de leucemia a cerca de 30% de todas as leucemias diagnosticadas neste país. Outro dos países em que este tipo de leucemia representa uma fatia importante é a Dinamarca, com uma prevalência de 40%. Por outro lado, sabe-se que os países asiáticos, como por exemplo o Japão e a China, apresentam uma incidência significativamente mais baixa (3-5%) quando em comparação com países ocidentais. Este dado revela que a etiologia da doença não deve ser dissociada de factores raciais e demográficos. Para comprovar este facto, dados mostram que indivíduos japoneses e chineses residentes nos EUA apresentam também baixos índices de CLL (Yamamoto e Figueiredo, 2005).

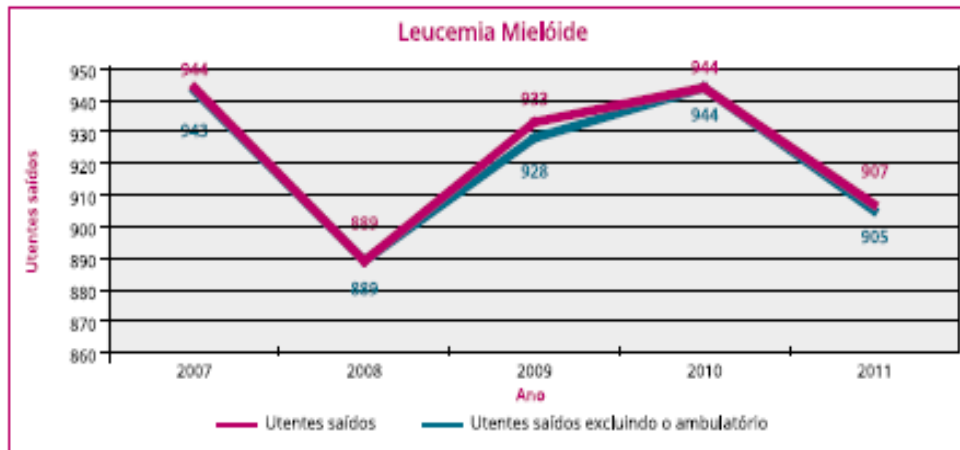
Relativamente à diferença de prevalência da leucemia de acordo com o sexo, sabe-se que na sua generalidade é uma doença que afecta mais os homens que as mulheres, sendo a nona e a décima causa de morte por cancro em homens e mulheres, respectivamente (Rajabli et al., 2013).

### 2.3.5 – Dados epidemiológicos da leucemia em Portugal

A partir da análise das Figuras 1 e 2 abaixo apresentadas, podemos aferir que os tipos de leucemia linfoblástica e mielóide têm seguido um curso distinto ao longo dos últimos anos. Atentando na figura 1, verifica-se um aumento no número de casos em 2007, após o qual se registou um decréscimo, voltando a aumentar em 2011. Por outro lado, a Figura 2 indica que de 2007 para 2008 se registou um decréscimo do número de casos. De 2008 a 2010 registou-se novamente um aumento, e em 2011 a tendência voltou a ser de decréscimo (Miranda et al., 2013).



**Figura 1 - Número de novos casos de leucemia linfóide nos hospitais de Portugal Continental, entre 2007-2011** (Miranda et al., 2013).



**Figura 2 - Número de novos casos de leucemia mielóide nos hospitais de Portugal Continental, entre 2007-2011** (Miranda et al., 2013).

## 2.4 – Diagnóstico

### 2.4.1 – Leucemia Mielóide Aguda

De modo a ser obtido um diagnóstico de AML o mais fiável e concreto possível, existe toda uma bateria de testes que podem ser feitos, tais como análise do sangue periférico e das células presentes na medula óssea. Esta análise deve ser feita sob um ponto de vista morfológico, citoquímico, citogenético e de genética molecular. Técnicas como o PCR e FISH são deste modo imprescindíveis para uma eficaz detecção da doença.

Sob um ponto de vista quantitativo, a % de blastos presentes na medula óssea é também um factor importante de diagnóstico, considerando-se que estamos perante um quadro de AML quando se encontram pelo menos 20% no sangue periférico ou na medula óssea (Fey e Buske, 2013).

### 2.4.2 – Leucemia Mielóide Crônica

Muitas vezes os sintomas não são claros ou são pouco frequentes, pelo que em 40% dos casos o diagnóstico acaba por ser fortuito, resultado de análises de rotina ao sangue. Em mais de metade dos casos, o sinal físico mais evidente é a esplenomegalia. A nível sanguíneo, as principais evidências da doença são a leucocitose com basofilia, e com a presença de granulócitos imaturos. A trombocitose é também frequente (Baccarani et al., 2012).

Para se confirmar a presença do cromossoma Filadélfia (Ph), bem com a mutação BCR-ABL, têm de ser aplicadas técnicas de análise do cariótipo, FISH, e de análise PCR por transcriptase reversa (Tabela1) (Rizzieri e Moore, 2012).

**Tabela 1 - Método de diagnóstico da Leucemia Mielóide Crônica** (adaptado de Rizzieri e Moore, 2012).

<b>Método</b>	<b>Alvo</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Citogenética	Ph <sup>+</sup> (metafase)	1-5%	Amplamente disponível	Baixa sensibilidade; apenas análise da medula óssea
FISH	Fusão do gene BCR-ABL	0.1-5%	Rápido (1 a 2 dias)	Não detecta outras alterações; não permite analisar a resposta dos TKI
qRT-PCR	Sequência de RNA	0.001-0.01%	Muito sensível	Técnica exaustiva

### 2.4.3 – Leucemia Linfoblástica Aguda

O diagnóstico compreende uma quantidade acima dos 20% de linfoblastos, presentes em amostras de medula óssea. A avaliação do prognóstico da doença bem como o desenho da metodologia de tratamento implica a análise dos linfoblastos na

medula óssea ou no sangue periférico, recorrendo-se a várias técnicas como a cariotipagem das bandas G dos cromossomas em metafase, FISH para detectar outras anomalias genéticas, e ainda RT-PCR para testar as mutações em BCR-ABL (“NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Acute Lymphoblastic Leukemia,” 2014).

#### **2.4.4 – Leucemia Linfoblástica Crónica**

O diagnóstico da leucemia linfoblástica crónica contempla os seguintes critérios: presença de mais de 5000 linfócitos monoclonais tipo B/ $\mu$ l no sangue periférico, por um período nunca inferior a três meses. Por outro lado, as células leucémicas encontradas no esfregaço de sangue são normalmente pequenas, linfócitos maduros com uma borda estreita de citoplasma, e com um núcleo pouco denso e pouco visível. A expressão de antígenos CD20 e CD79b encontra-se baixa em comparação com as células B normais. A técnica de FISH é muito importante para a detecção de alterações cromossomais, como por exemplo del (17p) e del (11q). A biópsia de medula óssea não é essencial para o diagnóstico mas é importante que seja feita para se estudar qual a melhor sequência de tratamento (Eichhorst et al., 2011).

### **2.5 – Tratamento com recurso a quimioterapia**

#### **2.5.1 – Leucemia Mielóide Aguda**

O tratamento de primeira linha da leucemia mielóide aguda consiste na associação do fármaco citarabina com uma antraciclina (normalmente a daunorrubicina ou a idarrubicina). O fármaco mitoxantrona pode também ser utilizado. A taxa de remissão da doença em resultado da utilização deste esquema de quimioterapia fixa-se entre os 50 e os 75% (Tallman et al., 2005).

De acordo com as guidelines do NCCN (National Comprehensive Cancer Network) transcreve-se o tratamento preferencial para a AML, que consiste no seguinte:

- Doentes com idade inferior a 60 anos: infusão contínua de citarabina numa dose de 100-200 mg/m<sup>2</sup> durante 7 dias, em associação com idarrubicina 12 mg/m<sup>2</sup> durante 3 dias (ou daunorrubicina 90 mg/m<sup>2</sup> também durante 3 dias);
- Doentes com idade superior ou igual a 60 anos: infusão contínua de citarabina numa dose de 100-200 mg/m<sup>2</sup> durante 7 dias, em associação com idarrubicina (de preferência) 12 mg/m<sup>2</sup> durante 3 dias. A idarrubicina pode ser substituída por daunorrubicina 45-90 mg/m<sup>2</sup>, ou por mitoxantrona 12mg/m<sup>2</sup> (“NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Acute Myeloid Leukemia,” 2014).

### 2.5.2 – Leucemia Mielóide Crónica

O tratamento da leucemia mielóide crónica tem sido aperfeiçoado ao longo dos tempos. Nos anos 90 o tratamento de primeira linha consistia na administração do interferão alfa. No entanto, e após a introdução dos inibidores da tirosina quinase (TKI), estes passaram a ser os fármacos de eleição do tratamento desta doença, e os recentes avanços na terapêutica tiveram como objectivo aumentar o potencial e a eficácia deste grupo terapêutico (Baccarani et al., 2012).

Dentro do grupo terapêutico dos inibidores da tirosina quinase, o imatinib (Gleevec<sup>®</sup>, Novartis, 2001), foi o primeiro fármaco a ser utilizado no tratamento da CML, com resultados muito satisfatórios. Sendo o imatinib um inibidor competitivo da proteína BCR-ABL tirosina quinase, actua directamente numa das possíveis origens etiológicas da doença. A eficácia do imatinib é indicada pelo parâmetro MMR, que é definido pela redução do BCR-ABL em 3 log após um tratamento de 12 meses (Dulucq et al., 2008).

Para os pacientes com resistência ou intolerância ao imatinib, foram desenvolvidos outros dois fármacos inibidores da tirosina quinase, o dasatinib (Sprycel<sup>®</sup>), e o nilotinib (Tasigna<sup>®</sup>). Comparativamente ao imatinib, estes dois fármacos apresentam características que os tornam mais eficazes e sensíveis: o nilotinib tem uma capacidade de ligação ao domínio BCR-ABL trinta vezes superior, ao passo que o dasatinib tem a capacidade de se ligar não só ao gene BCR-ABL, mas também ao gene SRC que também está envolvido no desenvolvimento de cancro. As vantagens destes dois fármacos permitem-lhes ser, juntamente com o imatinib, fármacos de primeira linha

no tratamento da leucemia mielóide crónica (Rizzieri e Moore, 2012).

De acordo com as guidelines do NCCN, o tratamento da CML inclui uma dose diária de 400 mg de imatinib, ou em alternativa 300 mg de nilotinib duas vezes ao dia, ou ainda uma dose diária de 100 mg de dasatinib (“NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Chronic Myelogenous Leukemia,” 2014).

Nos Anexos 1,2 e 3 podem ser encontradas as especificações a partir das quais se define o panorama de tratamento e a evolução da leucemia mielóide crónica ao longo dos meses ou anos de tratamento.

### **2.5.3 – Leucemia Linfoblástica Aguda**

O regime de tratamento para a leucemia linfoblástica aguda consiste em esquemas de quimioterapia cujo ponto forte é a associação de vários fármacos como por exemplo a vincristina, glucocorticóides, metotrexato, tiopurinas, asparaginase com ou sem antraciclina, inibidores da Topoisomerase II e ainda citarabina e ciclofosfamida. O período de tratamento com estes fármacos tem de duração de dois ou três anos (Rocha et al., 2005).

No entanto, e apesar de todos os fármacos já mencionados, o metotrexato (MTX) é um dos principais fármacos de primeira linha no tratamento da leucemia linfoblástica aguda, especialmente a que ocorre em crianças. Este fármaco actua ao nível do ciclo do ácido fólico, através da inibição da enzima dihidrofolato redutase que é importante no processo de síntese de DNA (Fukushima et al., 2013).

Apesar do metotrexato apresentar características que lhe permitem ser um bom fármaco a usar em quimioterapia e em especial no tratamento da ALL, é na associação de vários fármacos que se encontra o segredo para a percentagem bastante considerável de remissão da doença que é conseguida através destes tratamentos. A importância da utilização de outros fármacos que actuem noutras etapas do ciclo celular das células cancerígenas é enorme, de modo a aumentar a probabilidade de êxito do tratamento. Os agentes alquilantes (ciclofosfamida), os antimetabolitos como a citarabina, e os inibidores da topoisomerase II como o etoposido são alguns exemplos já mencionados de fármacos que podem ser utilizados concomitantemente com o metotrexato (Gervasini e Vagace, 2012).

#### 2.5.4 – Leucemia Linfoblástica Crónica

A resistência à quimioterapia representa um importante desafio no tratamento da leucemia linfoblástica crónica. Esta resistência está relacionada com a ausência da proteína p53 (proteína de supressão tumoral), como consequência de alterações no gene TP53 do cromossoma 17p. Os doentes que apresentem esta mutação constituem o grupo com pior prognóstico de tratamento da doença, representando cerca de 10% dos doentes com CLL. Para estes doentes a quimioterapia deve ser evitada, sendo mais aconselhável o tratamento com recurso ao anticorpo monoclonal alemtuzumab (anti-CD52) em associação com elevadas doses de glucocorticóides como a metilprednisolona (Johnson, Carr, Pirmohamed, e Pettitt, 2014). Este anticorpo foi o primeiro anticorpo humanizado a ser utilizado contra a glicoproteína CD52, que é expressa na maioria das células linfóides. O Alemtuzumab actua através de mecanismos de activação do complemento e indução da apoptose (Carricho e Gadelha, 2003).

Para os doentes com leucemia linfoblástica crónica que não tenham a mutação no gene TP53, a quimioterapia volta a surgir como a opção mais eficaz, destacando-se como primeira linha a utilização em simultâneo dos fármacos fludarabina e ciclofosfamida em associação com o anticorpo monoclonal rituximab (esquema vulgarmente conhecido como FCR), podendo em alternativa ser administrada a bendamustina com o rituximab. Nestes esquemas o rituximab surge como elemento fundamental, devido à sua acção contra os antígenos CD20 das células B leucémicas, que são expressas nos casos de CLL. As suas funções são de activação do sistema de complemento, opsonização dos macrófagos e activação do mecanismo de apoptose (Tausch, Mertens, e Stilgenbauer, 2014).



### **3- Farmacogenética e Polimorfismos**

#### **3.1 – Nota Introdutória**

A resposta dos indivíduos aos diversos tratamentos e fármacos que temos hoje ao nosso dispor resulta de diversos factores importantes quer a nível fisiológico quer também devido a condicionalismos externos. A nível fisiológico podemos referir alguns factores importantes como a idade, o sexo, raça e peso, bem como parâmetros como a função renal e hepática. Por outro lado, condicionantes externos como a alimentação, medicação concomitante e exposição a agentes químicos podem também influenciar a resposta que um indivíduo pode oferecer quando sujeito a um determinado tratamento (Koo, Jon, e Lee, 2006).

Na área da oncologia, a variabilidade de resposta aos tratamentos é um tema premente e que necessita de um constante estudo, uma vez que falamos de doenças graves e cuja inadaptação do doente ao tratamento que lhe é proposto pode ser fatal, devido à toxicidade elevada que estes fármacos apresentam, bem como ao risco de morte que está inevitavelmente ligado a este tipo de patologia. Por exemplo, o protocolo de tratamento da AML é constituído por fármacos com uma taxa de mortalidade considerável devido aos níveis elevados de toxicidade encontrados nos indivíduos sujeitos a estes tratamentos (Davies, Downing e Nolan, 2006).

A eficácia e a toxicidade dos fármacos utilizados no tratamento do cancro variam também de indivíduo para indivíduo, uma vez que, tal como já foi dito estas dependem de vários factores, externos e internos. Falando apenas de factores intrínsecos, ou seja, factores que dependem da predisposição genética e metabólica de cada indivíduo, sabe-se que fármacos presentes na mesma dose, em indivíduos diferentes, podem apresentar diferenças de relevo ao nível da sua farmacodinâmica e farmacocinética, diferenças essas que depois se traduzem numa distinta resposta ao tratamento ou numa potenciação dos seus efeitos adversos. Ora, um dos principais factores responsável pelas diferenças enunciadas é a existência de polimorfismos em genes envolvidos nos processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, como o transporte do fármaco, enzimas de metabolização de fase I e fase II e na selecção das proteínas alvo onde o fármaco vai actuar, bem como em outros genes envolvidos na resposta terapêutica (Deenen, Cats, Beijnen, e Schellens, 2011).

A presença de polimorfismos nos genes codificadores das proteínas acima mencionadas é, tal como já foi mencionado, responsável pela elevada heterogeneidade verificada na resposta aos fármacos utilizados em oncologia. Por exemplo, sabe-se que o défice na enzima metabolizadora CYP2D6, aumenta consideravelmente os níveis de toxicidade em cerca de 40 fármacos, uma vez que a eliminação destes se encontra comprometida. Este polimorfismo é encontrado em cerca de 7% da população caucasiana e em cerca de 1% da população do este asiático. Nos humanos existem dezenas de enzimas metabolizadoras de fármacos com polimorfismos conhecidos, e o seu estudo torna-se essencial na área da quimioterapia, pois é onde estão inseridos alguns dos fármacos com margem terapêutica mais reduzida (Sekine e Saijo, 2001).

Polimorfismo (do grego: múltiplas formas) pode ser definido como o conjunto de todas as formas alternativas que uma sequência de DNA pode apresentar entre indivíduos diferentes, num determinado locus (posição de um gene) no genoma (Gregers, 2012). As variações genéticas mais comuns são as SNP, representando cerca de 90% de todas as alterações verificadas no genoma humano. A base de dados do NCBI contém já registados cerca de 12 milhões de SNP humanos. No entanto, apenas 60.000 estão localizados nas regiões codificantes dos genes, e destes, apenas 30.000 originam efectivamente alterações na síntese de amionoácidos e, conseqüentemente na expressão proteica. Estima-se que existam 7 milhões de SNP em humanos com MAF (minor allele frequency), que corresponde à frequência do alelo menos comum numa população (Cheok, Pottier, Kager e Evans, 2009).

Normalmente os SNP são bi-alelicos, apesar de poderem ser encontrados na forma tri e tetra-alelica. No genoma humano, a frequência dos SNP é de cerca de 1 em cada 1000 pb. No entanto esta frequência não é linear, e podem ser encontrados SNP distanciados um do outro por milhares de pares de base. A maioria destes encontra-se em regiões não codificantes, ou seja, não terão influência na expressão proteica. No entanto podem ser utilizados como marcadores preditivos em estudos genómicos. Quando presentes em regiões codificantes, os SNP vão alterar a síntese proteica, quer a nível estrutural quer a nível funcional, podendo originar doenças ou alterações na resposta de um fármaco (S. Kim e Misra, 2007).

O tratamento personalizado de determinadas patologias como o cancro depende do histórico pessoal de cada indivíduo, do seu perfil genético e da utilização de biomarcadores específicos na pesquisa da doença. Surge então a farmacogenética, que consiste na estratificação e tratamento dos doentes de acordo com uma análise prévia do

seu perfil genético e molecular, que é um importante factor na determinação da resposta que um determinado indivíduo terá quando lhe for administrado um fármaco, ou de possíveis efeitos adversos que se possam desenvolver. Este paradigma é totalmente diferente do da medicina dita tradicional, em que são desenvolvidos protocolos de tratamento que são depois utilizados em várias pessoas sem ter em consideração factores genéticos (Dorfman, Khayat, Sieminowski, Golden, e Lyons, 2013).

O principal objectivo da farmacogenética é o de estabelecer o perfil genético dos doentes, ajudando deste modo os médicos a tomarem as melhores decisões quanto ao tratamento mais adequado a seguir, na dose certa e com o máximo de eficácia e o mínimo de toxicidade possível (Koo et al., 2006).

Neste contexto insere-se também a farmacogenómica, que trata do estudo do genoma humano de modo a detectar diferenças entre cada indivíduo na absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos, bem como diferenças na eficácia e toxicidade dos fármacos. Esta área assume um papel importante quando nos referimos à área da oncologia, onde os fármacos apresentam uma janela terapêutica reduzida (Paugh, Stocco, e Evans, 2013).

Actualmente encontram-se à disposição uma série de plataformas de fácil acesso e com informações pertinentes sobre a farmacogenética, tais como o catálogo das doenças genéticas ou a identificação de todos os polimorfismos até agora identificados nas CYP (Anexo 4) (Cheok et al., 2009).

### **3.2 – Enzimas de metabolização**

As enzimas de metabolização podem ser divididas em dois grupos: enzimas de fase I e enzimas de fase II. As enzimas de metabolização de fase I estão envolvidas nos processos de oxidação, redução e hidrólise, resultando destes processos a activação ou inactivação dos fármacos, conforme estes sejam classificados de pró-fármacos ou caso seja o próprio fármaco e não os seus metabolitos a apresentar acção terapêutica. Por outro lado, as enzimas de metabolização de fase I são importantes também no aumento da polarização dos fármacos, facilitando a sua excreção (Figura 3). Após a acção destas enzimas, segue-se a actuação das enzimas de fase II que promovem o aumento da solubilidade dos fármacos. No entanto, a acção destas enzimas não depende da

intervenção prévia das enzimas de fase I (Deenen et al., 2011; Umamaheswaran, Kumar, e Adithan, 2014).

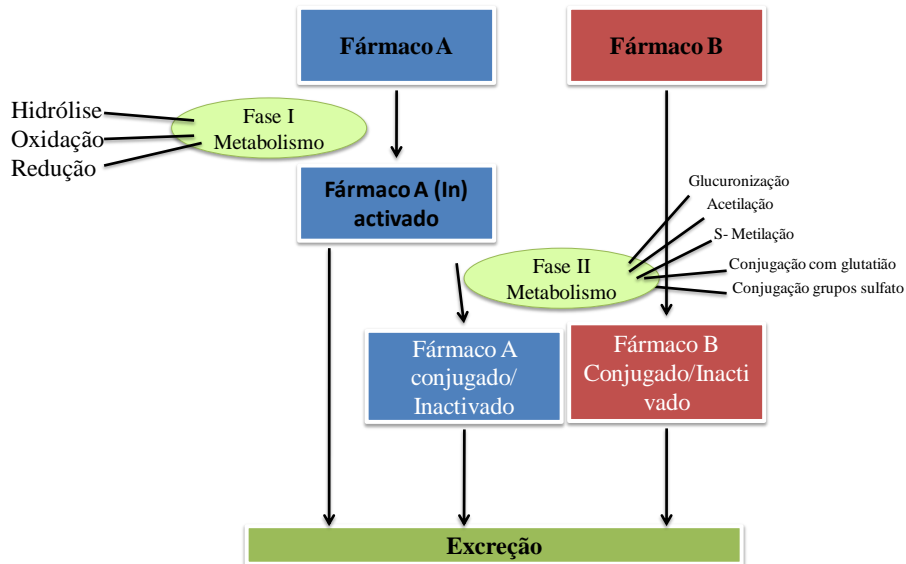


Figura 3 - Processo de metabolização mediado pelas enzimas de fase I e fase II (adaptado de Deenen et al., 2011).

### 3.2.1 – Enzimas de Fase I

Na terapêutica do cancro, a administração de um determinado fármaco, em doses iguais, em indivíduos diferentes, vai ter um comportamento diferente em cada um, ao nível da resposta do fármaco e também da toxicidade por ele atingida. Estas diferenças, que são verificadas quer a nível farmacocinético quer a nível farmacodinâmico, são o resultado de polimorfismos genéticos nos genes envolvidos nos processos de transporte, nas enzimas de metabolização fase I e fase II, e nos receptores (Deenen et al., 2011).

As enzimas de fase I envolvidas na metabolização de fármacos pertencem ao grande complexo enzimático do citocromo P450. Estas enzimas são responsáveis por várias reacções tais como hidrólise, oxidação e redução, nos quais os grupos funcionais de um determinado substrato são adicionados ou deletados. O domínio do CYP450 estende-se a cerca de 90% dos fármacos que passam pelo organismo, destacando-se as enzimas de metabolização pertencentes às subfamílias CYP1, CYP2 e CYP3

(Umamaheswaran et al., 2014).

A nível genético, os genes mais frequentemente associados à metabolização de fármacos administrados em quimioterapia são CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 e CYP3A5 (Deenen et al., 2011). Esta grande família de enzimas de metabolização tem sido alvo de uma atenção especial no que respeita à pesquisa farmacogenética, mais propriamente a pesquisa de polimorfismos nos genes que possam afectar o normal funcionamento destas enzimas (Koo et al., 2006).

Relativamente ao papel destas enzimas na alteração dos perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos fármacos utilizados no tratamento da leucemia, sabe-se que a CYP2D6 e a subfamília da CYP3A são as enzimas que de facto têm maior responsabilidade nesse capítulo. Uma vez que são responsáveis pela metabolização de grande parte dos fármacos utilizados no tratamento da leucemia, a existência de polimorfismos nestes grupos vai obviamente originar alterações na metabolização dos fármacos, podendo alterar a resposta ao tratamento bem como elevar a toxicidade apresentada pelos fármacos (Aplenc e Lange, 2004). A alteração na resposta ao tratamento resultante da existência destas variações entre indivíduos, pode ser resultante quer do aumento do catabolismo do fármaco, quer da diminuição da porção activa deste. Por outro lado, o aumento da toxicidade dever-se-á fundamentalmente a uma acumulação do fármaco no organismo e/ou acumulação de grandes quantidades de metabolitos tóxicos (Sekine e Saijo, 2001).

A enzima CYP2D6 é altamente polimórfica, tendo sido descritas múltiplas variações alélicas, sendo que a maioria tem como consequência a diminuição ou mesmo a ausência de actividade desta enzima. Os principais SNP descritos para esta enzima são CYP2D6\*4 (1846G> A), CYP2D6\*5, que origina a completa deleção do gene, e CYP2D6\*10 (100C> T) (Deenen et al., 2011). A enzima CYP2D6 é responsável pela metabolização de fármacos anticancerígenos, antiarrítmicos, antipsicóticos, e antidepressivos, entre outros, actuando em cerca de 25% dos fármacos. O gene CYP2D6 encontra-se localizado no cromossoma 22q13.2 (Umamaheswaran et al., 2014)

A subfamília da CYP3A, na qual se incluem as enzimas CYP3A4 e CYP3A5 (cromossoma 7q21.1), é o maior complexo de metabolização de fármacos, e expressa-se no fígado e intestino delgado. Este complexo é responsável pela metabolização de mais de 50% dos fármacos utilizados na prática clínica, nos quais estão incluídos os fármacos utilizados em oncologia, tais como o imatinib, etoposido, paclitaxel, ciclofosfamida,

erlotinib, entre outros. A metabolização destes fármacos pode ser condicionada, tal como já foi mencionado, pela existência de polimorfismos, mas factores como a idade, nível hormonal, estado de saúde e factores ambientais são também importantes na expressão destas enzimas (Deenen et al., 2011).

Ao longo dos últimos anos têm sido identificados vários polimorfismos nestas enzimas. As principais variações alélicas verificadas nestas enzimas são CYP3A5\*3 e a CYP3A5\*6 (Aplenc e Lange, 2004). O polimorfismo no intrão 3 (CYP3A5\*3) do gene CYP3A5 pode ser responsável pela diminuição da produção desta enzima, numa proporção de 1/1000 quando comparada com a produção desta com o alelo selvagem (CYP3A5\*1). Este polimorfismo caracteriza-se pela substituição de uma adenina por uma guanina na posição 6986, que vai originar um codão de *stop* prematuro no mRNA. Por outro lado, o alelo selvagem apresenta uma adenina na posição 6989, verificando-se a produção normal de mRNA, da qual resulta uma elevada expressão desta enzima (Sailaja, Rao, Rao, e Vishnupriya, 2010). O outro polimorfismo identificado (CYP3A5\*6, caracterizado pela substituição de uma guanina por uma adenina na posição 14690 no exão 7) é responsável pela completa ausência da enzima CYP3A5 nos tecidos de algumas pessoas (Umamaheswaran et al., 2014).

### 3.2.2 – Enzimas de fase II

As enzimas de fase II encontram-se envolvidas em reacções de sulfatação, acetilação, conjugação e glucuronidação. Estes mecanismos são muito importantes na eliminação de alguns fármacos devido ao aumento da sua hidrofília ou pela desactivação de substratos altamente reactivos. As principais enzimas envolvidas nestes mecanismos são as GST, a N-acetiltransferase 1 e 2 e a TPMT (Umamaheswaran et al., 2014).

Os genes GSTM1, GSTP1 e GSTT1 estão localizados respectivamente, nos cromossomas 1p13.3, 22q11.23 e 11q13. Os polimorfismos mais comuns nestes genes dizem respeito à deleção da GSTM1 e GSTT1, e aos SNP na GSTP (GSTP1\*B e GSTP1\*C). A maior ou menor frequência das variações depende de uma distribuição racial (Aplenc e Lange, 2004).

As GST fazem parte da classe dominante de enzimas de fase II. Têm um papel muito importante na biotransformação e na destoxificação de várias substâncias,

incluindo um número elevado de fármacos. Têm ainda como função de proteger as células contra os radicais de oxigénio. Sabe-se que os polimorfismos verificados nesta família têm um papel importante na susceptibilidade ao cancro, bem como na variância verificada na resposta aos fármacos e no prognóstico da doença (Umamaheswaran et al., 2014).

Por fim, a tiopurina metiltransferase é uma enzima responsável pela metabolização dos fármacos 6-mercaptopurina, tioguanina e azatioprina. Estes fármacos são utilizados no tratamento da leucemia linfoblástica aguda. O gene TPMT está localizado no cromossoma 6p22.3, tendo sido já identificados vários polimorfismos associados a este gene, sendo de destacar o TPMT\*2 (G238C), TPMT\*3A (G460A e A719G), TPMT\*3B (G460A) e TPMT\*3C (A719G), pois são os mais prevalentes. Estes alelos mutados são responsáveis diminuição os níveis celulares da proteína TPMT (Ashavaid et al., 2009).

### 3.3 – Proteínas transportadoras

As proteínas transportadoras têm como função o transporte de substâncias ao logo das membranas biológicas, como por exemplo fármacos e outros xenobióticos. Apresentam deste modo um papel relevante na captação, biodisponibilidade, eficácia, toxicidade e clearance dos fármacos. Dentro do grupo de transportadores, as proteínas mais importantes envolvidas no transporte de fármacos são as pertencentes ao complexo ABC, bem como a família SLC. A família ABC é considerada transportadores de efluxo (para o exterior da célula) enquanto a família SLC são transportadores de influxo (para o interior da célula) (Umamaheswaran et al., 2014).

As proteínas do grupo ABC estão envolvidas no tipo de transporte ATP dependente, que engloba o transporte quer de moléculas pequenas como iões até grandes péptidos, que estão associados à estrutura da grande maioria dos fármacos (Sekine e Saijo, 2001). Este tipo de tipo de transporte activo está também envolvido na absorção de fármacos utilizados na quimioterapia (Deenen et al., 2011).

A família ABC vem sido associada à resistência das células tumorais em alguns tipos de tratamentos oncológicos, bem como a alterações na disposição e funcionamento desses fármacos, e ainda a um aumento da sua toxicidade. Dentro desta família destacam-se os domínios ABCB1 (ou MDR1) e o ABCG2 (Koo et al., 2006). O gene

MDR1 está localizado no cromossoma 7q21.1. Este gene é altamente polimórfico, tendo sido já identificados mais de 50 SNP, dos quais se destacam o polimorfismo 2677G>T/A/C no exão 21, 3435C>T no exão 26 e o 1236C>T no exão 12 (Umamaheswaran et al., 2014).

O gene MDR1 codifica para a glicoproteína P, e é esta proteína o principal mecanismo transportador no que diz respeito à família ABC. A glicoproteína P é responsável pelo transporte de um grande número de fármacos hidrofóbicos, dentro dos quais se destacam os fármacos citotóxicos, como a doxorrubicina e o paclitaxel, entre outros. Relativamente aos polimorfismos já enunciados, a sua frequência é bastante variável: o polimorfismo C3435T tem uma frequência que varia entre os 73-84% em indivíduos de origem africana, e uma frequência entre os 34-59% em europeus e asiáticos. Esta variabilidade alélica do gene MDR1 demonstra que as diferenças na resposta aos fármacos, pode ter, sob um ponto de vista farmacocinético, uma relação com a raça de cada indivíduo (Lee, Lockhart, Kim, e Rothenberg, 2005).

Outro dos genes importantes dentro da família ABC é o gene ABCG2 (também designado por BCRP). Esta proteína é expressa ao nível do fígado, rins, cérebro, coração e tracto gastrointestinal, e actua em vários fármacos utilizados em quimioterapia como o metotrexato, mitoxantrona, imatinib, entre outros (Deenen et al., 2011). Em casos de leucemia mielóide aguda e leucemia linfoblástica aguda foi verificado que o gene ABCG2/BCRP confere resistência aos fármacos utilizados no tratamento destas doenças. Esta resistência é devido aos polimorfismos apresentados pelo gene, nos quais se destacam o 421C>A e o 376C>T (Noguchi, Katayama, e Sugimoto, 2014).

Por outro lado, dentro da família SLC, destaca-se o gene SLC22A1, responsável pela captação, eliminação e distribuição de vários fármacos nos quais se inclui o imatinib (Umamaheswaran et al., 2014). Os principais polimorfismos apresentados por este gene (cromossoma 6q25.3) são: 1022C>T no exão 6, 1222A>G no exão 7 e o 1386C>A num intrão localizado entre os exão 8 e 9 (Singh et al., 2012).

Outro dos genes fundamentais pertencentes a esta família é o gene SLCO1B1 (cromossoma 12p12.2), que codifica para uma proteína transmembranar com o mesmo nome e que tem como principal função a captação hepatocelular de diversas substâncias, incluindo as de carácter aniónico. Dos fármacos que interagem com esta proteína destacam-se as estatinas, o metotrexato e a rifampicina. Sabe-se que os polimorfismos neste gene, SLCO1B1\*1B exão 5 (388A>G), SLCO1B1\*4 (463C>A) e

SLCO1B1\*5 exão 6 (521T> C) alteram a função da proteína podendo influenciar as características farmacocinéticas e o perfil de toxicidade de fármacos como o metotrexato (Umamaheswaran et al., 2014).

### 3.4 – O papel da farmacogenética no tratamento de doenças: o exemplo da TPMT

A toxicidade dos fármacos utilizados no tratamento do cancro, nos quais se inserem naturalmente os compostos utilizados em quimioterapia no tratamento da leucemia, pode ser afectada pela existência de polimorfismos presentes em genes que codificam para as proteínas transportadoras, receptores, alvos terapêuticos, e as enzimas de metabolização desses fármacos (Kishi et al., 2007).

Um dos primeiros estudos farmacogenéticos envolvendo fármacos administrados em oncologia foi elaborado a partir da análise do metabolismo das tiopurinas, das quais fazem parte o fármaco 6-mercaptopurina, antimetabolito muito utilizado no tratamento da leucemia linfoblástica aguda em crianças (Aplenc e Lange, 2004).

Muito sinteticamente, o mecanismo de acção da 6-mercaptopurina consiste na inibição da produção de nucleótidos essenciais para a síntese correcta de RNA e DNA. Este fármaco é metabolizado por s-metilação pela enzima tiopurina metiltransferase (TPMT, cromossoma 6p22.3), resultando desta reacção um conjunto de metabolitos inactivos (Lee et al., 2005).

Devido ao elevado número de polimorfismos já identificados na sequência codificadora desta enzima, a actividade da TPMT apresenta muitas variações dentro da população, e sabe-se que estas variações são responsáveis por alterações significativas na acção e nos efeitos adversos resultantes da administração da 6-mercaptopurina. Efectivamente sabe-se que quando a TPMT não está a exercer correctamente a sua função, verifica-se no fármaco uma melhor eficácia terapêutica, mas também um aumento da sua toxicidade (Weng et al., 2013).

Os alelos mutados que são detectados na população com maior frequência (cerca de 95%) são o TPMT\*2 (238G> C), TPMT\*3A (460G> A e 719A> G), TPMT\*3B (460G> A) e o TPMT\*3C (719A> G). Cerca de 90% da população apresentam os dois alelos selvagens (TPMT\*1) que se traduz numa actividade enzimática dita normal; 5 a 10% da população apresenta um alelo selvagem e outro mutado, apresentando uma

actividade enzimática intermédia; por fim, 1 em cada 300 indivíduos possuem os dois alelos mutados, apresentando consequentemente deficiências na actividade enzimática da TPMT (Cheok et al., 2009; Umamaheswaran et al., 2014).

Face ao elevado número de polimorfismos evidenciados pela TPMT, a FDA resolveu decretar a genotipagem dos SNP da enzima quando se pretende administrar a 6-mercaptopurina. Se os pacientes apresentassem o alelo modificado, do ponto de vista clínico iria ser sugerida uma redução da dose de 6-mercaptopurina a administrar ao doente, para minimizar a toxicidade que o fármaco poderia vir a revelar (Weng et al., 2013). Esta medida foi muito importante uma vez que estudos farmacogenéticos da enzima TPMT revelaram que pacientes com défice na actividade desta enzima apresentam maior susceptibilidade de desenvolver toxicidade hematopoiética, devido à acumulação de elevadas quantidades intracelulares de metabolitos. Estes pacientes requerem uma redução da dose na ordem dos 90%, sendo que a dose tradicional é de cerca de 75 mg/m<sup>2</sup>/dia (Cheok et al., 2009)

Por outro lado, estudos mostraram que pacientes com ALL que apresentassem pelo menos um alelo mutado respondiam melhor ao tratamento com 6-mercaptopurina do que os pacientes que possuíssem os dois alelos selvagens (Cheok et al., 2009). Para além das variações verificadas na eficácia e toxicidade da 6-mercaptopurina, os polimorfismos na enzima TPMT podem originar outras complicações como mielossupressão, leucopenia e pancitopénia (Ashavaid et al., 2009).

A análise da actividade enzimática da TPMT tornou-se deste modo um dos primeiros testes farmacogenéticos a ser desenvolvido na prática clínica, dado que em 1989 a baixa actividade desta enzima foi directamente relacionada com o aumento da toxicidade da 6-mercaptopurina. Consequentemente este facto foi comprovado com uma série de ensaios clínicos desenvolvidos nos anos 90 em pacientes diagnosticados com leucemia e outras patologias (Weinshilboum, 2001).

O estudo dos polimorfismos apresentados por esta enzima contribuiu bastante para o desenvolvimento de diagnósticos mais sensíveis, definir a margem de tratamento de acordo com a genotipagem que é feita a cada indivíduo, e desta forma reduzir os efeitos adversos resultantes da administração de fármacos como a 6-mercaptopurina, criando um novo paradigma daquilo que viria a ser o futuro da farmacogenética aplicada ao tratamento de doenças (Ashavaid et al., 2009).

## **4 – Imatinib e a Leucemia Mielóide Crónica**

### **4.1 – Mecanismo de Acção**

Este fármaco pertence ao grupo dos inibidores selectivos do complexo tirosina quinase, mais especificamente da proteína BCR/ABL tirosina quinase, e é um dos principais fármacos utilizados no tratamento da leucemia mielóide crónica (D. H. D. Kim et al., 2010). Todas as células necessitam para sobreviver do correcto funcionamento das proteínas responsáveis pela transmissão do sinal que leva ao crescimento e desenvolvimento celular. Este sinal só é transmitido com a adição de um grupo fosfato, e, por sua vez, este grupo é activado pelas enzimas tirosina quinase. Nas células normais o sinal é activado ou desligado consoante as necessidades, ao passo que na leucemia mielóide crónica (Ph<sup>+</sup>), a enzima BCR/ABL se encontra constantemente ligada, o que faz com que os grupos fosfato estejam constantemente a ser produzidos, contribuindo para a proliferação descontrolada destas células.

É neste mecanismo que interfere o imatinib, pois bloqueia a acção da enzima BCR/ABL, impedindo-a de adicionar os grupos fosfatos. Sem estes, as células param de crescer e acabam por morrer por apoptose (Goldman e Melo, 2003). A importância e as vantagens deste fármaco não se ficam por aqui, porque a enzima BCR/ABL tirosina quinase encontra-se presente apenas nas células cancerosas, pelo que o imatinib não representa qualquer ameaça para as células normais, atacando apenas as células malignas, num mecanismo designado por terapia direccionada (Fausel, 2007).

Para além da sua capacidade de inibir a actividade da proteína BCR/ABL tirosina quinase, o imatinib apresenta ainda um papel importante na reversão da angiogénese que ocorre na medula óssea e ainda na diminuição da concentração plasmática do factor de crescimento vascular e endotelial (VEGF) nos doentes com CML (D. H. Kim et al., 2009).

### **4.2 – Farmacocinética**

O Imatinib apresenta do ponto de vista farmacocinético características bastante interessantes, destacando-se a rápida e quase total biodisponibilidade oral, na ordem dos

98%. O seu tempo de semi-vida é de 20h, o que permite uma maior comodidade aos doentes pois requer apenas uma administração diária. No entanto, e apesar destas condições favoráveis, apresenta invariavelmente algumas interações com outros fármacos, uma vez que interage com algumas enzimas metabolizadoras do complexo P450. A sua excreção é feita no rim, ao passo que a sua metabolização é levada a cabo no fígado, essencialmente pelas enzimas CYP3A4 e CYP3A5, e, em menor quantidade, pelas enzimas CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 e CYP2C19. O seu metabolito mais comum é o CGP74588, que representa cerca de 20% da concentração de fármaco no plasma dos pacientes, apesar de ser biologicamente similar ao Imatinib na sua forma nativa (Wang et al., 2008).

Existem vários mecanismos de resistência ao imatinib, no qual se inclui a ideia de que a variabilidade farmacogenética dos doentes promove diversas alterações farmacocinéticas neste fármaco. A farmacocinética do imatinib está intimamente relacionada com a resposta que o fármaco dará nos casos de leucemia mielóide crónica. Sabe-se por exemplo que os SNP detectados em algumas das enzimas do citocromo P450 e nas proteínas transportadoras vão ter influência na acção do imatinib, levando a resistências ao tratamento ou ao aparecimento de sintomas característicos da toxicidade (Seong et al., 2013).

#### **4.3 – Outras aplicações clínicas**

Para além de ser o fármaco de primeira linha no tratamento da leucemia mielóide crónica, este fármaco pode ser também administrado em doentes com tumores gastrointestinais estromais avançados, mastocitose e outras doenças mieloproliferativas (Dulucq e Krajinovic, 2010).

## 4.4 – Farmacogenética do Imatinib no tratamento da Leucemia Mielóide Crónica

### 4.4.1 – Polimorfismo no gene ABCB1

Um estudo efectuado em doentes (n=90) com CML teve como objectivo analisar os polimorfismos mais frequentes no gene ABCB1 (MDR) e verificar se estes polimorfismos estariam ou não relacionados com o facto de os doentes atingirem o estado de MMR quando sujeitos a um tratamento com apenas uma única dose diária de imatinib. Os polimorfismos estudados para o gene MDR foram o 1236C> T, 2677G> T/A e o 3435C> T. Verificou-se que 85% dos doentes que apresentavam homozigotia para o alelo 1236T atingiram a MMR quando tratados com imatinib, ao passo que os pacientes com outros genótipos apenas atingiram a MMR numa frequência de 47,7%. Por outro lado, em relação ao polimorfismo 2677G> T/A, verificou-se que a presença do alelo G está intimamente relacionada com um pior prognóstico da doença (47,1% para GG/GA/GT), quando em comparação com os outros alelos (77,8% para TT/TA). Foi ainda possível observar que os indivíduos com genótipo 1236TT apresentavam uma concentração plasmática de imatinib mais elevada e que não se verificou qualquer relação entre o SNP C3435T e a eficácia do tratamento com o imatinib (Dulucq et al., 2008).

No entanto, a informação sobre o papel do gene MDR na resposta que os doentes oferecem quando submetidos a tratamento com imatinib é controversa, pois existem outros estudos que contradizem o que foi dito anteriormente, o que sugere que a pesquisa nesta área ainda requer muitos avanços. Um desses estudos visou recriar no essencial as mesmas condições fornecidas no estudo anterior, com excepção da alteração da dose de imatinib (de 400 para 800 mg), e do número de pacientes (n=46). Ao contrário do outro estudo, a MMR foi obtida numa frequência de 92% (após um ano de tratamento) nos indivíduos homozigóticos em 1236C, e numa frequência menor nos restantes genótipos (52% para CT e 50% para TT). Outra conclusão importante deste estudo foi que indivíduos homozigóticos para o 3435T e 2677T apresentaram pouca probabilidade de atingir CMR, pelo que se verifica que o genótipo TT é aquele que apresenta pior prognóstico (Deenik et al., 2010).

#### **4.4.2 – Polimorfismo no gene ABCG2**

O gene ABCG2, também designado por BCRP é um membro da subfamília ABCG cuja actividade parece estar relacionada com a resistência que alguns fármacos, nomeadamente o imatinib, apresentam na sua actuação contra alguns tipos de cancro. Esta resistência pode ser explicada pela existência de polimorfismos neste gene, dos quais se destacam o 421C> A e o 34G> A (Noguchi et al., 2014).

Num dos principais estudos envolvendo este gene, foram analisados 229 indivíduos diagnosticados com leucemia mielóide crónica Ph<sup>+</sup> e que durante os anos 2000 e 2006 foram tratados com imatinib em doses de 400, 600 ou 800 mg/dia. Foram estudados vários polimorfismos quer em enzimas de metabolização quer em proteínas transportadoras, destacando-se neste grupo os polimorfismos do gene ABCG2 (421C> A e o 34G> A). O polimorfismo 421C> A foi utilizado no estudo da resposta molecular major e resposta molecular completa enquanto o polimorfismo 34G> A foi utilizado na detecção da resposta citogenética major e resposta citogenética completa. Relativamente ao SNP 421C> A com o genótipo AA verificou-se uma percentagem elevada de doentes que atingiram quer a resposta molecular completa quer a resposta molecular major ao passo que para o SNP 34G> A o prognóstico de evolução da doença é muito pouco favorável para o genótipo GG (D. H. D. Kim et al., 2009).

Este estudo permitiu aferir acerca da importância do domínio ABCG2/BCRP como indicador clínico da eficácia dos inibidores da tirosina quinase no tratamento da leucemia mielóide crónica. Por outro lado, foi revelada a importância que diferentes genótipos podem ter na resposta de um indivíduo quando tratado com determinado fármaco (Noguchi et al., 2014).

#### **4.4.3 – Polimorfismo no gene SLC22A1**

Os transportadores de membrana são muito importantes na determinação dos processos farmacodinâmicos e farmacocinéticos de qualquer fármaco. Nos doentes com leucemia mielóide crónica cujo tratamento consiste na administração de imatinib, a captação deste fármaco é feita essencialmente através dos transportadores de influxo,

nomeadamente o hOCT1 (gene SLC22A1). Deste modo podemos aferir que a expressão e a actividade deste transportador são muito importantes para que o imatinib apresente uma resposta clínica favorável. Do mesmo modo, polimorfismos afectos a este gene podem originar uma diminuição da expressão do transportador, e conseqüentemente, levar a uma diminuição da resposta do imatinib (Giannoudis et al., 2013).

Do mesmo modo que a expressão deste transportador pode originar uma menor resposta do imatinib, sabe-se também que a expressão elevada de hOCT1 pode originar uma redução de 3 log na transcrição do domínio BCR-ABL originando uma MMR. Para confirmar este facto, foi elaborado um estudo em 132 indivíduos ingleses com leucemia mielóide crónica e cujo tratamento de base consistia na administração de 400 mg de imatinib. Foram analisados diversos polimorfismos no hOCT1, dos quais se destacam o R61C, P341L e o 1201G> A. De todos os polimorfismos analisados, apenas o 1201G> A mostrou estar relacionado com a resposta do imatinib no organismo. De facto os doentes com o genótipo GA apresentaram uma maior probabilidade de desenvolver uma maior resposta molecular. No entanto, por tal se ter verificado em apenas 6 indivíduos, as conclusões que daqui se podem retirar nunca serão totalmente fiáveis (Bazeos et al., 2010).

Outro estudo levado a cabo por Kim et al em 229 pacientes canadianos diagnosticados com CML concluiu que o polimorfismo 480C> G está relacionado com o risco de perda de resposta terapêutica e até mesmo falha total da terapêutica com imatinib, quando esta variação se encontra em indivíduos com o genótipo GG (D. H. D. Kim et al., 2009).

#### 4.4.4 – Polimorfismo no gene CYP3A5

Para um estudo de polimorfismos no gene CYP3A5 foram seleccionados 265 pacientes indianos com leucemia mielóide crónica. Os polimorfismos analisados foram o CYP3A5\*3 (A6986G) e CYP3A5\*6 (A14690G), tendo sido verificado que para o genótipo GG, o primeiro polimorfismo diminui consideravelmente a resposta hematológica dos pacientes tratados com 400 mg de imatinib. Neste estudo o polimorfismo CYP3A5\*6 não foi detectado. Podemos concluir que este polimorfismo pode ser responsável pelo aumento da toxicidade do imatinib, contribuindo largamente

para a progressão da doença dado que a diminuição da expressão da CYP3A5 pode estar associada com a acumulação de metabolitos tóxicos, daí ter sido verificada uma diminuição na resposta hematológica (Sailaja et al., 2010).

Outro estudo levado a cabo por Kim et al em 229 canadianos com leucemia mielóide crónica apresentou outro tipo de resultados. De acordo com este estudo, o genótipo AA para o polimorfismo CYP3A5\*3 é o genótipo que apresenta menor resposta citogenética quando os pacientes foram tratados com imatinib (D. H. D. Kim et al., 2009).

No final da dissertação é apresentada uma tabela com o resumo das principais características dos estudos que foram mencionados anteriormente, de forma a permitir uma melhor interpretação dos resultados obtidos e da relação que os polimorfismos podem ter na resposta terapêutica oferecida pelo imatinib (Anexo 5).

## **5 – Metotrexato e a Leucemia Linfoblástica Aguda**

### **5.1 – Mecanismo de acção**

O metotrexato é um antimetabolito pertencente ao grupo dos antineoplásicos, usado em doentes com leucemia linfoblástica aguda e cujo potencial clínico é amplamente reconhecido há mais de cinco décadas (Gómez-Gómez et al., 2012).

Os metabolitos do folato presentes na carcinogénese podem influenciar a expressão e estabilidade do DNA, dando origem a translocações, deleções ou inversões nas *stem-cell* hematopoiéticas o que pode levar ao desenvolvimento de leucemia. O metabolismo dos folatos participa na metilação, síntese e reparação de DNA, e é precisamente aqui que actua o metotrexato (Qin et al., 2014).

O ciclo do ácido fólico tem como objectivo a conversão do ácido fólico na forma de tetrahydrofolato. No plasma o ácido fólico existe sob a forma de 5-metiltetrahydrofolato, e a sua entrada na célula é feita com o auxílio do transportador RFC. Uma vez dentro da célula, o 5-metiltetrahydrofolato sofre a acção da enzima folilpoliglutamato sintetase, convertendo-se em 5-metiltetrahydrofolato poliglutamato (5-MeTHFp). Após esta reacção o 5-MeTHFp é reduzido a tetrahydrofolato poliglutamato devido à cedência de um grupo de carbono durante a reacção de conversão da homocisteína em metionina. Para finalizar o ciclo, a metionina é convertida em S-adenosilmetionina, que tem um papel fundamental na síntese de DNA. Por outro lado, o tetrahydrofolato poliglutamato pode ser convertido em 5,10-metilenotetrahydrofolato poliglutamato que é importante na síntese de timidilato ou de bases purinas de DNA (Gregers, 2012).

Resumidamente, o mecanismo de acção do metotrexato consiste na inibição do ciclo do ácido fólico através da inibição de duas enzimas fundamentais: a enzima dihydrofolato redutase (DHFR), responsável pela conversão dos folatos na sua forma activa (tetrahydrofolato), e a enzima timidilato sintetase. O tetrahydrofolato é um substrato da enzima timidilato sintetase, e sem esta não se verifica o emparelhamento das bases purinas nem a produção de timidina, essenciais na síntese de DNA. Do mesmo modo, a inibição directa da enzima timidilato sintetase vai provocar deplecção nas cadeias de DNA (Figura 4) (Fukushima et al., 2013).

A eficácia do metotrexato é limitada pelo elevado número de efeitos adversos que pode provocar, pelo que é importante restringir e seleccionar correctamente o tipo de doentes abrangidos por este tratamento. Deste modo a terapêutica individualizada surge como uma medida útil para limitar a toxicidade apresentada pelo fármaco. A análise e detecção de polimorfismos que possam prejudicar a eficácia do fármaco são muito importantes dado que são conhecidos vários polimorfismos que potenciam os seus efeitos adversos (Niedzielska, Tompol-Weclawek, Kocjan-Matkowska, e Chybicka, 2013).

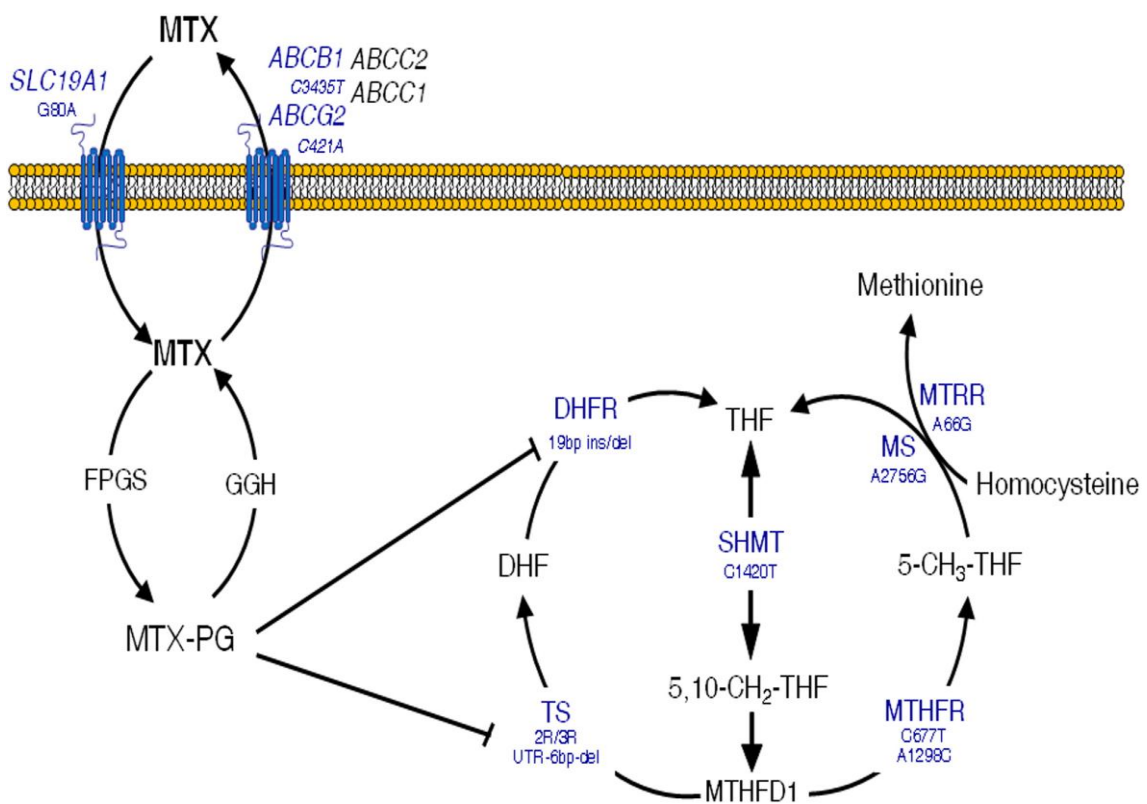


Figura 4 - Representação esquemática da acção do metotrexato (Gervasini e Vagace, 2012).

## 5.2 – Farmacocinética

O metotrexato é absorvido na porção proximal do jejuno em quantidades consideráveis, podendo variar entre os 40 e os 100%. Este é rapidamente absorvido no tracto gastrointestinal em doses inferiores a 25 mg/m<sup>2</sup>, e quando são administradas doses mais elevadas normalmente opta-se pela administração intravenosa. Este fármaco apresenta um tempo de semi-vida entre as 3 e as 10 horas quando administrado por via oral em doses baixas. No entanto, e após administração intravenosa de doses mais elevadas, a eliminação do metotrexato segue um modelo trifásico: primeiro verifica-se uma distribuição muito rápida, seguida de uma fase que corresponde à clearance renal com um tempo de semi-vida de 2-3 horas, finalizando numa terceira fase com semi-vida entre 8 a 15 horas. O metotrexato liga-se às proteínas plasmáticas em cerca de 50-60%, podendo chegar aos 95% em doses mais elevadas. É metabolizado nas células pela enzima folilpoliglutamato sintetase (Gregers, 2012).

## 5.3 – Outras aplicações clínicas

Para além da sua importância no tratamento da leucemia linfoblástica aguda, o metotrexato apresenta outras aplicações clínicas em oncologia. Destas, destacam-se o osteossarcoma, cancro da mama, cabeça e pescoço, bem como o linfoma não-Hodgkin, podendo ser ainda utilizado em determinadas doenças auto-imunes como a artrite reumatóide (Gómez-Gómez et al., 2012; Ramsey et al., 2012).

## 5.4 – Farmacogenética do Metotrexato no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda

A tabela 2 apresenta os polimorfismos mais comuns do fármaco metotrexato, entre os quais se destacam aqueles que afectam as enzimas que participam no ciclo dos folatos, bem como algumas enzimas metabolizadoras e proteínas de transporte que estão invariavelmente associadas à biodisponibilidade do fármaco. Para além dos

polimorfismos indicados na tabela serão mencionados outros que possam estar igualmente relacionados com a perda de eficácia e/ou aumento da toxicidade do fármaco.

**Tabela 2 - Alguns tipos de polimorfismos identificados no metotrexato, de acordo com a base de dados do PharmgKB** (adaptado de Chiabai, Lins, Pogue, e Pereira, 2012).

<b>Polimorfismo</b>
MTHFR 677C> T
MTHFR 1298A> C
GSTP 313A> G
RFC 80G> A
MTHFD 1958G> A
ABCC2

#### **5.4.1 – Polimorfismos nos intervenientes no ciclo dos folatos**

O metotrexato, sendo um agonista dos folatos apresenta a capacidade de também poder ser transportado pela proteína RFC para o interior da célula. No interior desta, o metotrexato é convertido na sua forma activa (metotrexato poliglutamato) devido à acção da enzima folilpoliglutamato sintetase. Após esta conversão este fármaco afecta todo o metabolismo do ácido fólico pois, tal como já foi mencionado no capítulo referente ao seu mecanismo de acção, vai inibir as duas enzimas fundamentais no ciclo dos folatos: a enzima DHFR e a timidilato sintetase (Niedzielska et al., 2013).

Os principais polimorfismos identificados nas enzimas responsáveis pelo ciclo dos folatos, e que, de forma directa ou indirecta podem alterar o normal funcionamento do metotrexato são: DHFR C829T e DHFR A317G, MTHFR C677T e MTHFR A1298C, MTRR A66G e MS A2756G (de Deus, de Lima, Seabra Silva, Leite, e Cartaxo Muniz, 2012; Gómez-Gómez et al., 2012; Fukushima et al., 2013; Niedzielska et al., 2013).

Relativamente ao gene DHFR, pensa-se que os dois polimorfismos anteriormente mencionados (C829T e DHFR A317G), estejam relacionados com a sobrevivência e/ou risco de recaída dos doentes diagnosticados com leucemia

linfoblástica aguda tratados com metotrexato. Um estudo levado a cabo por Gómez-Gómez et al, visou confirmar precisamente esta relação. O estudo foi feito em 70 pacientes mexicanos (com idades compreendidas entre os 1 e os 18 anos) diagnosticados com ALL, entre 1996 e 2009. Em relação ao polimorfismo A317G os doentes que apresentassem o genótipo GG tinham maior probabilidade de sofrer uma recaída, quando em comparação com os doentes de genótipo AA. Em relação ao polimorfismo C829T conclui-se que o genótipo com pior prognóstico de recaída é o TT, em comparação com o genótipo CC que apresenta o pior prognóstico. Relativamente à relação destes polimorfismos com a sobrevivência dos doentes, verificou-se que para o polimorfismo A317G o genótipo GG apresenta pior prognóstico da doença, não tendo sido encontrada qualquer nível de significância para o polimorfismo C829T (Gómez-Gómez et al., 2012).

O gene MS encontra-se localizado no cromossoma 1q43, e codifica para um enzima muito importante no metabolismo dos folatos, uma vez que é responsável pela conversão do 5-metiltetrahydrofolato em tetrahydrofolato, com a respectiva perda do grupo metil, que é posteriormente adicionado na homocisteína, dando origem ao aminoácido metionina que desempenha um papel fundamental na metilação do DNA. O polimorfismo identificado, A2756G, origina a troca do aminoácido glicina pelo aminoácido aspartato, e desta troca resulta a perda de função da enzima, e conseqüentemente problemas ao nível da síntese de DNA (Niedzielska et al., 2013).

Relativamente ao polimorfismo identificado no gene MS (A2756G), um estudo feito em 120 pacientes com ALL, 200 pacientes com linfoma não Hodgkin e 257 indivíduos saudáveis, permitiu concluir que os pacientes que apresentassem o genótipo GG tinham um risco de desenvolvimento de ALL cinco vezes menor que os pacientes com outro genótipo (Gemmati et al., 2004).

A enzima MTHFR desempenha um papel muito importante no ciclo do ácido fólico na medida em que promove a conversão do 5,10-metilenotetrahydrofolato em 5-metiltetrahydrofolato. Deste modo, os polimorfismos identificados para este gene, irão muito provavelmente implicar alterações na sua actividade o que pode levar a falhas terapêuticas no tratamento com fármacos que também actuem no ciclo dos folatos, como por exemplo o metotrexato. Tal como já foi mencionado, os dois principais polimorfismos identificados para a MTHFR são o C677T e o A1298C. Cerca de 8-10% dos caucasianos são homocigóticos para o alelo 677T e cerca de 40% são heterocigóticos (de Deus et al., 2012).

O polimorfismo C677T ocorre no exão 4 e leva à substituição de de uma alanina por uma valina no codão 222. Indivíduos que apresentem homozigotia 677TT têm a enzima MTHFR a funcionar apenas a 30% da sua capacidade, enquanto que nos indivíduos com genótipo 677CT a actividade enzimática situa-se nos 60%. Por outro lado, o polimorfismo A1298C ocorre no exão 7 e promove a troca de um glutamato por uma alanina, verificando-se uma igualmente uma redução da actividade da enzima MTHFR (Qin et al., 2014).

Um estudo levado a cabo por Fukushima et al analisou 82 crianças com ALL e 21 crianças com linfoma não Hodgkin tratadas com metotrexato, para verificar se de facto os polimorfismos do gene MTHFR estariam ou não relacionados com o risco de recaída ou morte em pacientes tratados com o metotrexato. Verificou-se que os pacientes que apresentavam o genótipo AC ou CC no polimorfismo A1298C não morreram nem tiveram um recaída. Por outro lado, o genótipo CT ou TT para o polimorfismo C677T promove um aumento da concentração hepática da enzima e consequentemente atrasos na administração de elevadas doses de metotrexato (Fukushima et al., 2013).

Outro estudo levado a cabo por de Deus et al visou analisar os polimorfismos C677T e A1298C em 126 crianças de idades compreendidas ente os 0 e os 18 anos e diagnosticadas com ALL e tratadas com metotrexato. Em relação ao polimorfismo C677T verificou-se que o genótipo com maior taxa de sobrevivência (98%) é o genótipo TT, comparativamente aos genótipos 677CC (77%) e 677CT. Para o polimorfismo A1298C, o melhor progóstico está associado ao genótipo CC (93%), não obstante os genótipos AC e AA também apresentarem uma percentagem de sobrevivência bastante considerável, respectivamente 80 e 85% (de Deus et al., 2012).

A substituição de uma adenina por uma citosina no polimorfismo MTHFR A1298> C resulta na substituição do aminoácido glutamina por uma alanina na posição 429 da MTHFR, o que se traduz por uma menor actividade desta enzima. Os linfoblastos com o genótipo CC para esta enzima requerem menores concentrações de metotrexato para inibir 50% da actividade da enzima TS, quando em comparação com o genótipo AC. Daqui se compreende que o genótipo AA será aquele que apresenta pior prognóstico dado que a diminuição da actividade da MTHFR leva a uma redução na conversão do 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato, o que resulta numa maior actividade da enzima TS e consequentemente mais síntese de DNA e menor sensibilidade ao metotrexato. Do mesmo modo, crê-se que o polimorfismo

C677T na MTHFR leva a uma menor eliminação do metotrexato (Fukushima et al., 2013).

#### 5.4.2 – Polimorfismos nas proteínas de transporte

O metotrexato tem dois mecanismos possíveis de entrada nas células: através da proteína RFC ou através da proteína SLCO1B1 (Radtke et al., 2013).

O gene SLC19A1, que codifica para a proteína RFC encontra-se localizado no braço longo do cromossoma 21. O principal polimorfismo identificado nesta proteína membranar resulta da substituição de uma adenina por uma guanina na posição 80. Desta variação resulta a expressão do aminoácido histidina em vez da tradicional arginina presente na estrutura natural desta proteína. Supõe-se que o resultado prático desta alteração consista numa menor afinidade da proteína RFC para os folatos bem como para o metotrexato (Niedzielska et al., 2013).

Efectivamente, estudos apontam para que uma diminuição na expressão da proteína RFC leve à falha do tratamento com metotrexato (Gómez-Gómez et al., 2012).

Um dos primeiros estudos com foco no polimorfismo 80G> A, identificado no gene RFC responsável pelo transporte da forma reduzida do ácido fólico, bem como de fármacos como o metotrexato, revelou que a substituição de uma arginina por uma histidina na posição 27 da proteína RFC, resultado do polimorfismo enunciado, provoca uma perda de afinidade para com o receptor membranar, alterando o transporte do metotrexato (Niedzielska et al., 2013).

Sabe-se que o polimorfismo 80G> A está relacionado com o risco de recaída nos pacientes diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda. Um estudo desenvolvido em 204 pacientes com este tipo de leucemia, o genótipo AA para este polimorfismo está associado com os maiores níveis de concentração de metotrexato encontrados no soro destes pacientes. Daqui se pode concluir que os polimorfismos nesta proteína, e em especial o genótipo AA, está intimamente relacionado com a diminuição da afinidade do RFC para o metotrexato, o que também pode contribuir para a potenciação dos seus efeitos adversos (Laverdière, Chiasson, Costea, Moghrabi, e Krajinovic, 2002).

Os polimorfismos do gene SLCO1B1 são responsáveis pela alteração dos parâmetros farmacocinéticos inerentes ao metotrexato. De facto sabe-se que o

polimorfismo 37041T> C provoca a substituição do aminoácido valina por uma alanina na posição 174, e tal variação é depois caracterizada pela perda de actividade da enzima, principalmente redução da captação de metotrexato. De facto, este polimorfismo é responsável pelo aumento da AUC e da  $C_{24h}$  do metotrexato, e também pela diminuição da clearance. Estes factores promovem uma acumulação de metotrexato o que potencia a sua toxicidade (Radtke et al., 2013).

Por fim, sabe-se que o transportador ABCC2 (cromossoma 10q24) é responsável pelo efluxo do metotrexato, o que é importante para a excreção a nível biliar do próprio metotrexato bem como dos seus metabolitos tóxicos. Um dos polimorfismos do gene ABCC2, o 24C> T, poderá estar relacionado com alterações nas concentrações plasmáticas de metotrexato. De facto, sabe-se que o genótipo TT para este polimorfismo está associado às concentrações plasmáticas mais elevadas de metotrexato, o que poderá contribuir para potenciar os efeitos adversos do fármaco (Liu et al., 2014).

## **6– Leucemia Mielóide Aguda: biomarcadores e polimorfismos**

As mutações verificadas na proteína tumoral 53 (TP53) são anomalias verificadas com grande frequência em vários tipos de tumor, sendo ao mesmo tempo um dos marcadores mais relevantes para o prognóstico do desenvolvimento da leucemia mielóide aguda. Este gene supressor tumoral (braço curto do cromossoma 17), é responsável pelo desencadeamento da reparação do DNA e também pela indução da apoptose quando necessário. Vários estudos revelam que as mutações na TP53 se encontram presentes em cerca de 5 a 25% de todos os casos de AML, estando relacionados com a resistência à quimioterapia e como consequência a um pior prognóstico de evolução deste tipo de leucemia (Zeichner, Alghamdi, Elhammady, Poppiti, e Castellano-Sanchez, 2014).

A perda de funcionalidade da proteína TP53 através de vários mecanismos como mutações, deleções ou interações com outras proteínas está na base do desenvolvimento de cerca de metade dos tumores actualmente conhecidos e diagnosticados. Sabe-se que esta proteína está intimamente relacionada com a prevenção do desenvolvimento do tecido tumoral, através de mecanismos de inibição do processo de formação de metástases. Outro mecanismo de controlo tumoral oferecido por esta proteína consiste na inibição da angiogénese, uma vez que apresenta a capacidade de interagir com o centro regulador da hipoxia e pela inibição dos factores pró-angiogénicos, bem como pelo aumento da produção de outros inibidores endógenos. A combinação de todos estes mecanismos faz da proteína TP53 um elemento chave na regulação do processo de desenvolvimento tumoral (Dunna et al., 2012).

A partir da análise da importância desta proteína, facilmente se percebe que possíveis polimorfismos nesta proteína serão responsáveis pela diminuição da sua actividade e consequentemente pela desregulação de todo o processo de supressão tumoral, o que poderá constituir um prognóstico muito negativo no desenvolvimento de vários tipos de cancro, entre os quais a leucemia mielóide aguda. O SNP no codão 72 é um dos polimorfismos mais comuns nos cancros diagnosticados em humanos, e codifica para a expressão do aminoácido prolina ou arginina na porção hidrofóbica da TP53 (Zeichner et al., 2014).

Tal como já foi mencionado, este SNP é responsável pela perda de

funcionalidade e eficácia da proteína TP53, o que pode ser traduzido em falhas na indução da apoptose ou na progressão do processo de desenvolvimento das células malignas. A expressão da arginina no codão 72 está mais relacionada com o processo de apoptose, uma vez que apresenta maior afinidade para a localização mitocondrial para induzir a morte celular, ao passo que a prolina no codão 72 apresenta menor capacidade de desencadear a apoptose estando mais relacionada com o ciclo celular das células malignas mais especificamente na fase G1, pelo que se conclui que os polimorfismos no codão 72 estão claramente relacionados com uma maior predisposição para o desenvolvimento de vários tipos de cancro, destacando-se a AML. Estas duas formas polimórficas apresentam diferenças ao nível da sua estrutura e da sua migração em electroforese (Ellis et al., 2008; Dunna et al., 2012).

Vários estudos relacionam a presença deste polimorfismo com uma maior susceptibilidade de desenvolvimento da leucemia mielóide aguda e com uma evolução menos favorável do prognóstico desta doença (Ellis et al., 2008; Dunna et al., 2012; Zeichner et al., 2014).

Para além do polimorfismo identificado na proteína TP53, outros polimorfismos foram identificados em pacientes diagnosticados com leucemia mielóide aguda.

Um estudo levado a cabo por Zhou et al teve como objectivo verificar se haveria alguma relação entre os polimorfismos no gene GST e o desenvolvimento da AML. Entre 2009 e 2012 foram seleccionados 163 pacientes diagnosticados com AML, e os polimorfismos alvo de pesquisa foram o GSTM1, GSTT1 e GSTP1. O estudo concluiu que os polimorfismos GSTM1 e GSTP1 não estariam associados ao desenvolvimento de leucemia mielóide aguda. Por outro lado, verificou-se que o polimorfismo no GSTT1 com o genótipo “null”, ou seja o genótipo que se traduz por uma total ausência de função da proteína, poderá estar relacionado com a desenvolvimento de AML (nível de significância  $P < 0.05$ ). Por outro lado, o maior risco de desenvolvimento da doença é verificado nos indivíduos que apresentaram a combinação dos genótipos “null” do GSTM1 e GSTT1, bem como o genótipo GSTP1 Val/Val. Conclui-se então que estes polimorfismos poderão ser importantes marcadores para a avaliação do risco de AML, possivelmente por induzirem falhas na função da GST, nomeadamente no processo de detoxificação de produtos cancerígenas (Zhou, Zhu, Zhang, Li, e Liu, 2013).

Os SNP identificados nas CYP estão associados com a susceptibilidade de desenvolvimento de vários tipos de cancro, entre os quais os hematológicos como a leucemia mielóide aguda. O polimorfismo G516T na CYP2B6 resulta na substituição de

uma guanina por uma timina no exão 4 do nucleótido 516, o que se traduz pela substituição do aminoácido glutamina pelo aminoácido histidina na posição 172 da cadeia de aminoácidos. Desta alteração resulta uma diminuição na actividade metabólica da CYP2B6 por diminuição da transcrição de RNA mensageiro. Indivíduos que apresentem este polimorfismo com o genótipo TT ou GT encontram-se mais susceptíveis ao desenvolvimento de AML, pois não conseguem metabolizar de forma eficaz os produtos tóxicos o que resulta na sua acumulação nas células. Para além deste facto estes indivíduos podem desenvolver AML secundária devido à acumulação de metabolitos tóxicos de fármacos como a ciclofosfamida e a ifosfamida (Daraki et al., 2014).

Estudos apontam também para uma relação entre o polimorfismo A7488G no gene IL-17F e uma maior predisposição para a leucemia mielóide aguda. A presença deste polimorfismo com o genótipo GG pode ser encontrada com maior frequência em doentes com AML em comparação com doentes perfeitamente saudáveis. A interleucina 17F é produzida pelas células Th17 (helper), e tem como função a produção de citocinas inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-6, que são importantes nos processos de controlo do desenvolvimento tumoral (Wróbel et al., 2014).

Desde 1960 que a citarabina (ou ara-C) é um dos fármacos de primeira linha no tratamento da leucemia mielóide aguda, podendo ser também administrado por exemplo na leucemia linfoblástica aguda e na leucemia mielóide crónica (Lamba K, 2010).

A citarabina é um fármaco análogo da deoxicidina trifosfato, e o seu mecanismo de acção consiste precisamente na sua incorporação no DNA em substituição da deoxicidina trifosfato, provocando o bloqueio da cadeia, parando consequentemente a síntese quer de DNA quer de RNA, levando à morte das células malignas (Gamazon et al., 2013). Tratando-se de um pró-fármaco, a citarabina necessita previamente de ser fosforilada para ser convertida em citarabina trifosfato (Mitra et al., 2011).

Para que a citarabina possa apresentar efeito terapêutico, tem primeiro de conseguir penetrar dentro das células malignas. Este transporte é feito maioritariamente (80%), pela enzima transportadora hENT1 (SLC29A1). Deste modo conclui-se facilmente que as concentrações intracelulares de citarabina dependem directamente da sua captação pela hENT1. Indivíduos cujas células leucémicas não expressem quantidades satisfatórias deste transportador apresentam pior prognóstico para a AML, devido à incapacidade da citarabina de penetrar dentro das células (Lamba K, 2010).

O processo de fosforilação da citarabina é levado a cabo pela enzima DCK, ao passo que a enzima CDA é responsável pela conversão da ara-C em ara-U, que corresponde à forma inactiva da citarabina (Pei-peí et al., 2012).

A maioria das resistências verificadas no tratamento com citarabina pode estar relacionada com os níveis reduzidos da enzima DCK, ou níveis aumentados da enzima CDA (Gamazon et al., 2013).

De facto, um estudo desenvolvido por Pei-Pei et al procurou verificar a relação entre os polimorfismos identificados nas enzimas DCK e CDA e a resposta clínica oferecida por pacientes diagnosticados com AML sob tratamento com citarabina. A tabela 3 apresenta os polimorfismos que foram alvo de estudo. Entre os anos de 2008 e 2011 foram analisados 151 pacientes, e, de acordo com os dados do Anexo 6 podemos concluir que os indivíduos com o SNP 57C> A (DCK) e com genótipo CC apresentam maior taxa de resposta completa (CR) ao tratamento e remissão parcial da doença (PR). Em relação ao SNP 1356T> C (DCK) com genótipo TT e TC verificou-se um melhor prognóstico em comparação com o genótipo CC. Por fim, em relação ao polimorfismo 208G> A da enzima CDA, verificou-se que a presença do alelo G está relacionada com um prognóstico bastante favorável (Pei-peí et al., 2012).

**Tabela 3 -Principais SNP identificados nas enzimas DCK e CDA** (adaptado de Pei-peí et al., 2012).

<u>CDA 79A&gt; C (Lys27Gln)</u>
<u>CDA 208G&gt; A (Ala70Thr)</u>
<u>DCK 57C&gt; A (Ser19Ser)</u>
<u>DCK 1356T&gt; C</u>
<u>DCK 359A&gt; G (Glu120Gly)</u>

Outro factor que se crê estar relacionado com a resistência à citarabina são os níveis elevados da enzima NT5C2 (Gamazon et al., 2013). Esta enzima pertence à família das 5'- nucleotidases que são responsáveis pela desfosforilação de diversos compostos. Uma vez que a citarabina necessita de ser fosforilarida para se tornar activa, a presença de níveis elevados desta enzima não permite a fosforilação do pró-fármaco, e consequentemente as concentrações de citarabina activa que serão encontradas nas células de AML serão diminutas (Mitra et al., 2011).

**7 – Leucemia Linfoblástica Crónica: biomarcadores e polimorfismos**

A leucemia linfoblástica crónica é uma doença que apresenta uma grande heterogeneidade e variabilidade no que diz respeito à sua biologia e manifestações clínicas nos pacientes. Clinicamente, o rumo da doença pode variar desde uma condição assintomática que se estende por vários anos, a uma manifestação aguda logo no primeiro diagnóstico. Os principais factores preditivos da evolução da CLL são a idade e o estágio da doença, no entanto, hoje em dia novos marcadores têm sido definidos como podendo ser utilizados para uma caracterização mais fiável da doença (Diamantopoulos et al., 2014).

Outros factores importantes para o prognóstico da leucemia linfoblástica crónica poderão ser a análise das mutações no gene IGHV, variações nos genes supressores de tumores como o TP53, e a análise da expressão do CD38 e do ZAP-70 (Chiorazzi, 2012; Tausch et al., 2014). A tabela 4 apresenta alguns dos genes que apresentam mais mutações na CLL e que serão alvo de estudo neste capítulo da dissertação.

**Tabela 4 - Alguns dos principais genes na CLL** (adaptado de Landau e Wu, 2013).

<b>Gene</b>	<b>Frequência na CLL</b>	<b>Função do gene</b>	<b>IGHV</b>	<b>Prognóstico</b>
TP53	7.5-13%	Apoptose, reparação	Não mutado	Fraco
SF3B1	10-14%	Splicing	Não mutado	Fraco
NOTCH1	10-17%	Crescimento celular	Não mutado	Fraco

A análise das imunoglobulinas dos receptores das células B-tumorais permitem alcançar um maior conhecimento acerca do comportamento e da patogénese tumoral. De facto, a análise do gene IGHV das células B da leucemia linfoblástica crónica permitiu estratificar o tratamento e criar melhores métodos de prognóstico para a CLL (Forconi et al., 2009). Sabe-se que os pacientes com CLL que não tenham nenhuma mutação no IGHV (ou diferindo menos de 2% da linhagem original) apresentam um prognóstico muito pior quando comparado com doentes que apresentem mutações neste

gene (Patten et al., 2012).

A enzima CD38 encontra-se presente na superfície das células, participando nos processos de adesão celular, transdução de sinal e regulação dos níveis de cálcio. Por outro lado, é capaz de promover a metabolização de ATP e NAD em produtos que possam posteriormente ser captados pelas células. O aumento da produção desta enzima está relacionado com o aumento da proliferação linfocitária e consequentemente com a progressão da leucemia linfoblástica crónica. Por outro lado, a expressão de clones CD38 positivos é responsável pelo aumento da produção de VEGF e consequentemente de factores inibidores da apoptose, o que torna a presença de CD38 num prognóstico negativo para os pacientes com CLL. O pior prognóstico é verificado quando as células B-CLL apresentam na sua superfície o CD38 numa percentagem superior a 30% (Sagatys e Zhang, 2012).

A proteína ZAP-70 tem a função de tirosina quinase, e a sua expressão a nível intracelular, quando igual ou superior a 20%, é um importante indicador da taxa de sobrevivência da leucemia linfoblástica crónica, e serve também para determinar qual a melhor altura para se instituir o tratamento para este tipo de leucemia. Os níveis de expressão desta proteína estão directamente relacionados com a presença da mutação no gene IGHV e com a expressão de CD38. No entanto, esta proteína é por si só um marcador independente de avaliação da CLL. Sabe-se que as células da CLL que expressam a ZAP-70 têm maior capacidade de produção de moléculas adesivas, citocinas e factores de inibição da apoptose (Chiorazzi, 2012).

A presença da forma não mutada do IGHV está associada com níveis elevados de CD38 e ZAP-70<sup>+</sup>. Se considerarmos uma combinação destas três proteínas indispensáveis, verificamos que os pacientes que apresentam um prognóstico mais favorável são aqueles que têm ZAP-70<sup>-</sup>, associado a CD38<sup>-</sup> e à mutação no IGHV. Estes pacientes podem viver até mais 8 anos que os restantes doentes (Sagatys e Zhang, 2012).

Um dos primeiros marcadores e preditores no tratamento da leucemia linfoblástica crónica foi a presença ou a ausência de mutações na proteína p53, responsável por variações no gene TP53 localizado no cromossoma 17. Estas mutações no gene TP53 estão fundamentalmente associadas à resistência ao tratamento com quimioterapia, sendo este o pior prognóstico de avaliação da CLL. As mutações neste gene encontram-se presentes em cerca de 10% dos pacientes diagnosticados, e em cerca de 50% dos doentes com doença refratária após tratamento com fludarabina (Johnson et

al., 2014).

As mutações no gene NOTCH1 são outro factor importante no prognóstico da leucemia linfoblástica crónica. De facto as mutações verificadas neste gene conferem aos pacientes que a possuírem o pior prognóstico no tratamento da CLL. A expressão deste gene pode ainda ser utilizada no diagnóstico de novos casos de CLL, pois quer o gene NOTCH1 quer o gene NOTCH2 são expressos apenas pelas células B-CLL, e não pelas células normais (Willander et al., 2013).

O gene NOTCH1 codifica para a activação de um factor de transcrição muito importante no desenrolar de vários mecanismos envolvidos no crescimento celular. A mutação c.7544\_7545fsdel é a mutação mais frequente neste gene, representando cerca de 80% de todas as mutações encontradas. Como consequência da deleção, forma-se um codão de *stop* no domínio PEST, que é responsável pelo controlo da acção do NOTCH1. Daqui resulta a acumulação da forma activa do NOTCH1, e consequentemente, um aumento da estimulação e crescimento celular das células malignas presentes na leucemia linfoblástica aguda. Esta deleção está presente em cerca de 10% dos indivíduos com CLL (Landau e Wu, 2013).

O gene SF3B1 codifica para a proteína SF3B1 que tem um papel muito importante no processo de *splicing*, que consiste na remoção das sequências não codificantes do mRNA (intrões). Este processo é levado a cabo numa região denominada de spliceossoma, e que é constituída por RNA e pequenas subunidades proteicas ricas em uridina, das quais se destaca a U2. Uma vez que o gene SF3B1 é responsável pelo mecanismo que leva à remoção dos intrões do mRNA, pode-se afirmar que mutações verificadas neste gene levam à expressão anormal de mRNA, o que se crê que poderá ter um papel importante no desenvolvimento da leucemia linfoblástica crónica (Rossi et al., 2011).

Sabe-se que os polimorfismos nos mais diversos genes estão relacionados com uma maior predisposição para uma determinada doença. No entanto, para a leucemia linfoblástica crónica o estudo dos polimorfismos ainda necessita de ser aprofundando, uma vez que se verifica muita controvérsia quanto à importância dos SNP no prognóstico desta doença (Benner et al., 2014).

A fludarabina é um análogo das bases purinas, sendo ao mesmo tempo um dos principais fármacos de primeira linha usado no tratamento da leucemia linfoblástica crónica. Este fármaco é geralmente administrado em associação com outros fármacos como a ciclofosfamida e o rituximab. Tal como a citarabina, a fludarabina necessita de

ser fosforilada para exercer acção terapêutica, pelo que se conclui facilmente que a enzima DCK volta a ter um papel fundamental na biodisponibilidade deste fármaco. Sabe-se que o SNP A100A na enzima DCK está relacionado com alterações na toxicidade em doentes tratados com FCR. Por outro lado sabe-se que a entrada e saída da fludarabina das células é um processo mediado por uma grande variedade de transportadores, dos quais se destacam o hENT1, ABCG2 e ABCC4, pelo que os polimorfismos nestes transportadores estarão directamente relacionados com alterações na captação de fludarabina por parte das células malignas na CLL (Johnson et al., 2014).

Outro dos genes envolvido no estudo da leucemia linfoblástica crónica é o VEGF. A desregulação do processo de angiogénese pode ser encontrada numa enorme diversidade de cancros, entre os quais a CLL, na medida em que estudos realizados em doentes com CLL detectaram a presença de níveis plasmáticos e celulares de factores pró e anti-angiogénicos, bem com outras citocinas. Por outro lado, crê-se que o VEGF é responsável pela manutenção da integridade das células B-CLL devido á produção elevada de proteínas envolvidas no bloqueio da apoptose. Podemos então concluir que polimorfismos no VEGF poderão ser considerados um elemento importante no prognóstico da CLL (Wróbel et al., 2013).

O gene VEGFA encontra-se localizado no cromossoma 6p1.2, e nele foram encontrados diversos polimorfismos que poderão estar relacionados com alterações na expressão do gene, e conseqüentemente alterações no desenvolvimento e prognóstico de doenças como a leucemia linfoblástica crónica. Os principais polimorfismos identificados para este gene são 1540C> A, o 460T> C e o 405C> G. Estes polimorfismos estão relacionados com uma maior produção de factores angiogénicos e factores de resistência da apoptose, pelo que se conclui que estes polimorfismos poderão estar relacionados com a progressão da CLL (Lozano-Santos et al., 2014).

## **8 – Perspectivas futuras**

Apesar da sua descoberta nos anos 60, ainda não são totalmente conhecidas todas as potencialidades da farmacogenética aplicada aos métodos terapêuticos. Apesar de já terem sido identificados inúmeros polimorfismos responsáveis pela variabilidade na resposta aos fármacos, e de se reconhecer que a farmacogenética pode solucionar muitos dos problemas associados à eficácia e toxicidade dos fármacos, esta é uma prática que ainda não é corrente, sendo pouco aplicada e maioritariamente estudada apenas em laboratórios especializados. A prática clínica dos dias de hoje ainda não está habituada a proceder a testes de genotipagem antes da instituição de um determinado tratamento, mesmo em substratos amplamente conhecidos e cujos polimorfismos com maior significado já se encontram perfeitamente identificados, com por exemplo nas CYP (Koo e Lee, 2006).

O futuro do tratamento individualizado requer não só um conhecimento profundo do genoma do cancro, mas também o desenvolvimento de bases de dados com listas de todos os biomarcadores preditivos do cancro (Gonzalez de Castro et al., 2013).

Para além dos estudos já elaborados na identificação de SNP, é imperativo que num futuro próximo sejam desenvolvidos mais estudos farmacogenéticos envolvendo factores epigenéticos como os miRNA, metilação do DNA e modificações nas histonas. Recentemente já foram feitos alguns passos importantes nesta área pela Cancer Genome Atlas Network, que conseguiu efectuar uma caracterização genómica das mutações ocorridas no cancro da mama. A identificação destas mutações poderá permitir criar um novo espectro na estrutura dos diferentes tipos de cancro, permitindo abandonar de certa forma o agrupamento dos cancros por órgão afectado, mas sim classificá-los de acordo com as mutações apresentadas. Por outro lado, novos estudos farmacogenéticos têm sido conduzidos no genoma mitocondrial, devido ao elevado número de polimorfismos já identificados (Weng et al., 2013).

Em relação à leucemia mielóide crónica, as opções terapêuticas foram alargadas com o desenvolvimento de novos fármacos da segunda geração de inibidores da tirosina quinase. O nilotinib e o dasatinib são, em comparação com o imatinib, mais potentes e mais selectivos na inibição do domínio BCR-ABL, para além de terem já demonstrado serem eficazes em situações de resistência ao imatinib (Angelini et al., 2012). Relativamente ao imatinib, e sabendo que existe uma grande variabilidade na resposta

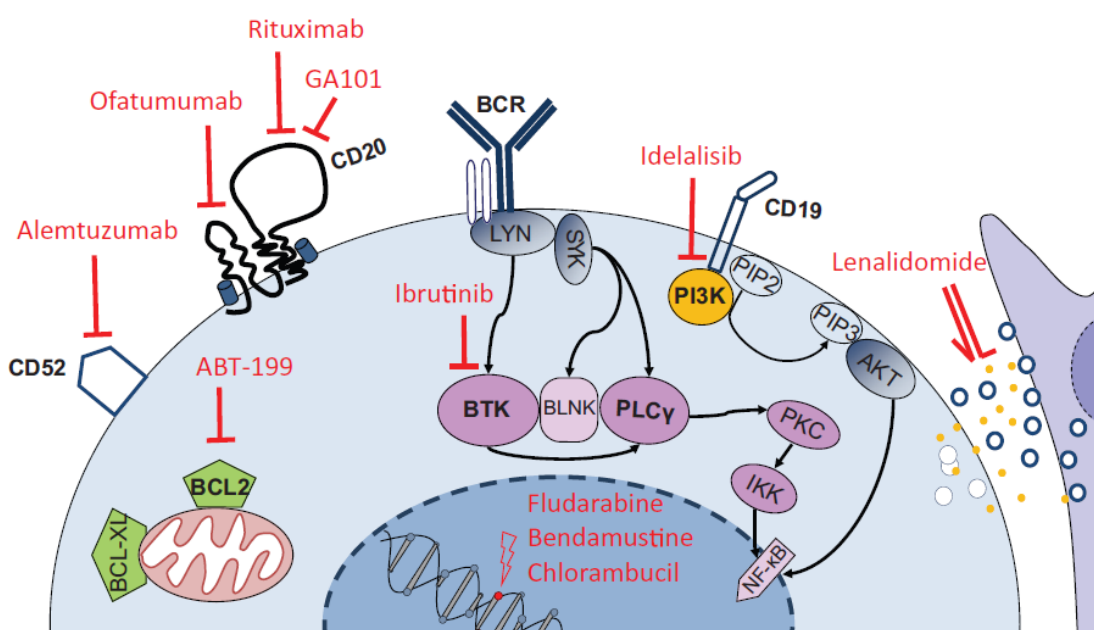
dos indivíduos perante este fármaco, devem ser desenvolvidos mais estudos farmacogenéticos para melhor se compreender o papel que a genética de cada indivíduo tem nesta variabilidade de resposta ao tratamento. O foco do estudo deverá ter em conta os genes cujos produtos são essenciais para a acção do imatinib, de modo a serem identificados potenciais marcadores de resposta, quer a nível farmacocinético quer a nível farmacodinâmico (Dulucq e Krajinovic, 2010).

Em relação à leucemia linfoblástica aguda, não tem sido fácil introduzir os estudos farmacogenéticos na prática clínica. De facto, têm surgido algumas barreiras à implementação da terapêutica personalizada. Para comprovar este facto, apenas 1-2% dos fármacos reconhecidos e aprovados apresentam bases farmacogenómicas para justificar a sua utilização. Dentro do grupo de fármacos normalmente utilizado na quimioterapia para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda em crianças, apenas a 6-mercaptopurina, a tioguanina e a azatioprina possuem testes genéticos de suporte recomendados para a instituição da terapêutica individualizada (teste TPMT). Esta é uma situação que se pretende ver alterada num futuro próximo, com a criação de plataformas genéticas de custos reduzidos que permitam identificar e analisar os polimorfismos, e, indirectamente, contribuir para o sucesso dos tratamentos e para o aumento da taxa de remissão deste tipo de leucemia (Gervasini e Vagace, 2012).

Recentemente têm sido desenvolvidas novas estratégias terapêuticas na leucemia linfoblástica crónica, no sentido de aumentar a eficácia dos tratamentos e a taxa de remissão desta doença. Sabe-se que a primeira linha de quimioterapia para o tratamento desta doença consistia na administração de rituximab com fármacos citostáticos como a fludarabina e a ciclofosfamida, por exemplo. Dos novos fármacos desenvolvidos, destacam-se os anticorpos ofatumumab, obinutuzumab, a lenalidomida, ibrutinib e o idelalisib (Figura 5) (Tausch et al., 2014).

O cenário terapêutico da leucemia linfoblástica crónica vai conhecer novos desenvolvimentos com o desenvolvimento de novos fármacos como o ibrutinib e o idelalisib, que têm como mecanismo de acção a inibição dos receptores das células B, designadamente a enzima BTK. No entanto, e apesar destes fármacos apresentarem elevados níveis de eficácia e baixa toxicidade, não se verifica resposta terapêutica em todos os pacientes, e muitos doentes têm mesmo de descontinuar os fármacos devido ao aparecimento de efeitos adversos. Tal como os agentes utilizados na quimioterapia da CLL, estes novos fármacos são influenciados por polimorfismos que podem afectar a farmacodinâmica e a farmacocinética dos fármacos (Johnson et al., 2014).

Apesar de ainda estarmos longe de acabar com a era da quimioterapia, estes novos fármacos, alguns dos quais ainda estão a ser testados em ensaios clínicos, vão alterar o paradigma do tratamento da leucemia linfoblástica crónica. Uma das estratégias com possibilidade de apresentar níveis de eficácia elevados será a combinação dos esquemas de quimioterapia actualmente utilizados com estes novos fármacos desenvolvidos (Tausch et al., 2014).



**Figura 5 - Novos agentes terapêuticos e os seus alvos nas células da leucemia linfoblástica crónica** (Tausch et al., 2014).

No entanto, existem ainda alguns factores que podem dificultar a aplicação da farmacogenética ao diagnóstico e tratamento de doenças. As instalações requeridas para se fazer a genotipagem e a análise mutacional não se encontram ao dispor de todos, para além das técnicas usadas serem ainda dispendiosas e morosas. Por outro lado, os profissionais da área da saúde ainda não apresentam qualificações nem experiência suficiente na área para que esta prática passe definitivamente a ser uma realidade. Outro obstáculo que tem travado o desenvolvimento da farmacogenética está relacionado com o facto de ainda haver alguma desconfiança, na medida em que nalgumas situações não existe total confiança para se associar um SNP às alterações verificadas na resposta de um determinado fármaco. Os estudos de genotipagem podem originar alguns falsos

positivos uma vez que existem outros factores que podem influenciar os resultados do rácio metabólico, tais como a administração concomitante de outros fármacos, o estado nutricional do indivíduo, bem como outros aspectos da sua saúde (Koo et al., 2006).

As tecnologias e os métodos utilizados para identificar variações genéticas evoluíram muito ao longo dos anos. Hoje em dia existem processos mais rápidos, automatizados e eficientes. Nos dias de hoje qualquer amostra de sangue pode ser utilizada para testes de genotipagem, permitindo verificar se as variações genéticas estão ou não associadas a alterações na resposta ou toxicidade de um determinado fármaco. Todas as técnicas mais eficazes de genotipagem são baseadas na realização de um PCR, para amplificar o ADN contendo os polimorfismos que se pretendem estudar. Após a amplificação os polimorfismos podem então ser estudados através da análise de bandas em gel de agarose, ou por sequenciação directa do DNA (Lee et al., 2005).

Nas doenças do foro genético, o estudo desta em busca de variações genéticas é feito inicialmente com a selecção e genotipagem de SNP de uma população de indivíduos que apresentem a patologia que se pretende estudar. Do outro lado estará uma população de indivíduos saudáveis para que se possa comparar o genótipo destes com o genótipo dos indivíduos afectados pela doença. Mais tarde conclui-se que determinado genótipo e fenótipo é associado a um determinada doença, e faz-se a caracterização dos genes responsáveis pelo desenvolvimento desta. Outra aplicação importante dos SNP é como marcadores em estudos farmacogenéticos e farmacogenómicos, em que estes são utilizados para se perceber até que ponto a presença de polimorfismos é um factor preditivo de alterações na resposta a fármacos, ou de aumento da sua toxicidade (S. Kim e Misra, 2007).

Em 2004 a FDA aprovou uma técnica para identificação de mutações nos genes que codificam para as enzimas de metabolização CYP2D6 e CYP2C19. O teste, designado de AmpliChip CYP Genotyping<sup>®</sup> combina a técnica de amplificação por PCR com a técnica de microarrays de DNA, Affymetrix GeneChip<sup>®</sup>, o que permite fazer uma análise rápida de múltiplos SNP (Koo et al., 2006).

Um dos métodos mais recentes é o Illumina's Human1M BeadChip<sup>®</sup>. Este método é considerado de alto rendimento pois alia as técnicas de hibridização, incorporação de nucleótidos e ligação para originar os produtos específicos dos alelos, seguindo-se uma amplificação por PCR (S. Kim e Misra, 2007). Este método é capaz de analisar, numa só amostra, 1.1 milhões de loci de SNP (Cheok et al., 2009).

Dentro dos métodos de detecção destaca-se o MALDI-TOF MS (Koo et al., 2006).

No que diz respeito aos métodos utilizados na detecção de polimorfismos, um dos maiores desafios é com toda a certeza a procura de novos métodos que não necessitem de serem antecedidos da realização de um PCR para amplificar as regiões pretendidas. Existem já algumas técnicas para sequenciação de apenas uma molécula de DNA, nas quais se destacam a sequenciação de nanoporos e a sequenciação por nanotubos de carbono. Uma vez que a genotipagem de SNP pode levar à identificação das causas genéticas que levam a que haja variabilidade na resposta a fármacos de indivíduo para indivíduo, o desenvolvimento de novas tecnologias de genotipagem deve ser tido em consideração no futuro, de modo a contribuir para o desenvolvimento da medicina personalizada, bem como de áreas que vão desde a medicina à biologia (S. Kim e Misra, 2007).



## **9 – Conclusão**

A leucemia é uma doença que afecta milhões de pessoas em todo o mundo, com uma incidência global e com manifestações e prognósticos variáveis de pessoa para pessoa. De acordo com o tipo de leucemia a que nos estejamos a referir, o diagnóstico, o tratamento e a resposta dos doentes será diferente. No entanto existem alguns aspectos em comum, como o facto de todos eles resultarem de uma proliferação descontrolada de células. Por outro lado, sabe-se que a origem de todos os tipos de leucemia poderá estar relacionada com a exposição a factores externos.

Cada tipo de leucemia apresenta formas e mecanismos de tratamento diferentes: o imatinib é considerado o fármaco de primeira linha no tratamento da leucemia mielóide crónica; o metotrexato é um dos fármacos mais utilizados na leucemia linfoblástica aguda; no tratamento da leucemia mielóide aguda destaca-se a acção da citarabina e por fim, relativamente à leucemia linfoblástica crónica, o esquema FCR é um dos mais utilizados como primeira linha no tratamento deste tipo de leucemia.

Todos estes fármacos enumerados, ao entrarem no nosso organismo, vão sofrer a acção de diversas enzimas pertencentes a vários grupos distintos. A sua metabolização pode ser levada a cabo por enzimas de fase I como as CYP, ou por enzimas de fase II como as GST. Para que possam atingir as células malignas e exercer a sua acção terapêutica, ou para serem eliminados, os fármacos necessitam de ser transportados, e esta função é da responsabilidade das proteínas transportadoras, como as pertencendo ao grupo ABC ou SLC, entre outras.

É possível então concluir que a existência de polimorfismos associados aos genes que codificam estas proteínas está intimamente relacionada com possíveis alterações verificadas na resposta que os doentes oferecem quando sujeitos a um determinado tipo de tratamento. Uma vez que estes polimorfismos alteram a metabolização, captação e eliminação dos fármacos mencionados, serão igualmente responsáveis pelo prognóstico que uma doença apresenta, ao nível da remissão da doença ou do tempo de sobrevivência dos doentes. Esta é uma premissa a ter em conta quando se pretender instituir uma terapêutica individualizada para uma determinada doença, de acordo com o genótipo e o perfil molecular de cada indivíduo.

Relativamente ao imatinib foi possível concluir que existem diversos polimorfismos responsáveis pela variação da resposta terapêutica, quer ao nível das

proteínas transportadoras quer ao nível das enzimas de metabolização. De acordo com alguns estudos realizados verificou-se que a maioria dos indivíduos que apresentam homozigotia para o alelo 1236T no gene ABCB1 atingem maior resposta terapêutica em comparação com os indivíduos que apresentassem outro genótipo, quando tratados com imatinib. Relativamente às enzimas de metabolização verificou-se que indivíduos que apresentassem polimorfismos na CYP3A5 (A6986G) e que tivessem o genótipo GG obtiveram uma menor resposta terapêutica, podendo-se assim concluir que estes polimorfismos, ao se traduzirem numa menor expressão da CYP3A5 promovem a acumulação de metabolitos tóxicos, dificultando a resposta terapêutica.

Em relação ao metotrexato como fármaco de primeira linha no tratamento da leucemia linfoblástica aguda, foi possível verificar que os polimorfismos que mais afectam a biodisponibilidade e a captação do fármaco por parte das células são os polimorfismos identificados nas enzimas intervenientes no ciclo dos folatos. Destes, destacam-se os polimorfismos no gene DHFR, que se provaram estar relacionados com o risco de recaída em doentes com ALL, e os polimorfismos do gene MTHFR, que leva a falhas no tratamento com o metotrexato.

A entrada do metotrexato nas células é feita essencialmente pela acção de dois transportadores diferentes. O RFC e o SLC01B1, e os polimorfismos associados a estes genes são responsáveis por uma menor afinidade do metotrexato para estes transportadores, verificando-se uma diminuição da sua captação por parte das células malignas.

As mutações na proteína tumoral TP53 encontram-se presentes em cerca de 50% de todos os cancros identificados e diagnosticados, e é um dos preditores mais decisivos na leucemia mielóide aguda. Este gene funciona como supressor tumoral e como activador do fenómeno de apoptose quando necessário. A perda de funcionalidade desta proteína está intimamente relacionada com a desregulação de todo o processo de supressão tumoral, constituindo um prognóstico muito pouco favorável nos casos de AML.

Um dos fármacos de primeira linha no tratamento da AML é a citarabina, e sabe-se que os polimorfismos nas enzimas DCK e CDA, que são responsáveis respectivamente pela sua activação e eliminação, poderão originar falhas na terapêutica e aumento da sua toxicidade.

Os principais biomarcadores preditivos da leucemia linfoblástica crónica são as mutações no gene IGHV, proteína TP53, SF3B1 e NOTCH1, bem como o estudo da

expressão de ZAP-70 e CD38, e todos eles estão relacionados com variações na resposta terapêutica. O melhor prognóstico de evolução da doença verifica-se quando existem mutações no gene IGHV.

Ao longo dos últimos anos o estudo da medicina sob um ponto e vista molecular trouxe grandes desenvolvimentos no entendimento das doenças. Os avanços na farmacogenética de enzimas metabolizadoras de fármacos, canais iónicos e transportadores, bem como o desenvolvimento de novas plataformas bioinformáticas permitiram importantes avanços naquilo que se quer que seja o futuro do tratamento oncológico: um diagnóstico personalizado e a implementação de uma terapêutica individualizada. O conhecimento do genótipo de cada paciente permite a optimização do regime de tratamento a instituir, e este novo paradigma no tratamento de doenças trará benefícios não só do ponto de vista clínico, mas também do ponto de vista social e económico (Koo e Lee, 2006).



**Bibliografia**

- Angelini, S., Soverini, S., Ravegnini, G., Barnett, M., Turrini, E., Thornquist, M., ... Martinelli, G. (2012). Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica*, 98(2), 193–200. doi:10.3324/haematol.2012.066480
- Aplenc, R., e Lange, B. (2004). Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 125(4), 421–434. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04932.x
- Ashavaid, T. F., Raghavan, R., Shah, S., Kapadia, A., Almel, S., e Desai, D. (2009). TPMT and DPD polymorphisms: Efficient screening method for Indian patients considering taking Thiopurine and 5-FU drugs. *Disease Markers*, 27(5), 231–238. doi:10.3233/DMA-2009-0668
- Baccarani, M., Pileri, S., Steegmann, J.-L., Muller, M., Soverini, S., e Dreyling, M. (2012). Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23 Suppl 7(August 2003), vii72–7. doi:10.1093/annonc/mds228
- Bazeos, a, Marin, D., Reid, a G., Gerrard, G., Milojkovic, D., May, P. C., ... Khorashad, J. S. (2010). hOCT1 transcript levels and single nucleotide polymorphisms as predictive factors for response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 24(6), 1243–5. doi:10.1038/leu.2010.86
- Benner, A., Mansouri, L., Rossi, D., Majid, A., Willander, K., Parker, A., ... Zenz, T. (2014). MDM2 promotor polymorphism and disease characteristics in chronic lymphocytic leukemia: results of an individual patient data-based meta-analysis. *Haematologica*, 99(8), 1285–91. doi:10.3324/haematol.2013.101170

- Brown, J. R. (2013). Inherited susceptibility to chronic lymphocytic leukemia: evidence and prospects for the future. *Therapeutic Advances in Hematology*, 4(4), 298–308. doi:10.1177/2040620713495639
- Carriço, M. K., e Gadelha, M. I. (2003). Alemtuzumab (Campath-1H) in chronic lymphocytic leukemia, 49(2), 121–125.
- Cheok, H. M., Pottier, N., Kager, L., e Evans, E. W. (2009). Pharmacogenetics in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin Hematol*, 46(1), 39–51. doi:10.1053/j.seminhematol.2008.09.002.Pharmacogenetics
- Chiabai, M. a., Lins, T. C. L., Pogue, R., e Pereira, R. W. (2012). Population analysis of pharmacogenetic polymorphisms related to acute lymphoblastic leukemia drug treatment. *Disease Markers*, 32(4), 247–253. doi:10.3233/DMA-2011-0884
- Chiorazzi, N. (2012). Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2012, 76–87. doi:10.1182/asheducation-2012.1.76
- Davies, S. S. M., Downing, J. R., e Nolan, G. P., (2006). Personalized Medicine : Are We There Yet ? Where We Began :, *American Society of Hematology* 111–117.
- Daraki, A., Zachaki, S., Koromila, T., Diamantopoulou, P., Pantelias, G. E., Sambani, C., ... Manola, K. N. (2014). The G 516 T CYP2B6 Germline Polymorphism Affects the Risk of Acute Myeloid Leukemia and Is Associated with Specific Chromosomal Abnormalities, 9(2). doi:10.1371/journal.pone.0088879
- De Deus, D. M. V., de Lima, E. L. S., Seabra Silva, R. M., Leite, E. P., e Cartaxo Muniz, M. T. (2012). Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T, A1298C, and G80A Polymorphisms on the Survival of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia Research and Treatment*, 2012, 1–6. doi:10.1155/2012/292043

- Deenen, M. J., Cats, A., Beijnen, J. H., e Schellens, J. H. M. (2011). Part 2: pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism. *The Oncologist*, 16(6), 820–34. doi:10.1634/theoncologist.2010-0259
- Deenik, W., van der Holt, B., Janssen, J. J. W. M., Chu, I. W. T., Valk, P. J. M., Ossenkoppele, G. J., ... Cornelissen, J. J. (2010). Polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1) predict for molecular resistance in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia receiving high-dose imatinib. *Blood*, 116(26), 6144–5; author reply 6145–6. doi:10.1182/blood-2010-07-296954
- Diamantopoulos, P. T., Sofotasiou, M., Papadopoulou, V., Polonyfi, K., Iliakis, T., e Viniou, N.-A. (2014). PARP1-Driven Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia. *BioMed Research International*, 2014, 106713. doi:10.1155/2014/106713
- Dorfman, R., Khayat, Z., Sieminowski, T., Golden, B., e Lyons, R. (2013). Application of personalized medicine to chronic disease: a feasibility assessment. *Clinical and Translational Medicine*, 2(1), 16. doi:10.1186/2001-1326-2-16
- Dulucq, S., Bouchet, S., Turcq, B., Lippert, E., Etienne, G., Reiffers, J., ... Mahon, F. X. (2008). Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 112(5), 2024–2027. doi:10.1182/blood-2008-03-147744
- Dulucq, S., e Krajinovic, M. (2010). The pharmacogenetics of imatinib. *Genome Medicine*, 2(11), 85.
- Dunna, N. R., Vure, S., Sailaja, K., Surekha, D., Raghunadharao, D., Rajappa, S., e Vishnupriya, S. (2012). TP53 Codon 72 Polymorphism and Risk of Acute Leukemia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(1), 347–350. doi:10.7314/APJCP.2012.13.1.349

- Eichhorst, B., Dreyling, M., Robak, T., Montserrat, E., e Hallek, M. (2011). Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 22 Suppl 6(Supplement 6), vi50–4. doi:10.1093/annonc/mdr377
- Ellis, N. a, Huo, D., Yildiz, O., Worrillow, L. J., Banerjee, M., Le Beau, M. M., ... Onel, K. (2008). MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility. *Blood*, 112(3), 741–9. doi:10.1182/blood-2007-11-126508
- Facts spring 2014. *Leukemia & Lymphoma Society* (2014). Consultado em 19-09-2014, disponível em <http://www.lls.org/content/nationalcontent/resourcecenter/freeeducationmaterials/generalcancer/pdf/facts.pdf>
- Fausel, C. (2007). Targeted chronic myeloid leukemia therapy: Seeking a cure. *American Journal of Health-System Pharmacy: AJHP: Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 64(24 Suppl 15), S9–15. doi:10.2146/ajhp070482
- Fey, M. F., e Buske, C. (2013). Acute myeloblastic leukaemias in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 24 Suppl 6(August), vi138–43. doi:10.1093/annonc/mdt320
- Forconi, F., Sozzi, E., Cencini, E., Zaja, F., Intermesoli, T., Stelitano, C., ... Lauria, F. (2009). Hairy cell leukemias with unmutated IGHV genes define the minor subset refractory to single-agent cladribine and with more aggressive behavior. *Blood*, 114(21), 4696–702. doi:10.1182/blood-2009-03-212449

- Fukushima, H., Fukushima, T., Sakai, A., Suzuki, R., Nakajima-Yamaguchi, R., Kobayashi, C., ... Sumazaki, R. (2013). Polymorphisms of MTHFR Associated with Higher Relapse/Death Ratio and Delayed Weekly MTX Administration in Pediatric Lymphoid Malignancies. *Leukemia Research and Treatment*, 2013(Figure 1), 238528.
- Gamazon, E. R., Lamba, J. K., Pounds, S., Stark, A. L., Wheeler, H. E., Cao, X., ... Dolan, M. E. (2013). Comprehensive genetic analysis of cytarabine sensitivity in a cell-based model identifies polymorphisms associated with outcome in AML patients, *121*(21), 4366–4376. doi:10.1182/blood-2012-10-464149.
- Gemmati, D., Ongaro, A., Scapoli, G. L., Porta, M. Della, Tognazzo, S., Serino, M. L., ... Mattei, M. De. (2004). Common Gene Polymorphisms in the Metabolic Folate and Methylation Pathway and the Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia and non-Hodgkin's Lymphoma in Adults Common Gene Polymorphisms in the Metabolic Folate and Methylation Pathway and the Risk of Acute L. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 13, 787–794.
- Gervasini, G., e Vagace, J. M. (2012). Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Genetics*, 3(November), 249. doi:10.3389/fgene.2012.00249
- Giannoudis, A., Wang, L., Jorgensen, A. L., Xinarianos, G., Davies, A., Pushpakom, S., ... Clark, R. E. (2013). The hOCT1 SNPs M420del and M408V alter imatinib uptake and M420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Blood*, 121(4), 628–637. doi:10.1182/blood-2012-01-405035
- Goldman, J. M., e Melo, J. V. (2003). Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *The New England Journal of Medicine*, 349(15), 1451–64. doi:10.1056/NEJMra020777

- Gómez-Gómez, Y., Organista-Nava, J., Saavedra-Herrera, M. V., Rivera-Ramírez, A. B., Terán-Porcayo, M. A., Del Carmen Alarcón-Romero, L., ... Leyva-Vázquez, M. A. (2012). Survival and risk of relapse of acute lymphoblastic leukemia in a Mexican population is affected by dihydrofolate reductase gene polymorphisms. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(4), 665–672. doi:10.3892/etm.2012.447
- Gonzalez de Castro, D., Clarke, P. a, Al-Lazikani, B., e Workman, P. (2013). Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 93(3), 252–9. doi:10.1038/clpt.2012.237
- Gregers, J. (2012). *Pharmacogenetic studies in childhood acute lymphoblastic leukaemia* (Tese de Doutorado). Linkoping University, Sweden.
- Johnson, G. G., Carr, D. F., Pirmohamed, M., e Pettitt, A. R. (2014). Pharmacogenetics in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: what does the future hold? *Pharmacogenomics*, 15, 897–900.
- Kim, D. H. D., Kong, J. H., Byeun, J. Y., Jung, C. W., Xu, W., Liu, X., ... Lipton, J. H. (2010). The IFNG (IFN-gamma) genotype predicts cytogenetic and molecular response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(21), 5339–50. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1638
- Kim, D. H. D., Sriharsha, L., Xu, W., Kamel-Reid, S., Liu, X., Siminovitch, K., ... Lipton, J. H. (2009). Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(14), 4750–8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0145

- Kim, D. H., Xu, W., Kamel-Reid, S., Liu, X., Jung, C. W., Kim, S., e Lipton, J. H. (2009). Clinical relevance of vascular endothelial growth factor (VEGFA) and VEGF receptor (VEGFR2) gene polymorphism on the treatment outcome following imatinib therapy. *Annals of Oncology*, 21(6), 1179–1188. doi:10.1093/annonc/mdp452
- Kim, S., e Misra, A. (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9, 289–320. doi:10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037
- Kishi, S., Cheng, C., French, D., Pei, D., Das, S., Cook, E. H., ... Relling, M. V. (2007). Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood*, 109(10), 4151–4157. doi:10.1182/blood-2006-10-054528
- Koo, S. H., Jon, E., e Lee, D. (2006). Frontiers in Research Review : Cutting-Edge Molecular Approaches to Therapeutics PHARMACOGENETICS APPROACH TO THERAPEUTICS, 450(December 2005), 525–532.
- Lamba K, J. (2010). Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics*, 46(10), 39–51. doi:10.2217/pgs.09.118.Genetic
- Landau, D. a, e Wu, C. J. (2013). Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics. *Genome Medicine*, 5(5), 47. doi:10.1186/gm451
- Laverdière, C., Chiasson, S., Costea, I., Moghrabi, A., e Krajinovic, M. (2002). Polymorphism G 80 A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 100(10), 3832–3834.
- Lee, W., Lockhart, a C., Kim, R. B., e Rothenberg, M. L. (2005). Cancer pharmacogenomics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. *The Oncologist*, 10(2), 104–11. doi:10.1634/theoncologist.10-2-104

- Leucemia linfática aguda - Leucemias - Secção 14 : Perturbações do sangue - Manual Merck para a Família. (2009). Consultado em 20-09-2014, disponível em <http://www.manualmerck.net/?id=183ecn=1440ess=>
- Liu, Y., Yin, Y., Sheng, Q., Lu, X., Wang, F., Lin, Z., ... Zhang, J. (2014). Association of ABCC2 -24C>T polymorphism with high-dose methotrexate plasma concentrations and toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS ONE*, 9(1), e82681. doi:10.1371/journal.pone.0082681
- Lozano-Santos, C., Martinez-Velasquez, J., Fernandez-Cuevas, B., Polo, N., Navarro, B., Millan, I., ... Gomez-Lozano, N. (2014). Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene polymorphisms have an impact on survival in a subgroup of indolent patients with chronic lymphocytic leukemia. *PloS One*, 9(6), e101063. doi:10.1371/journal.pone.0101063
- Miranda, N. P. J. N., Silva, A. J., Rosa, M. V., Alves, M. I., Afonso, D., Portugal, A. C., ... (INFARMED, C. a colaboração de N. O. (2013). Portugal: Doenças oncológicas em números - 2013. *Direcção Geral de Saúde*. Consultado em 09-09-2014, disponível em <http://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/portugal-doencas-oncologicas-em-numeros-2013.aspx>
- Mitra, A. K., Crews, K. R., Pounds, S., Cao, X., Feldberg, T., Ghodke, Y., ... Lamba, J. K. (2011). Genetic Variants in Cytosolic 5 J -Nucleotidase II Are Associated with Its Expression and Cytarabine Sensitivity in HapMap Cell Lines and in Patients with Acute Myeloid Leukemia □, 339(1), 9–23. doi:10.1124/jpet.111.182873.
- Mrózek, K., Marcucci, G., Paschka, P., Whitman, S. P., e Bloomfield, C. D. (2007). Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109(2), 431–48. doi:10.1182/blood-2006-06-001149
- Nambu, T., Hamada, A., Nakashima, R., Yuki, M., Kawaguchi, T., Mitsuya, H., e Saito, H. (2011). Association of SLCO1B3 polymorphism with intracellular accumulation of imatinib in leukocytes in patients with chronic myeloid leukemia. *Biological e Pharmaceutical Bulletin*, 34(1), 114–119.

- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Acute Lymphoblastic Leukemia. (2014). Consultado em 23-09-2014, disponível em [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/all.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/all.pdf)
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Acute Myeloid Leukemia. (2014). Consultado em 15-09-2014, disponível em [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/aml.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf)
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Chronic Myelogenous Leukemia. (2014). Consultado em 15-09-2014, disponível em [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/cml.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml.pdf)
- Niedzielska, E., Tompol-Weclawek, J., Kocjan-Matkowska, A., e Chybicka, A. (2013). The Influence of Genetic RFC1, MS and MTRR Polymorphisms on the Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia Relapse in Children and the Adverse Effects of Methotrexate, *1*, 579–584.
- Noguchi, K., Katayama, K., e Sugimoto, Y. (2014). Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, *7*, 53–64. doi:10.2147/PGPM.S38295
- Patten, P. E. M., Chu, C. C., Albesiano, E., Damle, R. N., Yan, X.-J., Kim, D., ... Chiorazzi, N. (2012). IGHV-unmutated and IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia cells produce activation-induced deaminase protein with a full range of biologic functions. *Blood*, *120*(24), 4802–11. doi:10.1182/blood-2012-08-449744
- Paugh, S. W., Stocco, G., e Evans, W. E. (2013). NIH Public Access, *22*(6), 703–710. doi:10.1097/MOP.0b013e32833fde85.Pharmacogenomics
- Pei-pei, X. U., Bao-an, C., Ji-feng, F., Lu, C., Guo-hua, X. I. A., Yu-feng, L. I., ... Schultz, M. (2012). Association of polymorphisms of cytosine arabinoside-metabolizing enzyme gene with therapeutic efficacy for acute myeloid leukemia, *125*(2010), 2137–2143. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.12.011

- Puumala, S. E., Ross, J. a, Aplenc, R., e Spector, L. G. (2013). Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. *Pediatric Blood e Cancer*, 60(5), 728–33. doi:10.1002/pbc.24464
- Qin, Y.-T., Zhang, Y., Wu, F., Su, Y., Lu, G.-N., e Wang, R.-S. (2014). Association between MTHFR polymorphisms and acute myeloid leukemia risk: a meta-analysis. *PLoS One*, 9(2), e88823. doi:10.1371/journal.pone.0088823
- Radtke, S., Zolk, O., Renner, B., Paulides, M., Zimmermann, M., Möricke, A., ... Langer, T. (2013). Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 121(26), 5145–53. doi:10.1182/blood-2013-01-480335
- Rajabli, N., Naeimi-Tabaie, M., Jahangirrad, A., Sedaghat, S.-M., Semnani, S., e Roshandel, G. (2013). Epidemiology of leukemia and multiple myeloma in Golestan, Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 14(4), 2333–6
- Ramsey, L. B., Bruun, G. H., Yang, W., Trevino, L. R., Vattathil, S., Scheet, P., ... Relling, M. V. (2012). Rare versus common variants in pharmacogenetics: SLCO1B1 variation and methotrexate disposition. *Genome Research*, 22(1), 1–8. doi:10.1101/gr.129668.111.22
- Rizzieri, D., e Moore, J. O. (2012). Implementation of management guidelines for chronic myeloid leukemia: perspectives in the United States. *P e T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 37(11), 640–648
- Rocha, J. C., Cheng, C., Liu, W., Kishi, S., Das, S., Cook, E. H., ... Relling, M. V. (2005). Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 105(12), 4752–4758. doi:10.1182/blood-2004-11-4544
- Rossi, D., Brusca, A., Spina, V., Rasi, S., Khiabani, H., Messina, M., ... Gaidano, G. (2011). Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*, 118(26), 6904–8. doi:10.1182/blood-2011-08-373159

- Sagatys, E. M., e Zhang, L. (2012). Clinical and laboratory prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Control : Journal of the Moffitt Cancer Center*, 19(1), 18–25
- Sailaja, K., Rao, D. N., Rao, D. R., e Vishnupriya, S. (2010). Analysis of CYP3A5\*3 and CYP3A5\*6 gene polymorphisms in Indian chronic myeloid leukemia patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 11(3), 781–784.
- Sekine, I., e Saijo, N. (2001). Polymorphisms of metabolizing enzymes and transporter proteins involved in the clearance of anticancer agents. *Annals of Oncology*, 12(11), 1515–1525.
- Seong, S. J., Lim, M., Sohn, S. K., Moon, J. H., Oh, S. J., Kim, B. S., ... Yoon, Y. R. (2013). Influence of enzyme and transporter polymorphisms on trough imatinib concentration and clinical response in chronic myeloid leukemia patients. *Annals of Oncology*, 24(3), 756–760. doi:10.1093/annonc/mds532
- Singh, O., Chan, J. Y., Lin, K., Heng, C. C. T., e Chowbay, B. (2012). SLC22A1-ABCB1 Haplotype Profiles Predict Imatinib Pharmacokinetics in Asian Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *PLoS ONE*, 7(12), e51771. doi:10.1371/journal.pone.0051771
- Tallman, M. S., Gilliland, D. G., e Rowe, J. M. (2005). Review in translational hematology Drug therapy for acute myeloid leukemia, 106(4), 1154–1163. doi:10.1182/blood-2005-01-0178.Reprints
- Tausch, E., Mertens, D., e Stilgenbauer, S. (2014). Advances in treating chronic lymphocytic leukemia. *F1000prime Reports*, 6(August), 65. doi:10.12703/P6-65
- Umamaheswaran, G., Kumar, D. K., e Adithan, C. (2014). Distribution of genetic polymorphisms of genes encoding drug metabolizing enzymes e drug transporters - a review with Indian perspective. *The Indian Journal of Medical Research*, 139(1), 27–65

- Understanding Leukemia. *Leukemia & Lymphoma Society* (2012). Consultado em 10-09-2014, disponível em <http://www.lls.org/content/nationalcontent/resourcecenter/freeeducationmaterials/leukemia/pdf/understandingleukemia.pdf>
- Wang, Y., Zhou, L., Dutreix, C., Leroy, E., Yin, Q., Sethuraman, V., ... Shen, Z. X. (2008). Effects of imatinib (Glivec) on the pharmacokinetics of metoprolol, a CYP2D6 substrate, in Chinese patients with chronic myelogenous leukaemia. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 65(6), 885–892. doi:10.1111/j.1365-2125.2008.03150.x
- Weinshilboum, R. (2001). THIOPURINE PHARMACOGENETICS : CLINICAL AND MOLECULAR STUDIES OF THYOPURINE METHYLTRANSFERASE, 29(4), 601–605.
- Weng, L., Zhang, L., Peng, Y., e Huang, S. (2013). Pharmacogenetics and pharmacogenomics: a bridge to individualized cancer therapy, 14(3), 315–324. doi:10.2217/pgs.12.213.Pharmacogenetics
- Willander, K., Dutta, R. K., Ungerbäck, J., Gunnarsson, R., Juliusson, G., Fredrikson, M., ... Söderkvist, P. (2013). NOTCH1 mutations influence survival in chronic lymphocytic leukemia patients. *BMC Cancer*, 13, 274. doi:10.1186/1471-2407-13-274
- Wróbel, T., Gębura, K., Wysoczańska, B., Jaźwiec, B., Dobrzyńska, O., Mazur, G., ... Bogunia-Kubik, K. (2014). IL-17F gene polymorphism is associated with susceptibility to acute myeloid leukemia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140(9), 1551–5. doi:10.1007/s00432-014-1674-7
- Wróbel, T., Mazur, G., Dzietczenia, J., Gebura, K., Kuliczkowski, K., e Bogunia-Kubik, K. (2013). VEGF and bFGF gene polymorphisms in Polish patients with B-CLL. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 30(1), 456. doi:10.1007/s12032-013-0456-4
- Yamamoto, M., e Figueiredo, V. L. P. (2005). Epidemiologia da leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica crônica familiar, 27(4), 229–232.

- Zeichner, S. B., Alghamdi, S., Elhammady, G., Poppiti, R. J., e Castellano-Sanchez, A. (2014). Prognostic Significance of TP53 Mutations and Single Nucleotide Polymorphisms in Acute Myeloid Leukemia: A case Series and Literature Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(4), 1603–1609. doi:10.7314/APJCP.2014.15.4.1603
- Zhou, L., Zhu, Y.-Y., Zhang, X.-D., Li, Y., e Liu, Z.-G. (2013). Risk effects of GST gene polymorphisms in patients with acute myeloid leukemia: a prospective study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 14(6), 3861–4



## **Anexos**

**Anexo I – Critérios de resposta em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica, de acordo com o ELN (2009) e o NCCN (2012) (Rizzieri e Moore, 2012).**

	<b>ELN Guidelines</b>	<b>NCCN Guidelines</b>
<b><i>Hematological Response</i></b>		
Complete (CHR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• WBC count &lt; 10x10<sup>9</sup>/L</li> <li>• Platelet count &lt; 450x10<sup>9</sup>/L</li> <li>• Differential: no immature granulocytes; basophils &lt;5%</li> <li>• Nonpalpable spleen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Complete normalization of peripheral blood counts with leukocyte count &lt; 10x10<sup>9</sup>/L</li> <li>• Platelet count &lt; 450x10<sup>9</sup>/L</li> <li>• No immature cells, such as myelocytes, promyelocytes, or blasts, in peripheral blood</li> <li>• No signs or symptoms of disease (e.g. no palpable splenomegaly)</li> </ul>
<b><i>Cytogenetic Response</i></b>		
None	>95% Ph+ metaphases	-
Minimal	66% to 95% Ph+ metaphases	-
Minor	36% to 65% Ph+ metaphases	>35% Ph+ metaphases <sup>a</sup>
Major	-	0% to 35% Ph+ metaphases <sup>a</sup> (complete + partial response)
Partial (PCyR)	1% to 35% ph+ metaphases	1% to 35% Ph+ metaphases <sup>a</sup>
Complete (CCyR)	No Ph+ metaphases <sup>b</sup>	No Ph+ metaphases <sup>a</sup>
<b><i>Molecular Response</i></b>		
Major (MMR)	Ratio of BCR-ABL1 to ABL (or other housekeeping genes) ≤0.1% on International Scale	≥3-log reduction in International Scale of BCR-ABL mRNA
Complete (CMR)	Undetectable BCR-ABL1 mRNA transcripts by real-time quantitative and/or nested PCR in two consecutive blood samples of adequate quality (sensitivity >10)	BCR-ABL1 mRNA undetectable by RT-PCR

CBC = complete blood count; mRNA = messenger RNA; Ph+ = Philadelphia chromosome-positive; PCR = polymerase chain reaction; RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction; WBC = white blood cell.

<sup>a</sup>A minimum of 20 metaphases should be examined.

<sup>b</sup>If marrow cell metaphases cannot be obtained or evaluated by chromosome banding analysis, the definition of CCyR may be based on interphase FISH of blood cells, provided that it is performed with BCR-ABL1 extrasignal, dual color, dual fusion, or in situ hybridization probes, and that at least 200 nuclei are scored. CCyR = < 1% BCR-ABL1-positive nuclei. In many studies, PCyRs and CCyRs are counted together and reported as major CyRs.

Adapted with permission from NCCN Guidelines for Chronic Myelogenous Leukemia.13

Additional data from O'Brien SG, et al. N Engl J Med 2003;348(11):994-1004;10 Baccarani M, et al. Best Pract Res Clin Haematol 2009;22(3):331-341;12

Hughes TP, et al. N Engl J Med 2003;349(15):1423-1432.22

**Anexo II – Recomendações para a monitorização e avaliação temporal dos pacientes com Leucemia Mielóide Crónica, de acordo com o ELN e o NCCN (Rizzieri e Moore, 2012).**

	ELN Guidelines		NCCN Guidelines	
	Assessment	Optimal Response	Assessment	Optimal Response
3 months	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hematology</li> <li>• qRT-PCR<sup>a</sup></li> <li>• Cytogenetics<sup>b</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CHR and at least mCyR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hematology</li> <li>• qRT-PCR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CHR</li> </ul>
6 months	<ul style="list-style-type: none"> <li>• qRT-PCR<sup>a</sup></li> <li>• Cytogenetics<sup>b,c</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• At least PCyR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• qRT-PCR</li> <li>• Cytogenetics<sup>e,f</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CCyR or PCyR</li> </ul>
12 months	<ul style="list-style-type: none"> <li>• qRT-PCR<sup>a</sup></li> <li>• Cytogenetics<sup>b,c</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CCyR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• qRT-PCR</li> <li>• Cytogenetics<sup>e,g</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CCyR</li> </ul>
18 months	<ul style="list-style-type: none"> <li>• qRT-PCR</li> <li>• Cytogenetics<sup>b,c</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MMR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• qRT-PCR</li> <li>• Cytogenetics<sup>e</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CCyR</li> </ul>

CHR = complete hematologic response; mCyR = minor cytogenetic response; CCyR = complete cytogenetic response; MMR = major molecular response; PCyR = partial cytogenetic response; qRT-PCR = quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

<sup>a</sup>Repeat every 3 months until MMR is confirmed, then every 6 months.

<sup>b</sup>Perform with chromosome banding analysis of marrow cell metaphases.

<sup>c</sup>Repeat every 6 months until a CCyR is confirmed, then every 12 months if no regular monitoring and always when myelodysplastic features, suboptimal response, or failure occurs.

<sup>d</sup>Repeat every 3 months. If a CCyR is achieved, repeat every 3 months for 3 years, then every 3 to 6 months.

<sup>e</sup>Perform on bone marrow.

<sup>f</sup>If no CCyR at 6 months, repeat cytogenetics at 12 months.

<sup>g</sup>If no CCyR at 12 months, repeat cytogenetics at 18 months.

Adapted with permission from the NCCN Guidelines for Chronic Myelogenous Leukemia.13

Additional data from Bacarani M, et al. Best Pract Res Clin Haematol 2009;22(3):331-341.12

**Anexo III – Definições de resposta do tratamento de primeira linha com o Imatinib na Leucemia Mielóide Crónica de fase crónica, de acordo com o ELN (Rizzieri e Moore, 2012).**

Evaluation Time	Response			
	<i>Optimal</i>	<i>Suboptimal</i>	<i>Failure</i>	<i>Warning</i>
Baseline	• NA	• NA	• NA	• High risk
3 months	• CHR and at least mCyR	• No cytogenetic response	• Less than CHR	• NA
6 months	• At least PCyR	• Less than PCyR	• No CyR	• NA
12 months	• CCyR	• PCyR	• Less than PCyR	• Less than MMRb
18 months	• MMR <sup>b</sup>	• Less than MMR <sup>b</sup>	• Less than CCyR	• NA
Any time during treatment	• Stable or improving MMR <sup>b</sup>	• Loss of MMR <sup>b</sup> • Mutations <sup>c</sup>	• Loss of CHR • Loss of CCyR • Mutations <sup>d</sup> • Positive for CCA/Ph	• Increase in transcript levels <sup>e</sup> • Negative for CCA/Ph

CCA = clonal chromosome abnormality; CCyR = complete cytogenetic response; CHR = complete hematological response; mCyR = minor cytogenetic response; MMR = major molecular response; NA = not applicable; PCyR = partial cytogenetic response; Ph = Philadelphia chromosome.

<sup>a</sup>CCA/Ph<sup>+</sup> is a warning factor at diagnosis, although its occurrence (i.e., clonal progression) during treatment is a marker of treatment failure. Two consecutive cytogenetic tests are required and must show the same CCA in at least two Ph<sup>+</sup> cells.

<sup>b</sup>MMR indicates a ratio of BCR–ABL1 to ABL1 or other housekeeping genes of  $\leq 0.1\%$  on the International Scale.

<sup>c</sup>BCR–ABL1 kinase domain mutations still sensitive to imatinib.

<sup>d</sup>BCR–ABL1 kinase domain mutations poorly sensitive to imatinib.

<sup>e</sup>The significance of the increase may vary by a factor of 2 to 10, depending on the laboratory. Data from Bacarani M, et al. Best Pract Res Clin Haematol 2009;22(3):331–341.12

**Anexo IV – Sítios da Internet com relevância em farmacogenética** (adaptado de Cheok et al., 2009).

<b>Nome</b>	<b>Sítio de Internet</b>
Human Genome Project (HGP)	<a href="http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/home.html">www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/home.html</a>
UCSC Genome Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>
The Sanger Institute	<a href="http://www.sanger.ac.uk/">www.sanger.ac.uk/</a>
Gene Expression Omnibus (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/">www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/</a>
dbSNP (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/">www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/</a>
International HapMap Project	<a href="http://snp.cshl.org/">snp.cshl.org/</a>
Weizmann Institute GeneCards	<a href="http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards/">bioinfo.weizmann.ac.il/cards/</a>
OMIM Catalog of Genetic Diseases	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim">www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim</a>
Glossary of Genetic Terms (NIH)	<a href="http://www.nhgri.nih.gov/DIR/VIP/Glossary">www.nhgri.nih.gov/DIR/VIP/Glossary</a>
RxList - The Internet Drug Index	<a href="http://www.rxlist.com/">www.rxlist.com/</a>
PCS Performance Drug List	<a href="http://www.druglist.com/">www.druglist.com/</a>
P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee	<a href="http://www.imm.ki.se/cypalleles/">www.imm.ki.se/cypalleles/</a>
PharmGKB: The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base	<a href="http://www.pharmgkb.org/">www.pharmgkb.org/</a>
NIGMS: Pharmacogenetics Research Network	<a href="http://www.nigms.nih.gov/Initiatives/PGRN">www.nigms.nih.gov/Initiatives/PGRN</a>
The Pharmacogenomics Journal	<a href="http://www.nature.com/tpj/index.html">www.nature.com/tpj/index.html</a>

**Anexo V - Resumo dos estudos de eficácia do tratamento com Imatinib e a sua relação com os variantes farmacocinéticos** (adaptado de Dulucq e Krajinovic, 2010).

<b>Genes</b>	<b>SNP (nº retirado do NCBI)</b>	<b>Base substituída</b>	<b>Nº Pacientes</b>	<b>Critério de resposta</b>	<b>Dose de Imatinib</b>	<b>Associação</b>
ABCB1	rs1128503	C1236T	90	MMR em 12 meses	400 mg	Elevada MMR com o alelo 1236T
ABCB1	rs1128503	C1236T	46	MMR e CMR em 12 meses	800 mg	Elevada MMR e CMR com o genótipo CC
ABCB1	rs2032582	G2677T/A	90	MMR em 12 meses	400 mg	Baixa MMR com o alelo 2677G
ABCB1	rs2032582	G2677T/A	46	MMR e CMR em 12 meses	800 mg	Baixa CMR com o genótipo TT
ABCB1	rs1045642	C3435T	90	MMR em 12 meses	400 mg	Não
ABCG2	rs2231142	C421A	229	CyR e MR de 1-5 anos	400, 600 ou 800 mg	Elevada CMR com o genótipo AA
ABCG2	rs2231137	G34A	229	CyR e MR de 1-5 anos	400, 600 ou 800 mg	Elevada CMR com o genótipo AA
SLC22A1	rs683369	C480G	229	CyR e MR de 1-5 anos	400, 600 ou 800 mg	Falha terapêutica com GG
SLC22A1	rs34130495	G1201A	132	—	—	MMR

**Anexo V** – Continuação.

CYP3A5	rs776746	A6986G	265	Resposta hematológica	400 mg	Baixa RH com GG
CYP3A5	rs776746	A6986G	229	CyR e MR de 1-5 anos	400, 600 ou 800 mg	Baixa MCyR e CCyR com AA

Anexo VI – Genótipo das enzimas DCK e CDA e a sua relação com a resposta ao tratamento nos pacientes com AML (Pei-pei et al., 2012).

