



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

Alython Araujo Chung Filho

Polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de antineoplásicos e associações de risco em leucemia linfoblástica aguda pediátrica

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

RIO DE JANEIRO

2019



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

ALYTHON ARAUJO CHUNG FILHO

Polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de antineoplásicos e associações de risco em leucemia linfoblástica aguda pediátrica

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

RIO DE JANEIRO

2019

ii

C559p Chung Filho, Alython Araújo.
Polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de antineoplásicos e associações de risco em leucemia linfoblástica aguda pediátrica / Alython Araújo Chung Filho. – Rio de Janeiro, 2019.
128 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

Orientadora: Maria do Socorro Pombo de Oliverira.

1. Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células T Precursoras.
2. Xenobióticos. 3. Polimorfismo genético. 4. Criança. I. Oliveira, Maria do Socorro Pombo de (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99419



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

ALYTHON ARAUJO CHUNG FILHO

**POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE
ANTINEOPLÁSICOS E ASSOCIAÇÕES DE RISCO EM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Aprovada em: 12/03/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr.	Luiz Claudio Santos Thuller
Profª. Dra.	Sheila Coelho Soares Lima
Profª. Dra.	Tatiana Almeida Simão
Profª. Dra.	Gabriela Villaça Chaves
Prof. Dr.	Luiz Fernando Lopes

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Maria do Socorro, pela oportunidade de fazer parte do PHOP, pela grande contribuição que tem em minha formação científica, por compartilhar conosco sua enorme sabedoria, e pela orientação sempre muito pertinente, que foi essencial para a realização desse trabalho.

A Gisele Brisson, que desde que cheguei no grupo, foi minha professora e anjo da guarda. Foi quem me ensinou a dar os primeiros passos no laboratório e na ciência, e foi essencial em minha formação. Mesmo agora, com o tempo consumido pelo trabalho, não deixou de dar sua importante contribuição para melhorar a qualidade dessa dissertação.

À Dra. Etel Gimba, que desde que começou a colaborar na execução desse estudo, não mediu esforços para que o trabalho se concretizasse. Foi essencial para rompermos qualquer barreira que aparecesse para a continuidade do estudo, e foi quem me ensinou tudo que sei sobre a técnica que usamos para a genotipagem.

À Vitória Carvalho, minha querida aluna de IC, que além de ter contribuído com as genotipagens para *GSTT1* e *GSTM1*, foi responsável por me manter sempre estimulado a realizar esse trabalho da melhor forma possível.

Aos integrantes e ex-integrantes do grupo, Filipe, Luisa, Ingrid, Daniela, Eugênia, Ingrid Koster, Paulo, Bruno, Gisele, Fran, Tállita, Elda, Valeska, Elissa e Ellen pelos momentos de descontração e pelos tantos ensinamentos ao longo dessa jornada.

A minha esposa Micaela Marques, que sempre foi meu porto seguro. Seu suporte foi essencial para a realização desse trabalho.

A meus pais e minha irmã, tão importantes na minha vida, que mesmo à distância nos últimos anos, me deram força para superar os desafios.

Aos amigos soteropolitanos, de quem estive fisicamente distante durante esse período, mas fazem parte daquilo que sou hoje.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Epidemiologia e biologia das leucemias linfoides.....	1
1.2. Contribuição de fatores endógenos e exógenos na etiopatogênese das leucemias linfoides.....	10
1.2.1. Folatos.....	10
1.2.2. Glicocorticoides.....	12
1.2.3. Vitamina D.....	16
1.2.4. Carcinógenos químicos.....	20
1.2.5. A eliminação de xenobióticos.....	21
1.3. Estudos de polimorfismos genéticos na patogênese das leucemias linfoides.....	24
1.3.1. MTHFR rs1801133.....	27
1.3.2. CRHR1 rs242941 e GLCCI1 rs37972.....	29
1.3.3 VDR rs1544410 e rs2228570.....	31
1.3.4. CYP3A5 rs776746.....	32
1.3.5. Deleções em GSTT1 e GSTM1.....	33
1.4. Hipóteses e justificativa do estudo.....	34

2. OBJETIVOS	37
2.1. Objetivo Geral	37
2.2. Objetivos específicos	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Desenho do estudo	38
3.2. Sujeitos do estudo	38
3.3. Extração do DNA	38
3.4. Genotipagens	39
3.4.1 Genotipagens por High resolution melting.....	39
3.4.2. Genotipagem de CYP3A5 rs776746 por polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição.....	42
3.4.3. Genotipagens para deleções de GSTM1 e GSTT1.....	43
3.5. Considerações éticas	45
3.6. Análises estatísticas	46
4. RESULTADOS	47
4.1. Características dos sujeitos	47
4.2. Associações entre genótipos e o risco para LLA	49
4.2.1. MTHFR rs1801133.....	50
4.2.2. CRHR1 rs242941 e GLCCI1 rs37972.....	51
4.2.3. VDR rs1544410 e VDR rs2228570.....	54
4.2.4. CYP3A5 rs776746 e deleções de GSTM1 e GSTT1.....	58
4.2.5. Combinações genotípicas e o risco para LLA.....	59
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	72

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
8. ANEXOS.....	94
8.1. ANEXO I – Lista de centros colaboradores.....	94
8.2. ANEXO II – Padrões de curva dos polimorfismos genotipados através de PCR-HRM.....	95
8.3. ANEXO III – Cartas de aprovação dos projetos pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.....	107
8.4. ANEXO IV – Análises detalhadas das associações entre os genótipos e o risco para LLA pediátrica.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Incidência de LLA no Brasil por idade.....	1
Figura 1.2. Distribuição etária das LLAs e alterações citogenéticas e moleculares mais frequentes em cada faixa etária.....	3
Figura 1.3. Esquema da história natural da LLA.....	7
Figura 1.4. Esquema do metabolismo dos folatos.....	11
Figura 1.5. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.....	13
Figura 1.6. Mecanismos genômicos da ação de glicocorticoides.....	14
Figura 1.7. Síntese e metabolismo da vitamina D.....	17
Figura 1.8. Mecanismos pelos quais a vitamina D pode atuar na leucemogênese.....	19
Figura 1.9. Eliminação de xenobióticos.....	23
Figura 1.10. Possível função de GLCCI1 na ação dos glicocorticoides.....	30
Figura 1.11. Esquema dos fatores que influenciam a leucemogênese.....	35
Figura 3.1. Exemplo de genotipagem por HRM.....	41
Figura 3.2. Gel de eletroforese para identificação de CYP3A5 rs776746.....	43
Figura 3.3. Gel de eletroforese para identificação de deleções em homozigose de GSTT1 e GSTM1.....	45
Figura 4.1. Associações entre o polimorfismo MTHFR rs1801133 e o risco para LLA de acordo com a cor de pele.....	50
Figura 4.2. Associações entre o polimorfismo GLCCI1 rs37972 e o risco para LLA em análise não estratificada.....	51
Figura 4.3. Associações entre o polimorfismo GLCCI1 rs37972 e o risco para LLA de acordo com o subtipo da doença.....	52
Figura 4.4. Associações entre o polimorfismo GLCCI1 rs37972 e o risco para LLA de acordo com a idade.....	53
Figura 4.5. Associações entre o polimorfismo VDR rs2228570 e o risco para LLA em análise não estratificada.....	54

Figura 4.6. Associações entre o polimorfismo VDR rs2228570 e o risco para LLA de acordo com o subtipo da doença.....	55
Figura 4.7. Associações entre o polimorfismo VDR rs2228570 e o risco para LLA de acordo com a idade.....	56
Figura 4.8. Associações entre o polimorfismo VDR rs2228570 e o risco para LLA de acordo sexo e cor de pele.....	57
Figura 4.9. Associações entre o genótipo GSTT1 nulo e o risco para LLA em análises geral e estratificadas.....	59
Figura 4.10. Associações entre combinações genotípicas dos polimorfismos rs2228570 e rs1544410 em VDR e o risco para LLA.....	60
Figura 4.11. Associações entre combinações genotípicas dos polimorfismos CYP3A5 rs 776746 e GSTT1 del e o risco para LLA.....	61
Figura 4.12. Associações entre combinações genotípicas dos polimorfismos GSTT1 del e GSTM1 del e o risco para LLA.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Características demográficas dos casos genotipados e não genotipados, Brasil, 2012-2015.....	47
Tabela 4.2. Características demográficas de casos e controles, Brasil, 2012-2015.....	48
Tabela 4.3. Frequências alélicas e equilíbrio segundo as leis de Hardy-Weinberg entre casos e controles, Brasil, 2012-2015.....	49
Tabela 8.1. Distribuições das freqüências genóticas e associações de riscos em em casos de leucemias linfoblásticas e controles, Brasil, 2012-2015.....	112
Tabela 8.2. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com o subtipo de LLA, Brasil, 2012-2015.....	114
Tabela 8.3. Análise de associações de risco dos genótipos de acordo com a cor de pele, Brasil, 2012-2015.....	117
Tabela 8.4. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com a idade Brasil, 2012-2015.....	120
Tabela 8.5. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com sexo, Brasil, 2012-2015.....	123
Tabela 8.6. Análise de associações de combinações genóticas com o risco para LLA, Brasil, 2012-2015.....	126

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Fatores prognósticos em LLA pediátrica.....	5
Quadro 1.2. Etapas do tratamento da LLA pediátrica.....	6
Quadro 1.3. Polimorfismos estudados.....	36
Quadro 3.1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de HRM.....	40
Quadro 3.2. Programação do termociclador utilizada nas reações de HRM.....	40
Quadro 3.3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para genotipagem de CYP3A5 rs776746.....	42
Quadro 3.4. Fragmentos formados pela digestão enzimática.....	43
Quadro 3.5. Oligonucleotídeos iniciadores para genotipagem de GSTM1 e GSTT1.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25-OHD	1-25-hidroxi-vitamina D
3'UTR	Região Não Traduzida 3'
ABC	ATP-binding Cassette
ACTH	Hormônio Corticotrófico
AP-1	Proteína Ativadora 1
ATG	Códons de início
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	Bcl2 Associated X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSCUP	Banco de Sangue de Cordão Umbilical e placentário
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cGR	Receptor de Glicocorticoides citoplasmático
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CRHR1	Receptor de Hormônio Liberador de Corticotrofina
CYP	Citocromo P450
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
ERG	Elementos Responsivos aos Glicocorticoides

EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
FoxO	Forkhead box O
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância
GLCCI1	Proteína Induzida por Glicocorticoides 1
GR	Receptor de Glicocorticoides
GREs	Elementos de ligação a glicocorticoides
GST	Glutathiona-S-transferase
GWAS	Estudo de Associação Genômica Ampla
<i>HeH</i>	Alta hiperdiploidia
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HRM	High resolution melting
I-BFM	International Berlin Frankfurt Münster
IC95%	Intervalo de Confiança de 95%
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGFBP3	Proteína Ligadora de IGF 3
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-cpB	Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B
LLA pro-B	Leucemia linfoblástica aguda de células progenitoras B
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras T
MAPK	Quinases Ativadas por Mitógenos
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mGR	Receptor de Glicocorticoides de membrana

mM	Milimolar
MS	Metionina sintase
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
NA	Não aplicável
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Fosfato Reduzida
NAT	N-acetiltransferase
NFkB	fator nuclear kappa-B
Nrf2	Fator Nuclear Eritroide 2
OR	Razão de chances
PB	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHOP	Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrico
Poli A	Poliadenosina
PXR	Receptor nuclear Pregnano X
RFLP	Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição
RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RXR	Receptor Retinoide X
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAMe	S-adenosil-metionina
SLC	Carreador de solutos
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
STAT5	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 5
SULTs	Sulfotransferases

TF	Fator de transcrição
TFREs	Elementos de ligação a fatores de transcrição
THF	Tetrahydrofolato
TOPO2	Topoisomerase 2
UGT	Glicuroniltransferases
VDR	Receptor de Vitamina D
VDRE	Elementos de resposta à vitamina D



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

**POLIMORFISMOS EM GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE
ANTINEOPLÁSICOS E ASSOCIAÇÕES DE RISCO EM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA**

RESUMO

Alython Araujo Chung Filho

Introdução: A leucemia linfoblástica aguda (LLA) corresponde a 75% de todas as leucemias agudas pediátricas. É uma doença de etiologia multifatorial, associada a fatores genéticos e ambientais. A exposição a carcinógenos químicos, baixa disponibilidade de folatos e possivelmente baixos níveis de glicocorticoides e vitamina D estão associados à leucemogênese, e polimorfismos em genes envolvidos nesses processos podem modificar o risco para a doença. Tivemos como objetivo principal verificar a associação entre polimorfismos envolvidos na eliminação de xenobióticos e em processos endógenos (*MTHFR* rs1801133, *CYP3A5* rs776746 *VDR* rs1544410, *VDR* rs2228570 *CRHR1* rs242941, *GLCCI1* rs37972 e deleções dos genes *GSTT1* e *GSTM1*) e o risco para LLA. **Material e métodos:** Foi realizado um estudo caso-controle em pacientes com até 19 anos (n=344), diagnosticadas com LLA entre 2012 e 2015. Os controles (n=358) foram amostras de sangue de cordão umbilical de crianças nascidas saudáveis. As genotipagens foram realizadas através dos métodos de *High resolution melting*, reação em cadeia da polimerase (PCR) - multiplex e PCR-polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição. Teste de qui-quadrado foi utilizado para comparar características demográficas de casos e controles e verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Regressão logística uni e multivariada foi utilizada para verificar as magnitudes de riscos. Foi calculada a odds ratio (OR) e o intervalo de confiança de 95% (IC95%), e considerado significativo, P-valor <0,05. As análises foram estratificadas por sexo, cor de pele, idade e subtipo de LLA. O efeito da combinação de genótipos também foi investigado. **Resultados:** Foram genotipadas 344 amostras de LLA e 358 controles, que estiveram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os polimorfismos. A variante *MTHFR* rs1801133 não foi associado à LLA em geral, mas apresentou efeitos distintos de acordo com a cor de pele. Entre brancos reduziu o risco no modelo recessivo (OR 0,51; IC95% 0,26-0,99), enquanto o genótipo TT apresentou valor próximo à significância para aumento de risco entre não brancos. *GLCCI1* rs37972 TT foi associado ao risco para LLA-cpB (OR 1,78; IC95% 1,04-3,06), efeito verificado principalmente na faixa etária ≤5 anos (OR 1,81; IC95% 1,00-3,28). *VDR* rs2228570 TT aumentou o risco para LLA em geral (OR 1,85; IC95% 1,07-3,20), para o subtipo LLA-cpB (OR 2,02; IC95% 1,14-3,56), entre crianças com idade >5 anos (OR 2,13 IC95% 1,10-4,12), entre não brancos (OR 2,32; IC95% 1,06-5,07) e no sexo feminino (OR 1,93; IC95% 1,19-3,15). A deleção de *GSTT1* foi associada a maior risco para LLA em geral (OR 2,04; IC95% 1,42-2,94), para LLA-cpB (OR 2,09; IC95% 1,45-3,02) e em todos os estratos demográficos. A combinação *CYP3A5* rs rs776746 com *GSTT1* del foi associada ao risco para LLA (OR 2,13; IC95% 1,09-4,16), e a deleção concomitante de *GSTT1* e *GSTM1* apresentou maior magnitude de risco (OR 2,41; IC95% 1,49-3,89) se comparada com a ocorrência isolada de *GSTT1* nulo. **Conclusão:** Polimorfismos em *MTHFR*, *GLCCI1*, *VDR*, *CYP3A5*, *GSTT1* e *GSTM1* influenciam o risco de desenvolver LLA. Esses achados contribuem para melhor compreensão dos fatores etiológicos da doença.

Palavras-chave: leucemia linfoblástica aguda, xenobióticos, processos endógenos polimorfismos genéticos.

GENETIC POLYMORPHISMS IN ANTINEOPLASTIC DRUGS
METABOLISM GENES AND RISK ASSOCIATIONS IN ACUTE
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

ABSTRACT

Alython Araujo Chung Filho

Background: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) accounts for 75% of all acute pediatric leukemias. ALL is a multifactorial disease associated with genetic and environmental factors. Exposure to chemical carcinogens, low folate availability and possibly low levels of glucocorticoids and vitamin D are associated with the leukemogenesis. Polymorphisms in genes involved in this process may modify ALL risk. We aimed to verify the risk association of polymorphisms involved in the elimination of xenobiotics and in endogenous processes (*MTHFR* rs1801133, *CYP3A5* rs776746 *VDR* rs1544410, *VDR* rs2228570 *CRHR1* rs242941, *GLCCI1* rs37972 and deletions of *GSTT1* and *GSTM1*) in ALL. **Material and Methods:** A case-control study was performed in patients up to 19 years of age (n = 344) diagnosed with ALL between 2012 and 2015. Controls (n = 358) were cord blood samples from healthy newborns. Genotyping was carried out using high resolution melting, multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) and PCR-restriction fragment length polymorphism. Chi-square test was used to compare demographic characteristics of cases and controls and to verify the Hardy-Weinberg equilibrium. Logistic regression was used to verify the risks associations. The odds ratio (OR) and the 95% confidence interval (95%CI) were calculated. The analyzes were stratified by sex, skin color, age and subtype of ALL. The effect of combining genotypes was also investigated. **Results:** Were genotyped 344 ALL samples and 358 control, which were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium for all polymorphisms. The *MTHFR* rs1801133 variant was not associated with ALL in general but showed distinct effects according to skin color. Among white children, reduced risk in the recessive model (OR 0.51; 95% CI 0.26-0.99), while the TT genotype presented a value close to the significance for increased risk among non-whites. *GLCCI1* rs37972 TT was associated with risk for ALL-cpB (OR 1.78; 95% CI 1.04-3.06), an effect verified mainly in the age group ≤ 5 years (OR 1.81; 95% CI 1.00 -3.28). *VDR* rs2228570 TT increased the risk for ALL in general (OR 1.85, 95% CI 1.07-3.20), for the ALL-BCP subtype (OR 2.02, 95% CI 1.14-3.56), among children aged > 5 years (OR 2.13 95% CI 1.10-4.12), non-white (OR 2.32, 95% CI 1.06-5.07), and female (OR 1.93, 95% CI 1.19-3.15). *GSTT1* deletion was associated with a greater risk for ALL in general (OR 2.04, 95% CI 1.42-2.94), for ALL-cpB (OR 2.09, 95% CI, 1.45-3, 02) and in all demographic strata. The *CYP3A5* rs776746 combined with *GSTT1* del was associated with the risk for ALL (OR 2.13; 95% CI 1.09-4.16), and the concomitant deletion of *GSTT1* and *GSTM1* presented a higher magnitude of risk (OR 2.41; 95% CI 1.49-3.89) compared to the isolated occurrence of null *GSTT1*. **Conclusion:** Polymorphisms in *MTHFR*, *GLCCI1*, *VDR*, *CYP3A5*, *GSTT1* and *GSTM1* influences the risk of ALL. These findings contribute to a better understanding the etiologic factors of ALL

Key-words: acute lymphoblastic leukemia, xenobiotics, genetic polymorphisms

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia e biologia das leucemias linfoides.

As leucemias correspondem a 25-35% de todos os cânceres entre crianças e adolescentes, sendo mais frequentes quanto maior o grau de desenvolvimento econômico do país. Entre crianças de até 19 anos, a taxa de incidência média por milhão de habitantes é de 40,9 em países de alto grau de desenvolvimento, enquanto os de médio e baixo apresentam respectivamente 36,5 e 16,4 (HOWARD *et al.*, 2008). No Brasil, estudos epidemiológicos de base populacional identificaram taxas de 53,3 casos por milhão entre crianças de até 14 anos de idade e de 61 casos por milhão na faixa etária de 0-5 anos (REIS *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2016).

Em pediatria, o subtipo mais frequente é a leucemia linfoblástica aguda (LLA), que corresponde a cerca de 75% dos casos (LINET *et al.*, 2016). A LLA apresenta um pico de incidência na faixa de 2-5 anos de idade, que é mais acentuado em países desenvolvidos. No Brasil, a maior incidência foi identificada entre o segundo e o quarto ano de vida, e um segundo pico ocorre aos 6 anos de idade (REIS *et al.*, 2011; STEWART; WILD, 2014) (Figura 1.1).

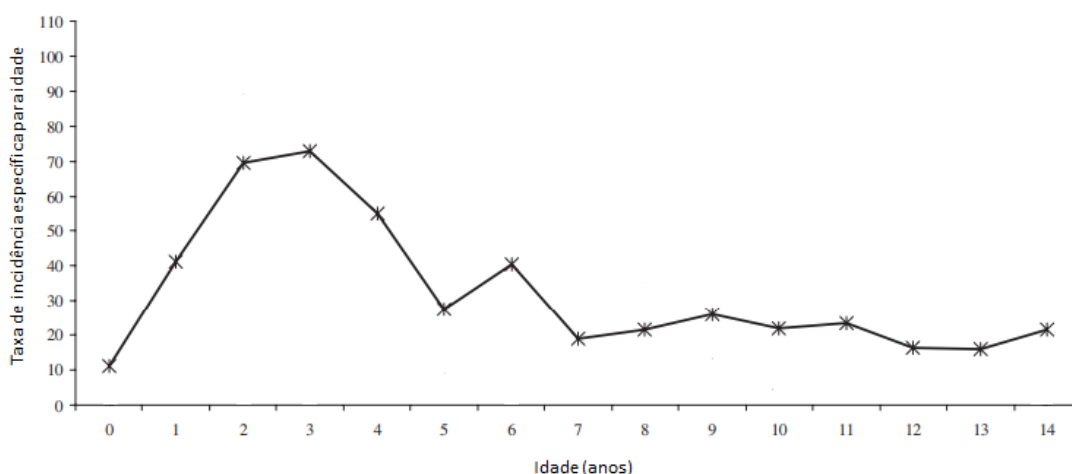


Figura 1.1. Incidência de LLA no Brasil por idade. Há um pico de incidência entre 2-4 anos de idade e um segundo pico aos 6 anos de idade. Adaptado de (REIS *et al.*, 2011).

Crianças do sexo masculino apresentam risco 20% maior de desenvolver LLA quando comparadas às do sexo feminino (SCHÜZ; ERDMANN, 2016). Uma recente análise em *pool* demonstrou que embora parte desse efeito seja indireto, mediado pelo maior peso ao nascer, que é um fator de risco para a doença, o sexo masculino aumentou o risco em 16%, independentemente do peso ao nascer. Esse fenômeno pode ter explicação genética, já que a ausência de um cromossomo X aumenta o risco de uma mutação em gene supressor de tumor situado nesse cromossomo manifestar-se fenotipicamente. Outra hipótese é que a menor resposta imune celular e humoral apresentada pelas crianças do sexo masculino facilite o desenvolvimento da doença (WILLIAMS *et al.*, 2018).

Grupos étnicos também apresentam diferentes incidências de LLA. Na população dos Estados Unidos, por exemplo, o grupo mais acometido é o de brancos de origem hispânica, seguidos pelos brancos não-hispânicos, descendentes de asiáticos e negros (LI *et al.*, 2008; LINET *et al.*, 2016; BARRINGTON-TRIMIS *et al.*, 2017). Em nível mundial, populações brancas de origem europeia apresentam as maiores taxas de incidência, enquanto que as asiáticas apresentam taxas intermediárias, e as africanas, as menores (LINET *et al.*, 2016).

Em populações da Europa e dos Estados Unidos, tem sido descrita uma tendência de aumento das taxas de incidência de LLA nas últimas quatro décadas, com variação anual de 0,8-1,2% (DALMASSO *et al.*, 2005; LINABERY; ROSS, 2008; BARRINGTON-TRIMIS *et al.*, 2017). Esse fato reflete a redução da exposição precoce a antígenos e do aleitamento materno, fatores protetores, e ao aumento da exposição a fatores de risco, como a exposição a carcinógenos químicos e a alimentação inadequada, que pode acarretar em alto peso ao nascer (GREAVES, 2017).

A LLA pode originar-se de células imaturas de ambas as linhagens linfocitárias (B e T), gerando doenças com características clínicas distintas. As LLAs de células precursoras B (LLA-cpB) são mais frequentes e são responsáveis pelo pico de incidência da LLA entre 2-5 anos de idade. Em maioria apresentam perfil citogenético-molecular de prognóstico favorável. A LLA de células precursoras T (LLA-T) é menos frequente (15% dos casos), e confere prognóstico desfavorável. Ambas as formas apresentam subtipos distintos quanto ao grau de diferenciação celular e às alterações moleculares associadas (GREAVES, 2018).

De acordo com a biologia da doença e com sua apresentação clínica, pode-se dividir as LLAs-cpB em três principais grupos: 1) LLA com rearranjos do gene *KMT2A*, característica de latentes (≤ 1 ano de idade); 2) LLA-cpB com Alta Hiperdiploidia (HeH) (≥ 51 cromossomos) ou fusão gênica *ETV6-RUNX1*, frequente entre crianças de 2-5 anos de idade; 3) um grupo biologicamente heterogêneo com diversas outras alterações moleculares, que em geral, afeta crianças com idades superiores a 9 anos ao diagnóstico (Figura 1.2) (SCHMIEGELOW *et al.*, 2008; GREAVES, 2018).

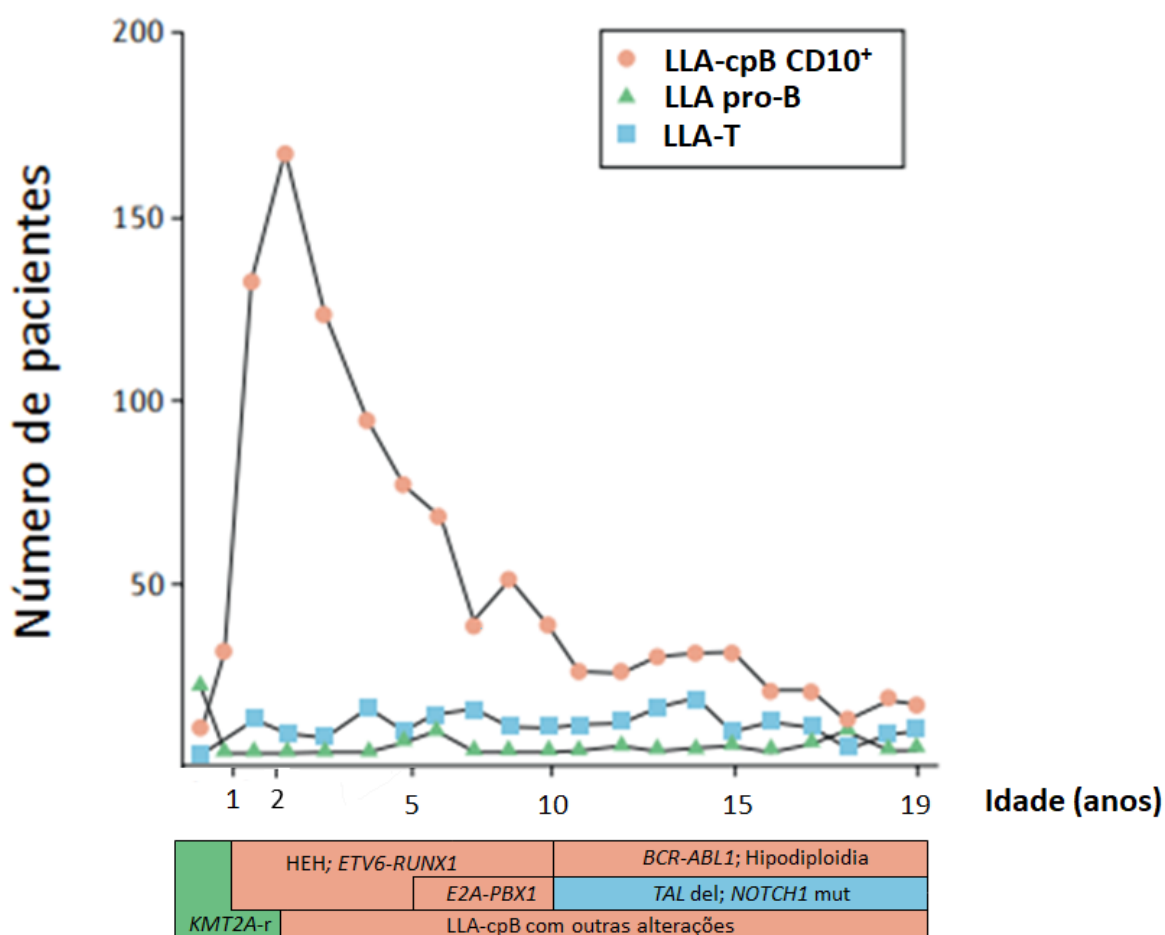


Figura 1.2. Distribuição etária das LLAs e alterações citogenéticas e moleculares mais frequentes em cada faixa etária. A LLA pró-B, com alta frequência de rearranjos de *KMT2A* é a mais incidente no primeiro ano de vida. Já a LLA pré-B com HeH e *ETV6-RUNX1*, tem um pico de incidência entre 2-5 anos de idade, mas continua frequente até os 10 anos de idade. Após o décimo ano de vida, tornam-se mais comuns os casos de LLA-T e LLA pré-B com outras alterações, como *BCR-ABL1* e hipodiploidia. Adaptado de (GREAVES, 2018).

Os rearranjos do gene *KMT2A* estão presentes em apenas 5% de todas as LLAs, porém, 80% das LLAs de lactentes apresentam essa alteração. A LLA do lactente afeta células que não expressam o marcador de linhagem linfocitária CD10 e pode apresentar expressão aberrante de marcadores mieloides, o que indica que a doença seja originada por células progenitoras, ainda não completamente comprometidas com a linhagem linfocítica. A LLA de lactentes é clinicamente caracterizada por alta leucometria, hepato-esplenomegalia, nódulos tumorais em pele e acometimento do sistema nervoso. Tais características conferem a esse grupo um prognóstico adverso, com sobrevida em cinco anos de cerca de 41% (POMBO-DE-OLIVEIRA; ANDRADE, 2017; BROWN *et al.*, 2019).

As LLAs de crianças entre dois e dez anos é majoritariamente caracterizada pelo imunofenótipo pré-B, com expressão dos marcadores CD10 e CD19. Essas células apresentam alterações citogenéticas e moleculares que impedem sua diferenciação para células B maduras. Entre essas alterações, as mais frequentes são a HeH, presente em cerca de um terço das LLAs, e a fusão gênica *ETV6-RUNX1* (25%). Esse grupo é caracterizado por boa resposta ao tratamento e apresenta taxas de sobrevida global em cinco anos próxima a 90% (PUI *et al.*, 2011; NIGRO, 2013).

Há um grupo heterogêneo de LLAs-cpB que em geral afeta crianças com idade superior a 10 anos, mas está presente minoritariamente em crianças mais jovens. Esse grupo inclui a LLA com fusão gênica *E2A-PBX1*, presente em 5% dos casos, associada a maior risco de recaída em sistema nervoso central. A hipodiploidia (<44 cromossomos) é característica dos casos associados à síndrome de Li-Fraumeni, causada por mutações constitutivas em *TP53* e confere mau prognóstico. Os casos com fusão gênica *BCR-ABL1* correspondem a 2-4% das LLAs, e embora sejam resistentes ao tratamento convencional, respondem à terapia alvo com o inibidor de tirosina-quinase imatinibe. Um grupo fenotipicamente semelhante ao *BCR-ABL* positivo, porém sem a translocação, foi recentemente identificado. Esse grupo é caracterizado por alta frequência de mutações no gene *IKZF1* e em genes que codificam receptores tirosina-quinase, como o *CRLF2*, ou que participam das vias de sinalização celular por JAK-STAT e Ras (PUI *et al.*, 2011; NIGRO, 2013; IACOBUCCI; MULLIGHAN, 2017).

A LLA-T é classificada em quatro subtipos de acordo com o grau de diferenciação celular identificado através do perfil imunofenotípico: 1) pró-T; 2) pré-T;

3) T cortical; e 4) T medular. Recentemente, um subtipo originado de células mais imaturas (*early-T*), clinicamente mais agressivo, foi identificado. As translocações mais frequentemente identificadas em LLA-T envolvem um gene que codifica o receptor de células T e outro, para fatores de transcrição envolvidos na diferenciação dessas células. Essa doença apresenta maior risco de recaída e menor sobrevida global em cinco anos (cerca de 70%), se comparada à LLA-cpB (IACOBUCCI; MULLIGHAN, 2017; KARRMAN; JOHANSSON, 2017).

Desde a década de 1970, quando a sobrevida dos pacientes era inferior a 50%, houve importante progresso no tratamento da LLA. Atualmente em países desenvolvidos, 98% dos pacientes com LLA entram em remissão, 15 a 20% apresentam recaídas e a sobrevida global em cinco anos se aproxima de 90%. Tal melhora está relacionada com avanços científicos incorporados aos esquemas terapêuticos, como a utilização de poliquimioterapia, a inclusão dos glicocorticoides, o tratamento profilático para o sistema nervoso central, e a alteração da intensidade do tratamento conforme uma estratificação de risco, que leva em consideração fatores prognósticos como idade, leucometria, doença residual mínima e características imunofenótípicas e citogenético-moleculares (Quadro 1.1) (DE CAMARGO *et al.*, 2008; VROOMAN; SILVERMAN, 2016; PDQ, 2019).

Quadro 1.1. Fatores prognósticos em LLA pediátrica.

	Favorável	Desfavorável
Idade ao diagnóstico	1 a <10 anos	<1 ou ≥10 anos
Leucometria (células por mm³)	< 50.000	≥50.000 ou ≥300.000 para lactentes
Imunofenótipo	LLA-cpB	LLA-T
Alterações citogenético-moleculares	Alta hiperdiploidia <i>ETV6-RUNX1</i>	<i>BCR-ABL1</i> Hipodiploidia Rearranjos de <i>KMT2A</i> Deleções em <i>IKZF1</i>
Doença residual mínima ao final da indução	Indetectável ou baixa	Alta

Adaptado de (VROOMAN; SILVERMAN, 2016)

O tratamento da LLA compreende três etapas principais: indução, consolidação e manutenção. A indução dura entre quatro e seis semanas e consiste no uso de glicocorticoides, vincristina e L-asparaginase, podendo também incluir antraciclinas (daunorrubicina ou doxorubicina). A profilaxia do sistema nervoso central é realizada com aplicação intratecal do antifolato metotrexato. Essa etapa tem como objetivo induzir remissão completa da doença, e em 95% dos casos, seu objetivo é alcançado. A indução é seguida pela consolidação, com duração de seis a nove meses, que tem como objetivo eliminar doença residual submicroscópica. Para minimizar o risco de resistência aos fármacos utilizados na indução e maximizar a sinergia, essa etapa inclui fármacos como mercaptopurina, tioguanina, metotrexato, ciclofosfamida, etoposídeo e citarabina. A terceira etapa é mais longa, porém menos intensa e visa reduzir o risco de recidiva da doença. Essa etapa consiste na administração dos antimetabólitos metotrexato e mercaptopurina por um período mínimo de dois anos (Quadro 1.2) (COOPER; BROWN, 2015; PDQ, 2019).

Quadro 1.2. Etapas do tratamento da LLA pediátrica.

	Duração	Fármacos utilizados
Indução	4 semanas	Glicocorticoides, vincristina e L-asparaginase
Consolidação	6-9 meses	Mercaptopurina, tioguanina, vincristina, metotrexato, ciclofosfamida, etoposídeo e citarabina
Manutenção	2-3 anos	Mercaptopurina e metotrexato

(COOPER; BROWN, 2015)

As hipóteses para a etiologia da LLA pediátrica se baseiam no fato de que tanto as LLAs com rearranjos do gene *KMT2A*, quanto o grupo mais frequente, com *ETV6-RUNX1* e HeH, apresentam alterações moleculares originadas durante a vida intrauterina. As evidências de que essas doenças sejam iniciadas no útero são: 1) gêmeos monócônicos apresentam LLA com a mesma origem clonal, embora possam apresentar distintas alterações secundárias; 2) alterações moleculares idênticas às observadas ao diagnóstico de LLA foram identificadas em amostras coletadas ao nascimento (sangue seco em papel de filtro); 3) rastreamento molecular de sangue de cordão de recém-nascidos saudáveis encontrou fusões gênicas

características das LLAs (GALE *et al.*, 1997; MORI *et al.*, 2002; GREAVES, 2003; GREAVES; WIEMELS, 2003).

Embora essas alterações cromossômicas sejam necessárias para a leucemogênese, elas não são suficientes para causar a doença. Cerca de 1% da população apresenta clones pré-leucêmicos ao nascimento, embora apenas uma minoria desenvolva a doença. É necessária a aquisição de mutações secundárias para o desenvolvimento da LLA, e há evidências de que essas mutações são adquiridas após o nascimento. Gêmeos monócoriônicos que apresentam LLA têm alterações cromossômicas idênticas, o que indica que o clone pré-leucêmico foi compartilhado durante a vida intrauterina por transfusão placentária. As alterações secundárias, no entanto, são diferentes. Esses achados indicam que fatores relacionados à vida materna contribuem com a aquisição das primeiras alterações moleculares, enquanto que as exposições pós-natais contribuem para a aquisição de alterações adicionais (Figura 1.3) (HUNGER; MULLIGAHN, 2015; GREAVES, 2018).

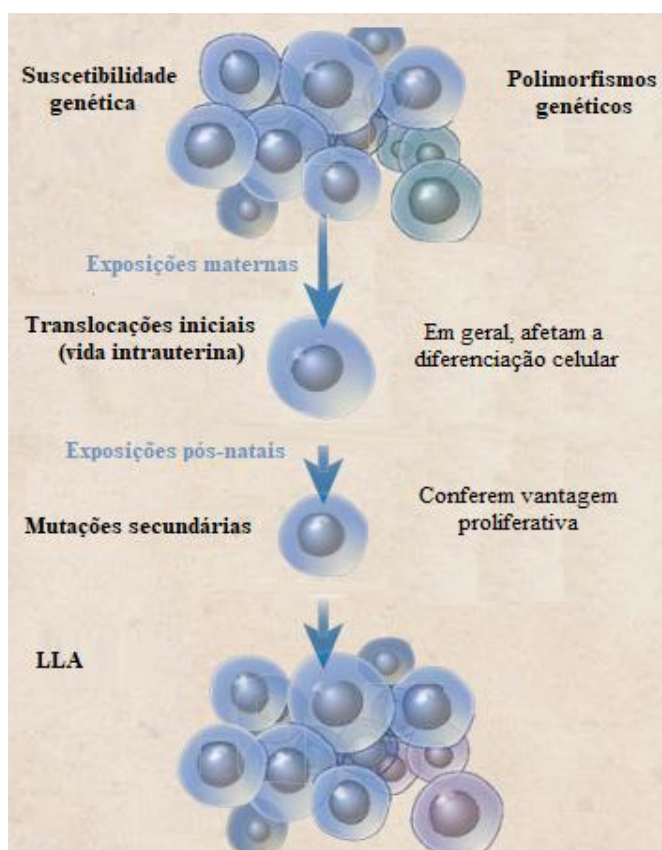


Figura 1.3. Esquema da história natural da LLA. A ocorrência da primeira alteração leucemogênica, durante a vida intrauterina, sofre influência das exposições ambientais maternas. Após o nascimento podem ocorrer mutações secundárias que

conferem vantagem proliferativa, ocasionando a doença. Ambas as etapas são influenciadas pela suscetibilidade genética da criança. Adaptado de (HUNGER; MULLIGAHN, 2015).

As LLAs com rearranjo do gene *KMT2A* e com *ETV6-RUNX1* ou HeH se diferenciam pelo tempo necessário para que a doença se manifeste, embora ambos os grupos tenham origem na vida intrauterina. Esse fato pode refletir o número de mutações adicionais necessárias à leucemogênese. Também indica que as doenças apresentem distintos fatores etiológicos (HUNGER; MULLIGAHN, 2015).

A LLA com rearranjo de *KMT2A* tem sido associada principalmente à exposição materna a substâncias com atividade inibidora de topoisomerase 2 (TOPO2), como anticoncepcionais estrogênicos e alguns polifenóis presentes em alimentos, como catequinas, quercetina e genisteína. A TOPO2 catalisa uma clivagem transitória da dupla-fita de Ácido Desoxirribonucléico (DNA), e sua posterior religação. Os inibidores de TOPO2 estabilizam a enzima junto às duplas-fitas clivadas e impedem a religação. A exposição das extremidades livres de DNA ativa mecanismos de reparo que podem resultar em translocações (POMBO-DE-OLIVEIRA, 2018).

A etiologia da LLA com *ETV6-RUNX1* ou HeH envolve fatores associados à vida intrauterina e à pós-natal. Um desses fatores é a ativação do sistema imune através da exposição a infecções. A falta de exposição a micro-organismos em períodos precoces da vida acarreta em um desenvolvimento alterado do sistema imune, com reações exacerbadas a infecções em períodos posteriores, com alta proliferação de células da linhagem linfóide. Sendo assim, as infecções têm um papel dúbio na leucemogênese. Em idade precoce, contribuem para o desenvolvimento do sistema imune, enquanto que a exposição tardia pode servir como gatilho para o desenvolvimento da doença (WILLS-KARP *et al.*, 2001; GREAVES, 2018). Fatores associados à elevada ativação da via do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF), como o alto peso ao nascer, a substituição do aleitamento materno por fórmulas infantis e a introdução tardia de alimentos sólidos, estão associados ao aumento do risco para esse grupo de LLAs (TOWER; SPECTOR *et al.*, 2007; SCHRAW *et al.*, 2014; GROVES *et al.*, 2018;).

Uma pequena parcela das LLAs é associada à predisposição genética. Algumas síndromes que acarretam em outras manifestações clínicas aumentam o

risco para a doença, como nos casos das síndromes de Down, Li-Fraumeni, Turcot, ataxia telangiectasia, quebras de Nijmegen, e trombocitopenia tipo 5. Outros casos de leucemias familiares têm na LLA a única manifestação, como é o caso das mutações constitutivas em *PAX5* (MCREYNOLDS; SAVAGE, 2017).

A exposição à radiação ionizante é o fator ambiental associado ao risco para LLA com maior evidência de relação causal. O efeito é dependente da dose e da duração da exposição. Esse fenômeno foi primeiramente descrito entre sobreviventes à explosão de bombas atômicas nas cidades japonesas de Hiroshima e Nagasaki, entre os quais a incidência de leucemias aumentou em 20 vezes. Estudos com sobreviventes ao acidente nuclear de Chernobyl e com populações residentes de proximidades de usinas nucleares confirmaram a associação. A radiação exerce efeito leucemogênico tanto se a criança for exposta durante a vida intrauterina quanto se for após o nascimento (BELSON *et al.*, 2006; FINCH, 2007; JIN *et al.*, 2016). Além dos acidentes nucleares e bombas atômicas, a exposição a exames de imagem durante a gestação também é associada ao risco para LLA (SHU *et al.*, 2002).

Juntos, os casos associados a predisposição genética e a exposição à radiação ionizante são responsáveis por cerca de cinco por cento das LLAs. Os demais apresentam etiologia multifatorial, associada a fatores genéticos e ambientais que interagem na determinação do risco. Alguns dos fatores bem elucidados são os que interferem na disponibilidade de folatos e na carcinogênese química (WHITEHEAD *et al.*, 2016). Os próximos capítulos abordarão esses temas, além dos possíveis papéis da vitamina D e dos glicocorticoides endógenos na leucemogênese.

1.2. Contribuição de fatores endógenos e exógenos na etiopatogênese das leucemias linfoides.

1.2.1. Folatos

O termo “folatos” compreende diversas substâncias que compartilham entre si semelhanças químicas: um anel pteridínico ligado a um ácido para-aminobenzóico e uma cauda de poli-glutamato. São substâncias naturalmente presentes em alimentos que exercem função essencial como cofatores em reações de metilação (DUCKER e RABINOWITZ, 2017). São vitaminas hidrossolúveis integrantes do “complexo B”, cujas principais fontes naturais são vegetais folhosos, leguminosas e cereais integrais. Por ser comum a baixa ingestão das fontes naturais, muitos países adotam políticas de fortificação de farinhas de cereais com ácido fólico, uma forma sintética e mais biodisponível de folato. No Brasil, a fortificação teve início no ano de 2004 e a prevalência de deficiência desse nutriente caiu de 6,2% para 1,76% (BARNABÉ *et al.*, 2015; FERTRIN, 2018).

O folato participa de três processos bioquímicos principais: 1) a síntese de metionina a partir de homocisteína, na forma de 5-metiltetrahydrofolato 2) a síntese de timidilato, na forma de 5-10-metileno-tetrahydrofolato; e 3) a síntese de purinas, como 10-formil-tetrahydrofolato. A metionina é precursora de S-adenosil-metionina (SAMe), doadora universal de radicais metil, que é requerida inclusive na metilação de DNA. Já timidilato é precursor da base nitrogenada timina, que assim como as purinas, compõe o DNA. Tanto a síntese de bases nitrogenadas quanto a metilação de DNA são processos envolvidos na leucemogênese (CANTARELLA *et al.*, 2017; DUCKER; RABINOWITZ, 2017). A Figura 1.4 esquematiza o metabolismo dos folatos.

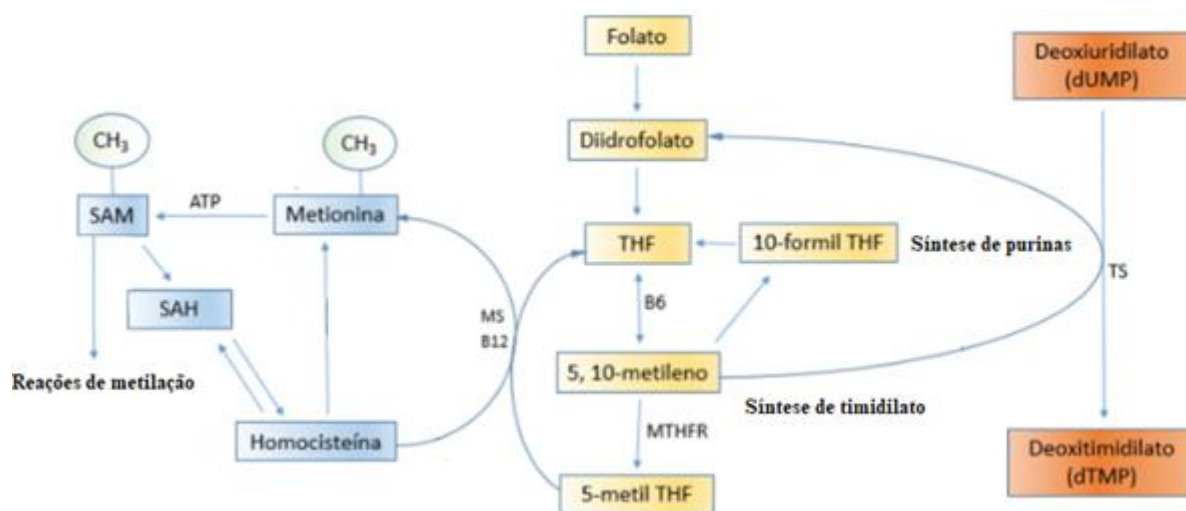


Figura 1.4. Esquema do metabolismo dos folatos. O folato apresenta três formas ativas, sendo que 5,10-metilenotetrahidrofolato atua na síntese de timidilato e pode ser convertido pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), a 5-metil-tetrahidrofolato, que por sua vez, atua na conversão de homocisteína a metionina, precursora de S-adenosilmetionina, essencial para a maioria das reações de metilação. A forma 5,10-metilenotetrahidrofolato também pode ser convertida a 10-formil tetrahidrofolato, que é importante para a síntese de purinas. CH₃, grupamento metil; SAH, S-adenosil-homocisteína; SAM, S-adenosil-metionina; ATP, adenosina trifosfato; MS, metionina sintase; THF, tetrahidrofolato; MTHFR, metilenotetrahidrofolato redutase. Adaptado de (LAMPRECT; LIPKIN, 2003).

Reduzida disponibilidade de bases nitrogenadas é a principal causa de instabilidade genômica induzida por oncogenes, e esse efeito pode ser gerado por deficiência de folato (AIRD *et al.*, 2013). Além disso, a baixa disponibilidade de timina, especificamente, aumenta a incorporação de uracila no DNA, e por consequência, a frequência de mutações pontuais, quebras de fita simples e dupla, e formação de micronúcleos, gerando alterações gênicas e cromossômicas (FENECH *et al.*, 2012).

Por outro lado, SAMe é fundamental para a regulação da expressão gênica através da metilação de DNA e histonas (CANTARELLA *et al.*, 2017). A metilação de DNA é fundamental para o silenciamento de elementos transponíveis de origem retroviral, e por consequência, para a manutenção da estabilidade do genoma. Além disso, a metilação de regiões promotoras é uma importante forma de regulação da expressão gênica (CRIDER *et al.*, 2012; MOORE *et al.*, 2012).

A deficiência de folato e outros nutrientes relacionados ao metabolismo de um carbono altera o padrão de metilação global e de sítios específicos, podendo gerar

hipometilação global, hipometilação de regiões promotoras de oncogenes e hipermetilação de genes supressores de tumor (CRIDER *et al.*, 2012; CHANG *et al.*, 2013). A vida intrauterina é o período de maior vulnerabilidade às alterações do padrão de metilação do DNA, pois após a fertilização, todo o padrão de metilação herdado dos pais é apagado e reestabelecido posteriormente (MONK, 2015).

A baixa ingestão materna de frutas e hortaliças, fontes naturais de folato foi associada ao risco para LLA em quatro estudos caso-controle (JENSEN *et al.*, 2004; PETRIDOU *et al.*, 2005; SPECTOR *et al.*, 2005; KWAN *et al.*, 2009; ABRI *et al.*, 2016). Uma análise em pool dos dados de 20 estudos caso-controle verificou que a suplementação com ácido fólico durante a gestação foi associada à redução do risco para a doença (METAYER *et al.*, 2014). A maior ingestão durante a gestação de folato e outros nutrientes envolvidos no metabolismo de um carbono, com as vitaminas B2, B6 e B12, via alimentos e suplementos, também já foi descrita como fator protetor para LLA (BAILEY *et al.*, 2012; SINGER *et al.*, 2016). O papel da ingestão de folato paterna e da criança foi investigado por apenas um estudo cada, que não mostraram associação com o risco para a doença (DOCKERTY *et al.*, 2007; BAILEY *et al.*, 2014a).

1.2.2. Glicocorticoides

Glicocorticoides endógenos (cortisol e cortisona) são hormônios esteroides, derivados do colesterol, produzidos pelo córtex da glândula supra-renal em resposta ao estresse. Entre as duas formas endógenas, o cortisol é o mais ativo, e tem como principais funções a manutenção da glicemia em níveis fisiológicos durante o jejum e minimizar os efeitos inflamatórios causados por traumas ou infecções. Sua secreção segue um ritmo circadiano, com maior liberação pela manhã e menor à noite (GULLIVER, 2017).

A secreção de glicocorticoides é regulada pelo eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA). O hipotálamo secreta Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH), que interage com o Receptor de CRH (CRHR1) na hipófise anterior e induz a secreção de Hormônio Corticotrófico (ACTH). O ACTH, no córtex da supra-renal, induz a secreção de cortisol, que por mecanismo de retroalimentação negativa, inibe a liberação de CRH pelo hipotálamo (Figura 1.5) (DUONG-THI-LY *et al.*, 2017; MORSI *et al.*, 2018).

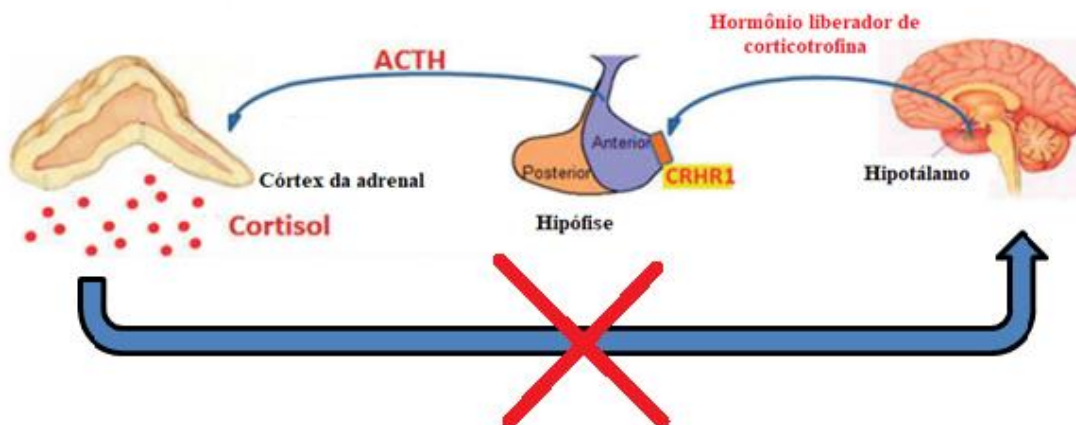


Figura 1.5. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. O hipotálamo secreta hormônio liberador de corticotrofina, que atua na hipófise, sinalizando para a secreção de hormônio corticotrófico, que por sua vez estimula a secreção de cortisol na glândula suprarrenal. O próprio cortisol é capaz de inibir as etapas anteriores em um mecanismo de retroalimentação negativa. Adaptado de (DUONG-THI-LY et al, 2017).

O mecanismo de ação dos glicocorticoides é mediado por quatro processos: a) mecanismo genômico clássico desencadeado pela ativação do Receptor de Glicocorticoides (GR) citoplasmático (cGR); b) mecanismo não genômico por ativação de cGR); c) ativação de receptor de GR de membrana (mGR); e d) mecanismo não genômico e não mediado por GR (BUTTGEREIT *et al.*, 2011).

Entre esses mecanismos, o mais bem conhecido é o genômico clássico, em que o glicocorticoide ativa cGR, codificado pelo gene *NR3C1*. O complexo glicocorticoide-cGR interage com sequências específicas do DNA denominadas Elementos Responsivos aos Glicocorticoides (ERG). A interação com ERGs positivos acarreta em transativação. Esse é o mecanismo pelo qual glicocorticoides induzem a síntese de proteínas anti-inflamatórias como a interleucina 10, o inibidor do fator nuclear kappa-B (NFkB) e a anexina A1. A interação com ERGs negativos, leva a transrepressão. Esse é o caso das proteínas proopiomelanocortina, alfa-fetoproteína e prolactina. Glicocorticoides também podem gerar transrepressão por interagir com fatores de transcrição impedindo sua ligação ao DNA. Por esse mecanismo, são inibidas as ações de fatores de transcrição associados à inflamação, como NFkB, e Proteína Ativadora 1 (AP-1), e à proliferação celular, como Transdutor de Sinal e

Ativador da Transcrição 5 (STAT5) (Figura 1.6) (STAHN; BUTTGEREIT, 2008; ADCOCK; MUMBY, 2016; VANDEWALLE *et al.*, 2018).

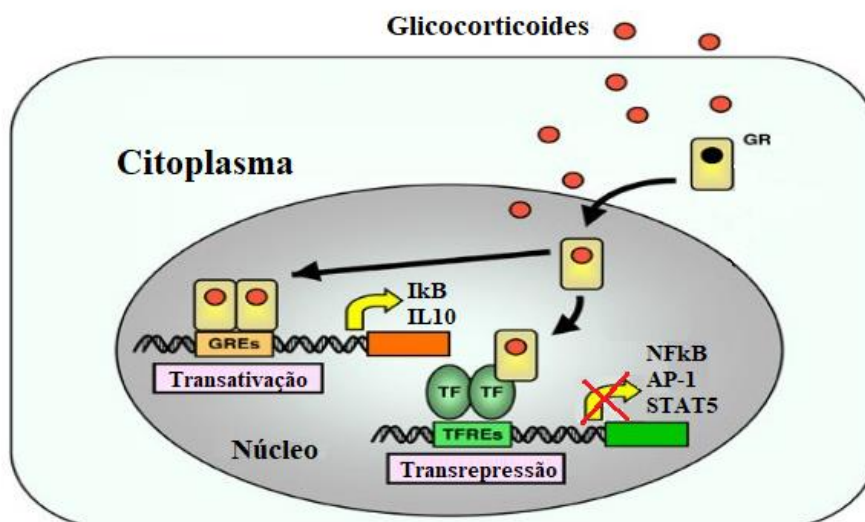


Figura 1.6. Mecanismos genômicos da ação de glicocorticoides. Os glicocorticoides podem realizar ativação da transcrição gênica (transativação) por ligação a elementos de ligação a glicocorticoides (GREs) positivos. A transrepressão pode ocorrer por ligação a GREs negativos, mas a expressão da maioria dos genes pró-inflamatórios é inibida através de interação do complexo glicocorticoide–receptor com fatores de transcrição, impedindo sua ação. TF, fatores de transcrição; TFREs, elementos de ligação a fatores de transcrição. Adaptado de (GERBER, 2016).

Os mecanismos não-genômicos são responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios a curto prazo. O complexo glicocorticoide-cGR pode inibir a liberação de ácido araquidônico, reduzindo assim a síntese de mediadores inflamatórios lipídicos. A ligação a mGR inibe vias relacionadas com a migração, proliferação de linfócitos T. Em concentrações farmacológicas, os glicocorticoides também interagem com membranas celulares de leucócitos alterando a homeostase de cálcio e sódio, acarretando em efeitos imunossupressores (STAHN; BUTTGEREIT, 2008; VANDEWALLE *et al.*, 2018).

O cortisol desempenha importante papel no desenvolvimento fetal do sistema digestório, do pulmão, e da tireoide em etapas tardias da organogênese. Durante a maior parte da gestação, porém, o feto é protegido dos níveis elevados desse hormônio pela conversão placentária do cortisol materno a cortisona. Tratamento com glicocorticoides exógenos, estresse ou ingestão frequente de alcaçuz durante a

gestação pode acarretar em exposição fetal prematura ao cortisol e levar a um desenvolvimento anômalo do eixo HPA e do sistema imunológico, aumentando o risco para doenças como hipertensão, diabetes, desordens psiquiátricas e doenças cardiovasculares (SOLANO *et al.*, 2016; MORSI *et al.*, 2018).

Em diversos tipos celulares, glicocorticoides induzem morte celular programada por regular positivamente a expressão de moléculas pró-apoptóticas, e negativamente as anti-apoptóticas. Células da linhagem linfóide imaturas apresentam alta expressão do receptor de glicocorticoides e são especialmente sensíveis à apoptose induzida por essas substâncias. A sobrevivência das células linfóides é dependente da ativação dos fatores de transcrição NFκB e AP1, potentemente inibidos por glicocorticoides. Por conta dessa característica, prednisona e dexametasona, glicocorticoides sintéticos com maior atividade anti-inflamatória e menor efeito mineralocorticoide são fármacos essenciais no tratamento da LLA (GREENSTEIN *et al.*, 2002; KFIR-ERENFELD *et al.*, 2010; KRUTH *et al.*, 2017).

Schmiegelow *et al.* (2008) hipotetizaram que os níveis endógenos de cortisol podem eliminar clones pré-leucêmicos, tendo um papel central na etiologia da LLA-cpB com HeH ou *ETV6-RUNX1*. A linha de argumentação dos autores pode ser resumida em nove fatos: 1) a incidência de LLA apresenta um pico entre 2-5 anos de idade, que é mais proeminente em países desenvolvidos e com melhores condições higiênico-sanitárias; 2) nos países industrializados, 80% das LLAs-cpB apresentam HeH ou *ETV6-RUNX1*, alterações de origem intrauterina com longo período pré-leucêmico; 3) 1% dos recém-nascidos saudáveis apresentam *ETV6-RUNX1*, podendo a cinética de eliminação dessas células nos primeiros dois anos de vida influenciar o risco subsequente de LLA; 4) os glicocorticoides estão entre os mais eficazes agentes anti-leucêmicos, e o subtipo predominante na primeira infância é o mais sensível a esses agentes; 5) terapia com ACTH pode induzir remissão morfológica de LLA; 6) durante o estresse induzido por infecções, os níveis de cortisol podem ser equipotentes aos de glicocorticoides exógenos utilizados para o tratamento da LLA; 7) várias infecções podem induzir remissão morfológica de LLA; 8) frequentar creches aumenta o risco de infecções e está associado a redução do risco de LLA; 9) países em desenvolvimento apresentam menores incidências de LLA e menores frequências de HeH e *ETV6-RUNX1*. As infecções, nestas crianças, aumentariam a secreção de cortisol e assim contribuiriam para a eliminação de possíveis clones pré-leucêmicos

que possam ocorrer na primeira infância (SCHMIEGELOW *et al.*, 2008; AZEVEDO-SILVA *et al.*, 2010).

1.2.3. Vitamina D

O termo “vitamina D” abarca diversas substâncias que compartilham entre si a propriedade de tratar o raquitismo (doença causada por deficiência dessas substâncias). São conhecidas sete moléculas com essa função, embora apenas duas tenham relevância na fisiologia humana: colecalciferol (vitamina D3), de origem animal, e ergocalciferol (vitamina D2), de origem vegetal. Cerca de 20% da vitamina D circulante provém da dieta, enquanto que 80% é produzida endogenamente (SASSI *et al.*, 2018).

A síntese de colecalciferol é realizada na pele, a partir da exposição do 7-deidrocolesterol a raios ultravioleta B. No fígado, a vitamina D, sintetizada endogenamente ou proveniente da dieta, é hidroxilada pela enzima Citocromo P450 (CYP) 2R1 para o metabólito estável e 25-hidroxi-vitamina D, principal forma circulante. Nos túbulos proximais renais é novamente hidroxilada pela enzima CYP27B1, para a forma ativa, 1-25-hidroxi-vitamina D (1,25-OHD) (Figura 1.7). A expressão de *CYP27B1* é induzida pela presença de paratormônio e inibida por maiores concentrações séricas de 1,25-OHD e cálcio em um mecanismo de retroalimentação negativa (FLEET *et al.*, 2012).

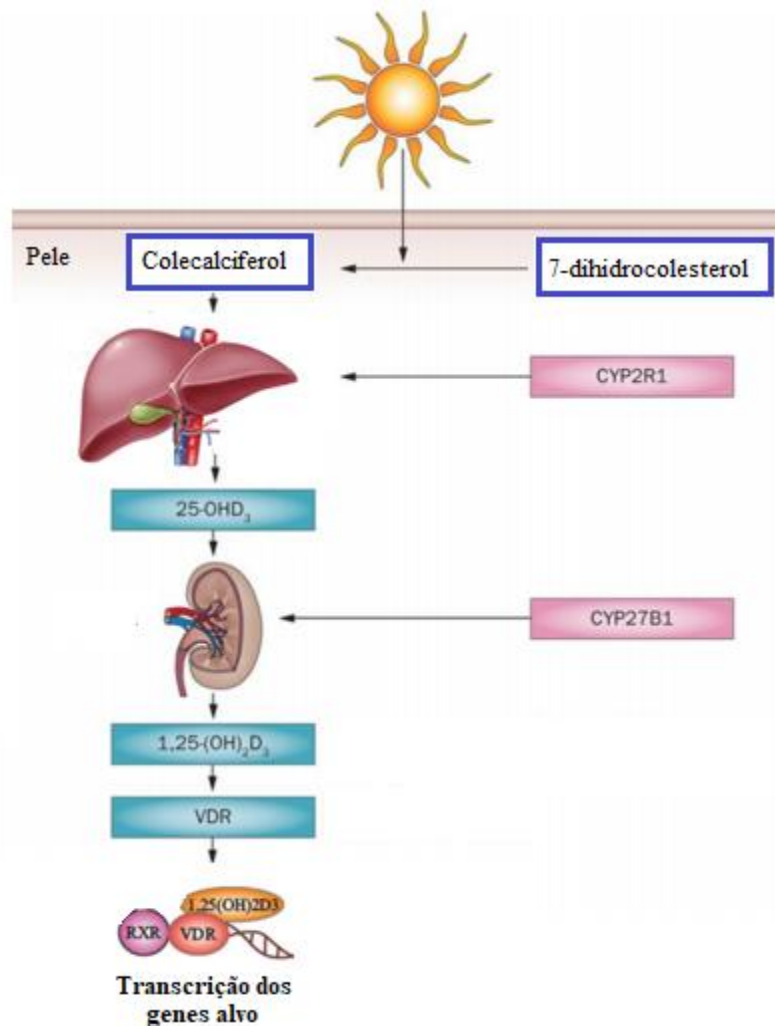


Figura 1.7. Síntese e metabolismo da vitamina D. O colecalciferol é sintetizado na pele a partir de 7-dihidrocolesterol, na presença de raios ultravioleta. No fígado, colecalciferol é convertido à principal forma circulante, 25-hidroxi-vitamina D (25-OHD), que é novamente hidroxilada no rim à forma ativa 1,25-OHD. Adaptado de (FATHI *et al.*, 2019).

A função clássica da vitamina D se dá através de ação endócrina no intestino, nos rins e nos ossos, em que desempenha papel central na homeostase do cálcio. Essa vitamina aumenta a absorção intestinal de cálcio e fósforo, reduz a excreção renal desses minerais e inibe a ativação de osteoclastos, diminuindo assim a reabsorção óssea. Mais recentemente, diversas outras funções têm sido atribuídas à vitamina D, entre elas, supressão da proliferação celular, indução de apoptose, regulação da resposta imune e da via de eliminação de xenobióticos (DUSSO *et al.*, 2005).

A maior parte das funções biológicas da 1,25-OHD se dá através do mecanismo genômico, dependente da ligação ao Receptor de Vitamina D (VDR), um receptor nuclear ao qual 1,25OHD apresenta grande afinidade. Ao ser ativado, VDR migra para

o núcleo, forma um heterodímero com o Receptor Retinoide X (RXR), que por sua vez interage com regiões específicas do DNA, os elementos de resposta à vitamina D (VDRE). A ligação de VDR ao VDRE pode ativar ou inibir a transcrição gênica a depender do conjunto de proteínas recrutadas. Mais de 100 genes apresentam VDRE em sua região promotora, o que explica o grande espectro de processos biológicos em que a vitamina D está envolvida. Além de 1,25-OHD, outras substâncias são capazes de ativar VDR com menor afinidade, como glicocorticoides e ácidos biliares (WANG *et al.*, 2005; FATHI *et al.*, 2019).

A vitamina D exerce um importante papel na regulação da proliferação celular, regulando a expressão de diversos genes implicados nesse processo. A ativação de VDR induz aumento da expressão do gene supressor de tumor *CDKN1A*, que codifica a proteína P21, inibidora da progressão do ciclo celular. A vitamina D também aumenta a expressão de proteínas da família *Forkhead box O* (FoxO), que são inibidoras da via de Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK) e, portanto, da proliferação celular. Outra via influenciada pela vitamina D é a do IGF. A ativação de VDR aumenta a expressão da Proteína Ligadora de IGF 3 (IGFBP3), que por sua vez interage com IGF reduzindo sua disponibilidade (FLEET *et al.*, 2012; CHRISTAKOS *et al.*, 2015). Tanto precursoras B normais quanto malignas tem sua proliferação inibida por vitamina D, indicando um possível papel da vitamina D na leucemogênese (CONSOLINI *et al.*, 2001).

A vitamina D também induz a apoptose em diversos tipos celulares normais e tumorais, incluindo células da linhagem linfoide. Isso ocorre por aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) e *Bcl2 Associated X* (Bax) (FLEET *et al.*, 2012; KULLING *et al.*, 2017). Outra via pela qual a vitamina D pode estar associada à leucemogênese é a regulação do sistema imune. Enquanto essa vitamina exerce um papel estimulante no sistema imune inato, ela inibe a proliferação e a ativação de linfócitos através de inibição da ativação do fator de transcrição inflamatório NFκB (GELDMEYER-HILT *et al.*, 2011; PEZESHKI *et al.*, 2019).

A ativação de VDR aumenta a eliminação de xenobióticos através da indução da expressão de enzimas de fase 1 de biotransformação, como as CYPs das famílias 2 e 3, especialmente a CYP3A4, a isoforma mais abundante no tecido hepático. Vitamina D também aumenta a expressão de enzimas da fase 2 de biotransformação, como as Sulfotransferases (SULTs), e de proteínas transportadoras da família *ATP-binding Cassette* (ABC) (LINDH *et al.*, 2012; WALLACE; REDINBO, 2013). As vias

através das quais a vitamina D pode estar envolvida na leucemogênese estão sumarizadas na Figura 1.8.

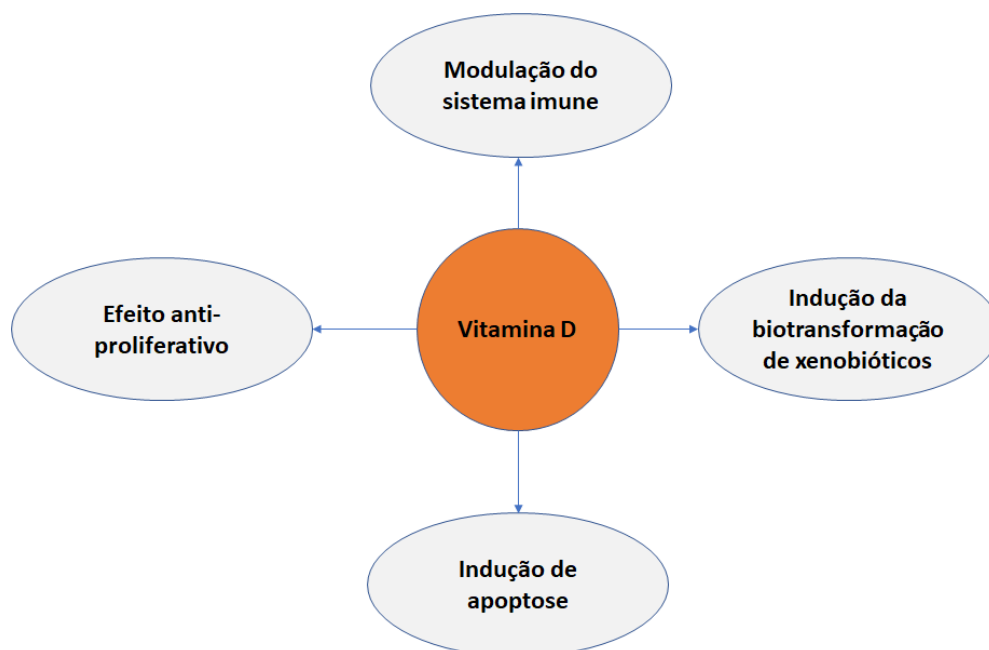


Figura 1.8. Mecanismos pelos quais a vitamina D pode atuar na leucemogênese. A vitamina D tem efeito anti-proliferativo, induz a apoptose, reduz a expressão de genes inflamatórios e aumenta a velocidade de biotransformação de xenobióticos, incluindo possíveis carcinógenos. Dessa forma, vitamina D possivelmente apresenta efeito anti-leucemogênico.

Maior aporte de vitamina D tem sido associado a melhor função imune e prevenção de doenças cardiovasculares e neoplasias (NEWBERRY *et al.*, 2014). A função anti-carcinogênica da vitamina D tem sido explorada principalmente para os cânceres de mama, próstata, cólon e pulmão (GIAMMANCO *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; DOU *et al.*, 2016;). Em crianças com LLA, maiores níveis séricos de vitamina D são associados a menor toxicidade óssea resultante do tratamento com glicocorticoides, e menor risco de mucosite oral causada por metotrexato (REISI *et al.*, 2015; OOSTEROM *et al.*, 2018). Análogos sintéticos de vitamina D tem sido investigados como potenciais novos fármacos para o tratamento da LLA. Em estudos pré-clínicos, esses medicamentos têm mostrado efeito anti-leucêmico (LIU *et al.*, 2017).

1.2.4. Carcinógenos químicos

Carcinógenos químicos podem causar lesões ao DNA capazes de gerar mutações, ou agir indiretamente, por exemplo, debilitando o sistema imune. Diversos fatores ambientais que acarretam em exposição a carcinógenos químicos já foram identificados como fatores de risco para LLA, embora o exato composto leucemogênico não tenha sido identificado em alguns casos (WHITEHEAD *et al.*, 2016).

A exposição a pesticidas, tanto os de uso doméstico quanto os utilizados na agricultura, é associada ao risco para LLA. Uma análise em *pool* de 12 estudos individuais mostrou que o contato com inseticidas de uso doméstico aumenta o risco para LLA quando a exposição é materna pré-gestacional (até três meses antes da gestação), durante a gestação ou após o nascimento da criança (BAILEY *et al.*, 2015). Já a exposição ocupacional a pesticidas foi alvo de outra análise em *pool* de 12 estudos individuais, que mostrou aumento de risco tanto para a exposição materna quanto para a paterna, antes e durante a gestação (BAILEY *et al.*, 2014b).

O tabagismo é um conhecido fator de risco para diversos tipos de câncer. A fumaça do cigarro tem cerca de 7000 substâncias tóxicas, muitas das quais são capazes de causar danos ao DNA. Em LLA pediátrica, o hábito paterno de fumar paterno foi associado ao risco para LLA em uma metanálise de 18 estudos (LIU *et al.*, 2011).

A exposição dos pais a tintas e solventes também foi associada ao risco para LLA em análises em *pool* e metanálises. A exposição a tintas em casa foi abordada por uma análise em *pool* de oito estudos, que mostrou que maior contato com esses produtos antes, durante ou após a gestação eleva o risco para a doença (BAILEY *et al.*, 2015). A exposição ocupacional a tintas foi abordada em uma metanálise realizada por Zhou *et al.* (2014), em que a exposição materna durante a gestação foi associada ao risco. Já a exposição a solventes durante a gestação foi associada ao risco para LLA em metanálise realizada por Carlos-Wallace *et al.* (2016). Assim como tintas e solventes, o ar poluído por queima de combustíveis fósseis de automóveis contém benzeno, uma substância leucemogênica. Em uma metanálise, a densidade do tráfego no local de residência foi associada ao risco para LLA (FILIPPINI *et al.*, 2015).

Uma abordagem para identificar substâncias leucemogênicas específicas tem sido a mensuração dos níveis de contaminantes na poeira doméstica. Os maiores níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenis policlorados e alguns éteres difenílicos polibromados foram associados ao risco para LLA (WARD *et al.*, 2009; DEZIEL *et al.*, 2014; WARD *et al.*, 2014).

1.2.5. A eliminação de xenobióticos

Os carcinógenos químicos, assim como outras substâncias exógenas, incluindo os fármacos, são metabolizados e encaminhados à excreção através do sistema de eliminação de xenobióticos. Esse sistema é composto de três fases. As reações de fase 1 tornam a substância mais hidrossolúvel. As reações de fase 2 consistem na conjugação da molécula alvo com outros compostos, acarretando em inativação da substância. A fase 3 consiste na excreção da substância com a participação de proteínas transportadoras. Embora didaticamente esses processos sejam divididos em fases, eles não necessariamente ocorrem em sequência (OMIECINSKI *et al.*, 2010).

Na fase 1 são realizadas reações de hidroxilação, desalquilação, oxidação, redução e desaminação, em geral, tornando a molécula alvo mais hidrossolúvel. A principal superfamília de enzimas da fase 1 é a das CYPs. Em adição, são também enzimas de fase 1 flavina monoxigenases, aldeído oxidases, carboxil-esterases, epóxido hidrolases, álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase. Essas reações são essenciais para a eliminação de xenobióticos, porém, podem tornar a molécula alvo mais reativa. Alguns carcinógenos, como benzeno, aminas heterocíclicas aromáticas, benzopireno e nitrosaminas se tornam mais ativos após uma reação de fase 1. Por utilizar oxigênio molecular, muitas dessas reações também produzem espécies reativas de oxigênio (FOTI; DALVIE, 2016; REED *et al.*, 2018).

As CYPs compõem uma superfamília de monoxigenases que apresentam um grupamento “heme” em sua estrutura. Foram descritas 57 CYPs, que participam do metabolismo de substâncias endógenas e exógenas. Para o metabolismo de xenobióticos, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 e CYP3A5 são as isoformas mais relevantes. Essas enzimas utilizam a transferência de elétrons da Nicotinamida-Adenina-Fosfato Reduzida (NADPH) para catalisar diversas reações, como hidroxilação, N-desalquilação,

epoxidação, sulfoxidação, desaminação e desalogenação. Os principais sítios de expressão das CYPs são os retículos endoplasmáticos de células do fígado, intestino, pulmão, rim, cérebro e mucosa nasal (FOTI; DALVIE, 2016; SHUMYANTSEVA *et al.*, 2018).

A maioria das reações da fase 2 utilizam como substratos produtos da metabolização de fase 1. Uma exceção é a conjugação com glutathione, que pode ser a primeira reação realizada em um xenobiótico. Embora existam reações de fase 2 que ativam substâncias, em geral, o produto da fase 2 é inativo e segue para excreção. As principais reações desse tipo são: a) conjugação com glutathione, catalisada por glutathione-S-transferases (GSTs), importante para a metabolização de xenobióticos como arsênico, organofosforados, diclorodifeniltricloroetano e organotiocianatos; b) conjugação com ácido glicurônico catalisada pelas glicuroniltransferases (UGTs), importante na metabolização de ftalatos e glicosídeos provenientes de alimentos; c) sulfatação realizada pelas SULTs, que tem os carbamatos como alguns de seus substratos; d) acetilação catalisada pelas N-acetiltransferases (NATs), que são relevantes na eliminação de aminas aromáticas; e e) metilação, catalisada por diversas metiltransferases que utilizam como doador de metil, SAMe, produzida na via de metabolismo dos folatos. Outras reações, como a fosfatação ocorrem com menor frequência (CROOM, 2012).

A fase 3 da eliminação de xenobióticos consiste no transporte em direção à excreção via bile ou urina realizado por transportadores de membrana. Essas proteínas controlam o influxo e o efluxo celular de diversas substâncias endógenas e exógenas. Há duas principais superfamílias de genes que codificam transportadores de membrana, sendo elas ABC e Carreador de solutos (SLC). Os transportadores ABC bombeiam substâncias para o meio extracelular utilizando energia proveniente da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP), enquanto que SLCs podem realizar transporte em ambas as direções e atuam como cotransportadores que utilizam como fonte energética o gradiente eletroquímico de íons (BRUNTON *et al.*, 2012). A Figura 1.9 esquematiza as três fases da eliminação de xenobióticos.

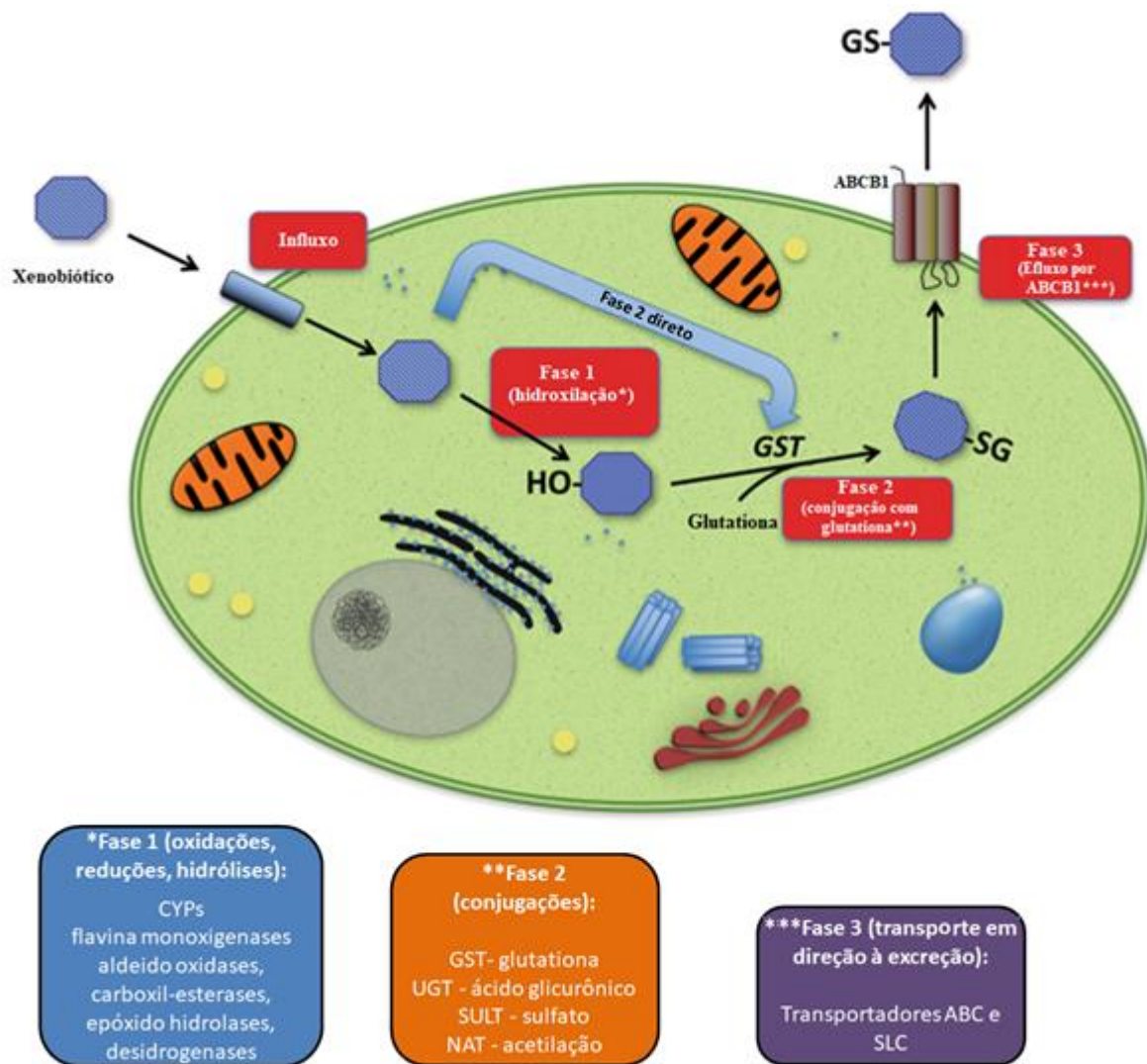


Figura 1.9. Eliminação de xenobióticos. Geralmente a primeira reação de biotransformação realizada em uma molécula de xenobiótico é de fase 1, ou seja, oxidações, reduções ou hidrólises que a tornam mais hidrossolúvel. Após essa etapa, a molécula pode ser conjugada em uma reação de fase 2, majoritariamente com glutatona, ácido glicurônico, sulfato ou grupamento acetil. A fase 3 ocorre com o transporte dessa molécula para o exterior da célula, e posteriormente para um ducto excretor através de proteínas transportadoras. Adaptado de (ALLOCATI *et al.*, 2018).

A expressão dos genes envolvidos na eliminação de xenobióticos é modulada por fatores de transcrição, que são ativados por substâncias endógenas ou pelos próprios xenobióticos em um mecanismo de auto-eliminação. O receptor nuclear Pregnano X (PXR), é o principal responsável pela indução da expressão de CYP3A4, a isoforma mais abundante no fígado. Esse receptor também controla os níveis de outras CYPs, enzimas de fase 2 e transportadores. Um dos principais agonistas desse receptor são os glicocorticoides. Além deles, ácidos biliares e hormônios tireoidianos, e alguns xenobióticos podem ativar esse receptor. A expressão de CYP3A4 também

é mediada pela ativação de VDR, por ligação à mesma região do DNA a que se liga o PXR (IHUNNAH *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013; MACKOWIAK; WANG, 2016; GULLIVER, 2017).

Enzimas de fase 2 são principalmente induzidas pelo Fator Nuclear Eritroide 2 (Nrf2). O Nrf2 aumenta os níveis de GSTs, UGTs, proteínas relacionadas à defesa antioxidante e à síntese de glutathione. Diversos compostos ativam esse fator de transcrição, dentre eles, os isotiocianatos presentes em vegetais crucíferos, cujo consumo é capaz de prevenir diversos tipos de câncer, como de cólon, próstata e pulmão (RAZIS *et al.*, 2018).

1.3. Estudos de polimorfismos genéticos na patogênese das leucemias linfóides.

Uma variação constitutiva na sequência de pares de bases do DNA é denominada “polimorfismo genético” quando está presente em pelo menos 1% da população. Em geral, polimorfismos não acarretam em doenças por si só, mas podem ser responsáveis pela suscetibilidade genética a diversas patologias. Seu efeito pode ser mediado por interações com fatores ambientais e com outros polimorfismos. A maioria das variantes associadas ao risco de LLA participam da diferenciação celular de linfócitos, do sistema imune, do metabolismo de folatos ou do reparo do DNA (VIJAYAKRISHNAN *et al.*, 2010).

Uma das abordagens utilizadas para a investigação da susceptibilidade genética é o Estudo de Associação Genômica Ampla (GWAS), capaz de avaliar simultaneamente o efeito de milhões de variantes genéticas. Os estudos desse tipo realizados em crianças com LLA identificaram variantes em *ARID5B*, *CEBPE*, *IKZF1*, *CDKN2A*, *CDKN2B* e *PIP4K2A* como associadas ao risco para a doença. Os três primeiros genes codificam fatores de transcrição envolvidos na diferenciação celular de leucócitos. Os genes supressores de tumor *CDKN2A* e *CDKN2B* codificam inibidores da progressão do ciclo celular, enquanto *PIP4K2A*, está envolvido na síntese do segundo mensageiro fosfoinositol-3-fosfato (PAPAEMMANUIL *et al.*, 2009; TREVIÑO *et al.*, 2009; SHERBORNE *et al.*, 2010; ORSI *et al.*, 2012; MIGLIORINI *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2013; WIEMELS *et al.*, 2016; GUTIERREZ-CAMINO *et al.*, 2017).

A vigilância imunológica exerce importante papel na etiologia da LLA, e sabe-se que há uma associação inversa entre doenças alérgicas e LLA (SUDAN *et al.*,

2016). Polimorfismos em genes importantes para o funcionamento do sistema imune podem mediar essa associação. Um estudo realizado por Midema *et al.* (2012) investigou o efeito de 29 polimorfismos em crianças com LLA, controles saudáveis e crianças com doenças atópicas. Três polimorfismos em *TLR6* foram inversamente associados ao risco para LLA e aumentaram o risco para doenças atópicas. Corroborando com a hipótese de que falhas na imunovigilância estão associadas à leucemogênese, também foi descrita associação de variantes em genes relacionados ao sistema imune adaptativo (*CD28*, *FCGR2*, *GATA3*, *IL2RA*, *STAT4*, *STAT6* e *CXCL12*) com o risco para LLA (CHANG *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2010; PERIM *et al.*, 2013).

Entre as variantes em genes do metabolismo dos folatos, a mais estudada é o Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) *MTHFR* rs1801133 (C677T), que apresenta efeitos diferentes a depender da população estudada, podendo reduzir, aumentar ou não estar associado ao risco para LLA. Provavelmente esse comportamento seja mediado por interações gene-gene e gene-ambiente, sendo que entre os fatores ambientais, a ingestão de folato pode ter um papel central (KOPPEN *et al.*, 2010; CANTARELLA *et al.*, 2017). A interação entre *MTHFR* rs1801133 e a suplementação materna com ácido fólico foi investigada por Milne *et al.* (2015), que identificaram aumento de risco associado ao alelo polimórfico (T) apenas em crianças cujas mães receberam suplementação no período pré-gestacional. Já o estudo realizado por Amigou *et al.* (2012) não identificou interação entre o efeito do polimorfismo e da suplementação. Outro SNP no gene *MTHFR*, rs1801131 (A1298C) apresentou associação nula com o risco para LLA na maioria dos estudos. Polimorfismos em *TYMS*, *MTR*, *MTRR* e *SLC19A1* foram abordados em um número menor de estudos que mostraram resultados conflitantes (GAST *et al.*, 2007; PETRA *et al.*, 2007; DE JONGE *et al.*, 2009; YEOH *et al.*, 2010; CHAN *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011; AMIGOU *et al.*, 2012; LAUTNER-CSORBA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013).

Polimorfismos em genes que participam da eliminação de xenobióticos também influenciam o risco para LLA. Quanto aos genes de fase 1 de metabolização, os mais estudados são *CYP1A1*, *CYP3A5*, *NQO1*, *CYP2E1* e *PON1* (BRISSON *et al.*, 2015). Uma metanálise que incluiu 12 estudos individuais mostrou associação direta entre *CYP1A1* rs4646903 e o risco para LLA (ZOU *et al.*, 2015). O polimorfismo *CYP3A5* rs776746 foi associado ao risco para LLA em uma metanálise de cinco estudos totalizando 1070 casos (MA *et al.*, 2015). Já as variantes em *CYP2E1* foram

associadas à LLA em populações turca e canadense, mas não na francesa. (KRAJINOVIC *et al.*, 2004; AYDIN-SAYITOGU *et al.*, 2006; BONAVENTURE *et al.*, 2013). Uma metanálise de sete estudos individuais mostrou ausência de associação entre o SNP *NQO1* rs1800566 e o risco para LLA, enquanto na população brasileira, dois estudos mostraram associação inversa (GUHA *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2012).

Entre os polimorfismos em genes da fase 2 de biotransformação, os mais estudados em LLA são as deleções de *GSTT1* e *GSTM1*, além de SNPs em *GSTP1* e *NAT2*. Uma recente metanálise realizada por Zhao *et al.* (2018) incluiu 30 estudos e concluiu que a deleção em homozigose de *GSTM1* está associada ao risco para LLA, enquanto a deleção de *GSTT1* não foi associada à doença. Outra metanálise, de 26 estudos, identificou resultado semelhante quanto a *GSTM1*, e verificou que a deleção de *GSTT1* é associada ao risco para LLA entre asiáticos (TANG *et al.*, 2013). Polimorfismos em *GSTP1* foram abordados em 10 estudos, dos quais apenas três demonstraram aumento do risco. Em metanálise, essas variantes não foram associadas à LLA (ZHAO *et al.*, 2018; BRISSON *et al.*, 2015). Polimorfismos que resultam em perda de função de *NAT2*, em geral aumentam o risco para LLA, como verificado nas populações do Brasil, Canadá e França. Já SNPs que acarretam em aumento da atividade enzimática reduziram o risco para LLA nas populações brasileira e canadense (KRAJINOVIC *et al.*, 2000; ZANROSSO *et al.*, 2010; BONAVENTURE *et al.*, 2012; ZANROSSO *et al.*, 2012). Quanto ao gene *SULT1A1*, Um SNP em foi associado ao risco para LLA de lactentes em um estudo brasileiro (LOPES *et al.*, 2015).

Polimorfismos nas vias de metabolização de xenobióticos apresentam efeito somatório sobre o risco para LLA. Um estudo realizado por Canalle *et al.*, (2004) mostrou que SNPs em *CYP1A1* e *CYP2E1* aumentam o risco para LLA quando combinados com deleções em *GSTT1* e *GSTM1*. O efeito desses polimorfismos também é modulado pelas exposições ambientais. Um estudo canadense mostrou que *CYP2E1* rs2031920 e deleção de *GSTT1* aumentam mais o risco para LLA quando a mãe é exposta a trihalometanos, que são contaminantes da água (INFANTE-RIVARD *et al.*, 2002). Já um estudo francês conduzido por Bonaventure *et al.* (2014) mostrou ausência de interação entre o consumo de álcool e café e polimorfismos em *NAT2*, *ADH1C* e *CYP2E1*.

Entre os polimorfismos em genes da fase 3 de eliminação de xenobióticos, o mais abordado é rs1045642, em *ABCB1*, gene que codifica a glicoproteína P, responsável pelo efluxo celular de diversos xenobióticos e fármacos. Esse SNP foi associado ao risco para LLA em estudos realizados no Japão, Polônia, Hungria e Estados Unidos. O estudo estadunidense também demonstrou interação entre esse polimorfismo e a exposição a inseticidas de uso doméstico (JAMROZIAK *et al.*, 2004; HATTORI *et al.*, 2007; URAYAMA *et al.*, 2007; SEMSEI *et al.*, 2008).

Genes envolvidos no reparo do DNA por excisão de bases (*XRCC1*, *OGG1* e *XRCC4*), excisão de nucleotídeos (*ERCC1* e *ERCC2*) e recombinação homóloga (*NBN*) apresentam polimorfismos associados ao risco para LLA (BRISSON *et al.*, 2015). O polimorfismo mais explorado é *XRCC1* rs1799782, associado à LLA em populações da Turquia, Índia e México (JOSEPH *et al.*, 2005; BATAR *et al.*, 2009; MEZA-ESPINOZA *et al.*, 2009). O polimorfismo *ERCC2* rs13181 foi associado a aumento do risco para LLA em crianças brasileiras em combinação com SNPs em *XRCC1* e *TYMS* (CANALLE *et al.*, 2011). Já os polimorfismos em *OGG1* foram associados à LLA em dois estudos poloneses (CHRZANOWSKA *et al.*, 2006; PASTORCZAK *et al.*, 2011).

Nosso estudo explorou o papel de polimorfismos em genes que participam da via de eliminação de xenobióticos e de processos endógenos importantes para a leucemogênese na modulação do risco para LLA. Essas variantes serão abordadas nos próximos capítulos.

1.3.1. *MTHFR* rs1801133

O gene *MTHFR*, localizado no cromossomo 1p36.22, codifica a enzima metiltetrahidrofolato redutase (MTHFR), que converte 5,10-metileno-THF em 5-metil-THF. A primeira forma está envolvida na síntese de timina, enquanto que a segunda, na conversão de homocisteína a metionina (LIEW; GUPTA, 2015).

O polimorfismo mais estudado nesse gene é rs1801133 (mais referido como *MTHFR* c.677C>T), localizado no éxon 4, tem frequência do alelo variante de 25% na população mundial, sendo mais comum entre europeus se comparados a africanos. Consiste de uma transição de citosina para timina que resulta em substituição de alanina por valina na posição 222 da proteína (p.Ala222Val). A proteína resultante tem a termoestabilidade reduzida e, portanto, menor atividade a temperaturas fisiológicas.

Indivíduos heterozigotos apresentam cerca de 65% da atividade de MTHFR, enquanto os homozigotos variantes têm cerca de 30% (LIEW; GUPTA, 2015; YAMADA *et al.*, 2001).

O alelo T é associado a maiores níveis de homocisteína, ocorrência de malformações congênitas, aumento do risco de doenças neurológicas, cardiovasculares e alguns tipos de câncer, como de mama, cólon, pâncreas e estômago (LIEW e GUPTA, 2015).

Em LLA, esse SNP é extensamente estudado, sem que haja um consenso a respeito de seu papel. Uma metanálise realizada por LI *et al.* (2015) incluiu 35 estudos em crianças e não verificou associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo e o risco para a doença. Estudos individuais, porém, apresentaram resultados discordantes, sendo que a maioria não identificou associação com o risco, como nos estudos realizados por Lautner-Csorba *et al.* (2013) na Hungria e Lightfoot *et al.* (2015) no Reino Unido. Outros estudos verificaram associação inversa entre o SNP e o risco para LLA, como nas investigações conduzidas por De Jonge *et al.* (2009) na Holanda e Pei *et al.* (2015) na China. Em uma minoria dos estudos, o polimorfismo conferiu aumento do risco, como demonstrado por Sood *et al.* (2010) na Índia e Silva *et al.* (2013) no Brasil.

Os estudos brasileiros não são unânimes quanto ao papel de *MTHFR* rs1801133 no risco para LLA. Enquanto Zanrosso *et al.* (2006) (apenas entre crianças de cor de pele não branca) e Franco *et al.* (2001) demonstraram associação inversa entre o polimorfismo e o risco para LLA, Silva *et al.* (2013) verificaram aumento do risco para a doença.

O efeito dúbio desse polimorfismo pode ser explicado por seu papel biológico. Esse SNP aumenta a disponibilidade de 5,10-metileno-THF e conseqüentemente, de timidilato, reduzindo a incorporação de uracila no DNA. Por outro lado, reduz a formação de SAMe, e sua disponibilidade para reações de metilação, inclusive de DNA. Sendo assim, a depender de interações com fatores genéticos e exposições ambientais, um ou outro efeito pode prevalecer (CANTARELA *et al.*, 2017).

1.3.2. *CRHR1* rs242941 e *GLCCI1* rs37972

Há uma variabilidade interindividual quanto à resposta hormonal ao estresse, parte da qual é explicada por polimorfismos em genes relacionados ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. O hormônio liberador de corticotrofina, secretado pelo hipotálamo, liga-se na hipófise ao Receptor de Hormônio Liberador de Corticotrofina (*CRHR1*), um receptor acoplado a proteína G cuja ativação resulta em secreção de corticotrofina (DUONG-THI-LY *et al.*, 2017). Polimorfismos no gene *CRHR1*, que codifica esse receptor, reduzem a expressão desse gene, e portanto, a liberação de corticotrofina e de glicocorticoides endógenos. Presume-se que a resposta aos corticoides exógenos seja melhor em indivíduos polimórficos (AWASTHI *et al.*, 2015).

O gene *CRHR1*, localizado em 17q21.31 e possui 14 éxons. Entre seus polimorfismos, o mais estudado quanto à resposta a glicocorticoides é rs242941, uma transversão de citosina para adenina no íntron 2 do gene. Em asma, esse SNP foi associado a melhor resposta aos glicocorticoides. Já em LLA pediátrica, essa variante foi associada a maior toxicidade aos glicocorticoides, manifestada como hipertensão (DUONG-THI-LY *et al.*, 2017; KANDEM *et al.*, 2008).

Embora a proteína Induzida por Glicocorticoides 1 (*GLCCI1*) não tenha sua exata função conhecida, sabe-se que atua no mecanismo genômico de ação dos glicocorticoides, entre a dissociação de cGR de proteínas inibitórias e sua migração para o núcleo (Figura 1.10). Sua expressão foi descrita como marcador precoce de morte celular induzida por glicocorticoides, e além disso, camundongos desprovidos dessa proteína apresentam inflamação em vias aéreas e baixa resposta anti-inflamatória a glicocorticoides (HU *et al.*, 2018; TANTISIRA *et al.*, 2011).

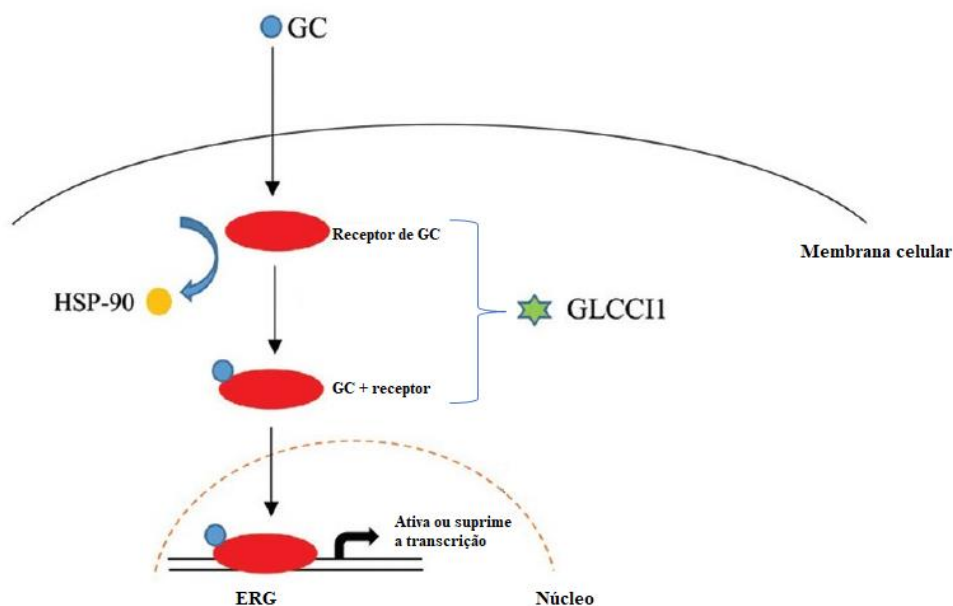


Figura 1.10. Possível função de GLCCI1 na ação dos glicocorticoides. A proteína GLCCI1 ainda não tem sua função completamente conhecida, mas um estudo em modelo animal mostrou que atua entre a dissociação do GR da proteína de choque térmico (HSP-90) e a migração do complexo glicocorticoide-GR para o núcleo. Adaptado de (HU *et al.*, 2018).

O gene *GLCCI1* está localizado em 7p21.3 e apresenta 8 éxons. Dois SNPS em *GLCCI1* são associados à redução da expressão do gene e, portanto, da resposta a glicocorticoides. São eles rs37972, uma troca de citosina por timina na região promotora, e rs37973, uma transição de adenina para guanina no íntron 2. Ambas as variantes estão em desequilíbrio de ligação completo, ou seja, em praticamente todos os casos em que um SNP está presente, o outro também está (HAMADA *et al.*, 2017).

Esses polimorfismos acarretam em menor sensibilidade à apoptose induzida por glicocorticoides em células como eosinófilos e precursores linfoides, e portanto menor resposta ao medicamento (KESKIN *et al.*, 2019). Polimorfismos em *GLCCI1* têm sido estudados principalmente em asma, e associados a menor resposta a glicocorticoides em GWAS, como o conduzido por Tantisira *et al.* (2011), e em estudos com abordagem gene-candidato (HU *et al.*, 2016; LEI *et al.*, 2017).

Os glicocorticoides são eficazes em induzir morte celular em blastos de LLA, sendo essenciais no tratamento da doença. Enquanto glicocorticoides sintéticos são importantes no tratamento, os endógenos podem eliminar clones pré-leucêmicos evitando a manifestação da doença (SCHMIEGELOW *et al.*, 2008). Como polimorfismos em *GLCCI1* e *CRHR1* interferem na resposta aos glicocorticoides, nós hipotetizamos que possam também ter um papel na leucemogênese.

1.3.3 VDR rs1544410 e rs2228570

O gene *VDR*, está localizado em 12q13.11 e apresenta oito éxons codificantes (2-9) e 6 não traduzidos (1A-1F). É um gene polimórfico com mais de 900 variantes alélicas descritas. Entre essas, destacam-se quanto à frequência e importância biológica rs1544410 (BsmI) e rs2228570 (FokI) (CHRISTAKOS *et al.*, 2015).

O SNP rs2228570 consiste de uma troca de citosina por timina no éxon 2. Esse SNP ocorre no primeiro de dois potenciais códons de início (ATG). A tradução inicia-se então no primeiro ATG, gerando uma proteína com três aminoácidos a mais e menor eficácia na ligação à vitamina D. Esse polimorfismo tem frequência alélica de 33% na população mundial. O SNP rs1544410, uma troca de guanina por adenina no íntron 8, não altera a estrutura ou função da proteína traduzida, mas pode reduzir a estabilidade do Ácido Ribonucléico Mensageiro (RNAm), e por consequência a expressão gênica. Essa variante está em desequilíbrio de ligação com uma repetição de microssatélite de poliadenosina (poli A) na Região Não Traduzida 3' (3'UTR), e com os SNPs rs731236 (TaqI), também em 3'UTR e rs7975232 (ApaI), no íntron 8. Todos esses polimorfismos são associados a menor expressão de *VDR* (MIKHAK *et al.*, 2007; RAHMADHANI, 2017).

Recentes metanálises e revisões sistemáticas tem associado *VDR* rs1544410 e rs2228570 ao risco para osteoporose, doenças autoimunes e alérgicas, complicações do diabetes e neoplasias (TIZAOUI; HAMZAOUI, 2015; ZHANG *et al.*, 2016; RAI *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018). Em câncer, é conhecida a associação entre ambos os polimorfismos e o risco para tumores de próstata, mama, cólon e melanoma (GANDINI *et al.*, 2014; RAI *et al.*, 2017).

Em crianças com LLA, polimorfismos em *VDR* já foram associados a maior risco de toxicidade óssea secundária ao uso de glicocorticoides, manifestada como osteonecrose e redução da densidade mineral óssea, a maior acumulação de etoposídeo e ao risco de recaída da doença em sistema nervoso central (KISHI *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2005; TANTAWI *et al.*, 2016; ELHAROUNI *et al.*, 2018). Tendo em vista a importância da vitamina D e de seu receptor em processos importantes para a leucemogênese, como a eliminação de xenobióticos, a modulação do sistema

imune e regulação da proliferação celular e da apoptose, nós hipotetizamos que polimorfismos em *VDR* também possam estar associados ao risco para LLA.

1.3.4. *CYP3A5* rs776746

Entre as famílias de CYPs envolvidas no metabolismo de xenobióticos, destaca-se a família CYP3, que possui apenas uma subfamília, CYP3A, representada por quatro enzimas (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* e *CYP3A43*) codificadas por genes localizados na região 7q22.1. Entre essas enzimas, *CYP3A4* é a isoforma mais expressa no tecido hepático enquanto *CYP3A5*, é a principal isoforma em tecidos extra-hepáticos (em indivíduos que expressam essa enzima). Há uma grande variabilidade interindividual na expressão dessas enzimas, o que em parte é explicado pela presença de polimorfismos genéticos (ZANGER; SCHWAB, 2013; HOHMANN, 2016).

A variação mais relevante na subfamília CYP3A é a ausência da expressão de *CYP3A5*, causada pelo polimorfismo rs776746 (também referido como *CYP3A5*3*). Essa variante consiste de uma transição de adenina por guanina no íntron 3 do gene. O alelo G cria um sítio de *splicing* alternativo com consequente produção de um RNAm alterado, com inclusão de 131 pares de bases (pb) provenientes do íntron 3. Essa alteração gera um códon de parada com produção de uma proteína não funcional, truncada no resíduo de aminoácido 102. Esse polimorfismo apresenta diferença quanto à frequência alélica nas diferentes populações: 94% entre europeus e de 18% entre africanos (LAMBA *et al.*, 2002; GABRYEL *et al.*, 2016; HOHMANN, 2016).

Esse SNP é associado a menor capacidade de metabolização de diversos fármacos, inclusive alguns utilizados no tratamento da LLA. Um estudo conduzido por Huang *et al.* (2017) identificou que em crianças com LLA, *CYP3A5* rs776746 é associado a maiores níveis séricos de daunorrubicina, e por consequência, a maior frequência de cardiotoxicidade. Esse polimorfismo também pode alterar o risco para LLA, por reduzir a velocidade de metabolização de xenobióticos. Uma metanálise de cinco estudos caso-controle identificou que esse polimorfismo aumenta o risco para LLA especialmente em populações de origem europeia (MA *et al.*, 2015). Na população brasileira, foram publicados dois estudos mostrando associação direta entre o polimorfismo e o risco para LLA, sendo que um deles abordou especificamente crianças com até dois anos de idade (SILVEIRA *et al.* 2012; LOPES *et al.*, 2015).

1.3.5. Deleções em *GSTT1* e *GSTM1*

As GSTs catalisam a conjugação de diversas substâncias endógenas e exógenas com glutathione, um tripeptídeo formado por gama-glutamato, cisteína e glicina. Diversos carcinógenos químicos, fármacos e produtos de estresse oxidativo são substratos das GSTs. Após a conjugação, a molécula alvo se torna menos reativa e mais hidrossolúvel, o que facilita sua excreção. Adicionalmente GSTs podem ter atividades de peroxidases, isomerases e tiol-transferases, além de apresentar funções não catalíticas na modulação da sinalização celular (DI PIETRO *et al.*, 2010).

Essas enzimas são codificadas por membros de 3 famílias gênicas distintas que dão origem às GSTs mitocondriais, membranares e citoplasmáticas, sendo essas últimas as mais estudadas quanto à variabilidade genética na suscetibilidade a doenças e em seu tratamento. As GSTs citoplasmáticas são agrupadas nas seguintes classes: (GSTA), (GSTM), (GSTP), (GSTS), (GSTT), (GSTO) e (GSTZ). Cada classe compreende diversas isoformas de GST, que diferem quanto à especificidade de substratos (MOREL; ANINAT, 2011).

Entre os polimorfismos presentes nesses genes, destacam-se duas deleções de genes inteiros em *GSTT1* e *GSTM1*. O gene *GSTM1* está localizado em 1q13.3, enquanto *GSTT1*, em 22q11.23. A deleções em homozigose (genótipo nulo) de *GSTM1* está presente em 28-35% dos brasileiros negros e em 48-55% dos brancos. Já *GSTT1* nulo tem frequências de 26-36% e 20-26% respectivamente. A maioria dos estudos publicados sobre esses polimorfismos utilizaram técnicas que são capazes de distinguir apenas homozigotos deletados dos demais genótipos, tornando incerto o papel dos heterozigotos (DI PIETRO *et al.*, 2010).

Embora haja sobreposição de substratos entre as isoformas de GSTs, existem diferenças de afinidades entre elas. Algumas das substâncias conjugadas por *GSTM1* são acroleína, 4-hidroxinonena e estilbenos. Moléculas menores como cloreto de metileno, dibrometo de etileno, isopreno e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são substratos da *GSTT1* (JANCOVA *et al.*, 2010).

Essas variantes acarretam em menor eficiência da eliminação de substâncias carcinogênicas, como as presentes no tabaco. O risco para carcinoma escamoso de

boca é quatro vezes maior entre fumantes *GSTM1* nulo em comparação com quem expressa o genótipo não nulo (KRÜGER *et al.*, 2014). Em LLA pediátrica, uma metanálise incluiu 30 estudos caso-controle e concluiu que apenas a deleção de *GSTM1* aumenta o risco para LLA. Em populações asiáticas, porém, a deleção de *GSTT1* é mais relevante, como demonstrado em outras duas metanálises (TANG *et al.*, 2013; MOULIK *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2018). Na população brasileira, foram publicados dois estudos. Um deles, conduzido por Canalle *et al.* (2004) não identificou associação entre as deleções e o risco. Já Lopes *et al.* (2015) investigaram o efeito das deleções nas leucemias de crianças com até 24 meses de idade e verificaram aumento do risco associado à deleção de *GSTT1*.

1.4. Hipóteses e justificativa do estudo.

A justificativa desse estudo se baseia na hipótese de que a etiologia da LLA é associada a um somatório de fatores que envolve variáveis genéticas e ambientais (Figura 1.11). Anteriormente dentro de nosso Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrico (PHOP) foi explorado o papel das exposições maternas durante a gestação a fatores exógenos (POMBO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2006; KOIFMAN *et al.*, 2012; COUTO *et al.*, 2013; COUTO *et al.*, 2015; REIS *et al.*, 2017). Os polimorfismos genéticos moduladores das exposições também foram investigados, permanecendo algumas questões inexploradas, como o papel de polimorfismos em alguns genes do sistema xenobiótico e do metabolismo de glicocorticoides e da vitamina D na etiopatogênese da LLA (ZANROSSO *et al.*, 2006; ZANROSSO *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2015; BRISSON *et al.*, 2018).

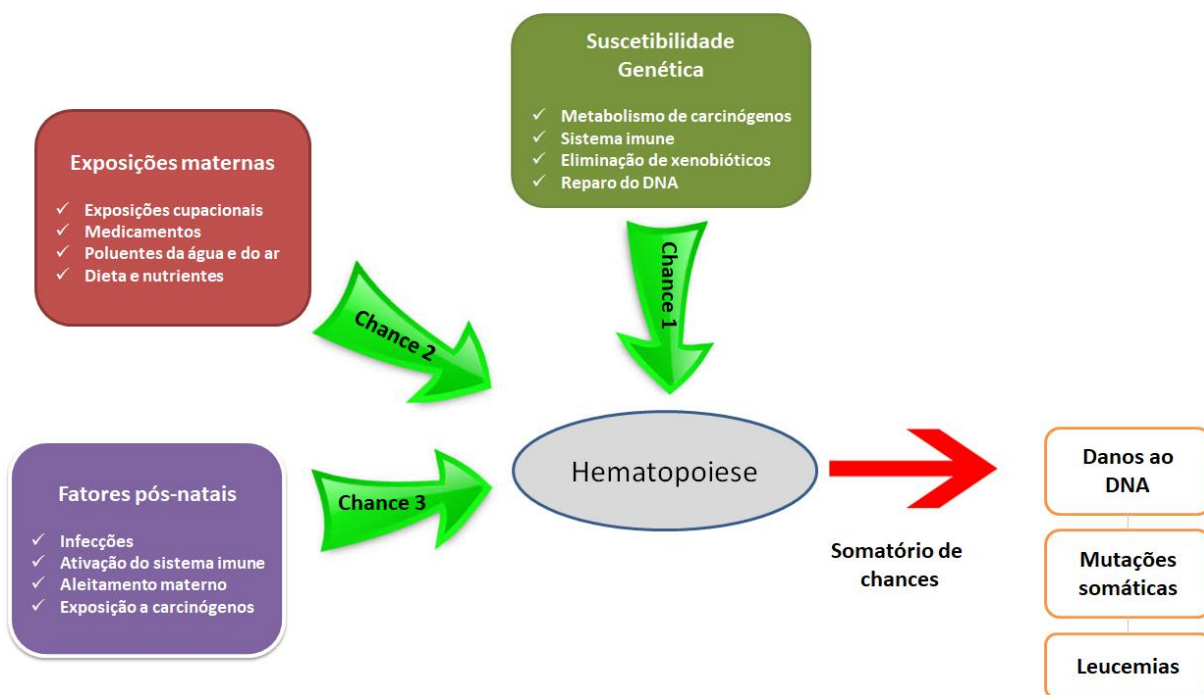


Figura 1.11. Esquema dos fatores que influenciam a leucemogênese. A ocorrência de erros na hematopoiese capazes de conduzir à leucemogênese é associada a um somatório de chances. A primeira chance é o perfil genético, que influencia o comportamento do organismo frente aos fatores de risco ambientais. A segunda consiste na vida intrauterina, na qual a gênese da primeira alteração leucemogênica é associada às exposições maternas. A terceira chance são os primeiros anos de vida, durante os quais, as exposições determinarão a eliminação do clone pré-leucêmico ou a geração de novas mutações somáticas e manifestação da doença.

Esse estudo abordou polimorfismos em genes envolvidos direta ou indiretamente na eliminação de xenobióticos. Além de participarem dessa via, alguns genes selecionados participam de processos endógenos relevantes para a leucemogênese, como o metabolismo de folatos, e a ação de glicocorticoides e vitamina D. Quatro dos polimorfismos abordados em nosso estudo não foram anteriormente investigados quanto ao risco para LLA, enquanto quatro outros já foram investigados, inclusive em estudos brasileiros, mas sem que haja um consenso sobre qual o seu efeito. Foram selecionados polimorfismos que também estejam envolvidos na eliminação ou na ação de fármacos antineoplásicos para que seja realizada posteriormente uma abordagem capaz de avaliar o papel dessas variantes no desfecho do tratamento da LLA. As variantes abordadas nesse estudo estão sumarizadas no Quadro 1.3.

Quadro 1.3. Polimorfismos estudados.

Gene	Polimorfismo	Processo envolvido	Impacto da variante na proteína	Avaliação anterior do risco para LLA
<i>MTHFR</i>	rs1801133	Metabolismo de folatos	Reduz a função	Sim
<i>CRHR1</i>	rs242941	Secreção de glicocorticoides	Reduz expressão	Não
<i>GLCCI1</i>	rs37972	Ação dos glicocorticoides	Reduz expressão	Não
<i>VDR</i>	rs1544410	Ação da vitamina D	Reduz expressão	Não
<i>VDR</i>	rs2228570	Ação da vitamina D	Reduz a função	Não
<i>CYP3A5</i>	rs776746	Fase 1 de biotransformação	Proteína não funcionante	Sim
<i>GSTM1</i>	Deleção	Fase 2 de biotransformação	Ausência da proteína	Sim
<i>GSTT1</i>	Deleção	Fase 2 de biotransformação	Ausência da proteína	Sim

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar as magnitudes de riscos das associações entre os polimorfismos *MTHFR* rs1801133, *CRHR1* rs242941, *GLCCI1* rs37972, *VDR* rs1544410, *VDR* rs2228570 *CYP3A5* rs776746, deleção de *GSTM1* e de *GSTT1* e a suscetibilidade genética para LLA pediátrica.

2.2. Objetivos específicos

1. Verificar a frequência dos polimorfismos em crianças brasileiras com LLA.
2. Determinar as magnitudes de riscos entre os genótipos e a LLA em análises estratificadas para variáveis demográficas (cor de pele, idade e sexo) e subtipos de LLA.
3. Avaliar os possíveis efeitos da combinação de genótipos sobre o risco para LLA pediátrica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo epidemiológico-molecular (tipo caso-controle) com genotipagens para polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, com potencial para estabelecer associações de riscos entre os genótipos e a LLA pediátrica.

3.2. Sujeitos do estudo

Casos. Grupo composto de crianças brasileiras com LLA provenientes de oito centros brasileiros de tratamento onco-pediátrico. Entre os centros cujos casos de leucemias são diagnosticados no PHOP, foram selecionados aqueles que fazem o tratamento conforme os protocolos do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI) LLA-99 ou do *International Berlin Frankfurt Münster* (I-BFM) 2009. A lista de centros colaboradores por região brasileira com respectivos números de casos incluídos está no Anexo I. Os critérios de inclusão foram: 1) ter sido diagnosticado com LLA entre 2012 e 2015; 2) ter idade ≤ 19 anos ao diagnóstico. Foram considerados critérios de exclusão amostras de crianças com fenótipo de síndromes genéticas ou tratadas sem seguir protocolos de tratamento de LLA.

Controles. Este grupo foi constituído de crianças nascidas saudáveis cujas mães doaram sangue de cordão umbilical ao Banco de Sangue de Cordão Umbilical e placentário (BSCUP) do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). A relação entre casos e controles usada nesse estudo foi de 1:1.

3.3. Extração do DNA

O DNA genômico de crianças com LLA foi extraído de amostras de sangue periférico ou medula óssea coletadas ao diagnóstico ou durante a remissão. O DNA dos controles foi extraído de sangue de cordão umbilical de crianças saudáveis. Foi utilizado o método de *salting-out*, conforme descrito por Araujo *et al.* (2014), além da extração por Trizol® (Invitrogen). Foi avaliada a concentração e a pureza do DNA em

espectrofotômetro NanoDrop 2000 ® (Thermo Scientific), e a integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

3.4. Genotipagens

3.4.1 Genotipagens por *High resolution melting*

As genotipagens para os polimorfismos *MTHFR* rs1801133, *VDR* rs1544410 e rs2228570, *CRHR1* rs242941, *GLCCI1* rs37972, *CYP3A5* rs776746 foram realizadas através do método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)-*high resolution melting* (HRM), uma técnica em que primeiramente é realizada uma PCR em que é utilizado um corante que emite fluorescência quando intercalado na dupla-fita de DNA e um termociclador capaz de mensurar fluorescência. Após a amplificação da região de interesse, procede-se o HRM, que consiste de um incremento lento e gradual da temperatura até a desnaturação completa dos fragmentos de DNA. Os genótipos são identificados por diferenças no padrão de dissociação (REJA *et al.*, 2010).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as genotipagens por HRM foram desenhados com utilização da ferramenta *PrimerQuest Tool*®, utilizando-se os seguintes critérios: 1) ter entre 18 e 30 nucleotídeos; 2) temperatura de dissociação $\geq 56^{\circ}\text{C}$ e semelhante entre os oligonucleotídeos senso e anti-senso; 3) Conteúdo de G-C entre 40 e 60%; 4) formar em uma PCR um fragmento amplificado de até 160 pares de bases. O Quadro 3.1 mostra os oligonucleotídeos desenhados.

Quadro 3.1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de HRM.

Polimorfismo	Oligonucleotídeos iniciadores	Comprimento do <i>amplicon</i> (pb)
<i>MTHFR</i> rs1801131	Senso: 5' CCTTGAACAGGTGGAGGCC 3'	158
	Anti-senso: 5' CAAAGAAAAGCTGCGTGATGAT 3'	
<i>VDR</i> rs1544410	Senso: 5' CTGCTTGCTGTTCTTACAGGGA 3'	145
	Anti-senso: 5' CACAGGTCATAGCATTGAAGTGAAA 3'	
<i>VDR</i> rs2228570	Senso: 5' GGGATTCTGAGGAACTAGATAAGC 3'	81
	Anti-senso: 5' AAGAGCAGAGCCTGAGTATTG 3'	
<i>CRHR1</i> rs242941	Senso: 5' GAGGGCCAGGAACCATGAAC 3'	146
	Anti-senso: 5' AGTGCTGTTTCCTGAGAGACTG 3'	
<i>GLCCI1</i> rs37972	Senso: 5' CACCACGAGCAGACCAATTT 3'	97
	Anti-senso: 5' CGGGAGCAATTAATGTAAGGATCT 3'	
<i>CYP3A5</i> rs776746	Senso: 5' TATGGAGAGTGGCATAGGAGATAC 3'	149
	Anti-senso: 5' TCATATGATGAAGGGTAATGTGGTC 3'	

pb: pares de bases.

As reações de PCR-HRM foram realizadas com uso dos seguintes reagentes: Type-it HRM PCR Kit (Qiagen) (concentração = 1x); oligonucleotídeos iniciadores (concentração = 0,7 μ M). O volume final das reações foi de 15 μ L. A PCR em tempo real e o HRM foram realizadas em termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) programado conforme descrito no Quadro 3.2. A genotipagem dos polimorfismos *VDR* rs2228570 e rs1544410 foram realizadas em uma reação *duplex*, em que dois pares de primers foram usados em uma só reação. Para essa reação, utilizou-se as mesmas concentrações de reagentes e programação do termociclador usadas para as demais.

Quadro 3.2. Programação do termociclador utilizada nas reações de HRM.

Etapa	Temperatura	Tempo	Repetições	Incremento de temperatura
Ativação da polimerase	95°C	5min	1x	NA
Desnaturação do DNA	95°C	10s	35x	NA
Anelamento / extensão	63°C	30s		NA
HRM	65°C-95°C		1x	0,1 °C a cada 2s

pb: pares de bases.

A análise dos dados gerados pelo termociclador foi realizada em *software* Rotor-gene Q (Qiagen). O software fornece dois gráficos em que é possível proceder-se à genotipagem: o gráfico de curvas normalizadas e o de diferença de curvas. Em ambos os casos, a temperatura, em graus Celcius ocupa o eixo X. No eixo Y, o primeiro gráfico apresenta fluorescência em porcentagem, enquanto o segundo, a fluorescência normalizada por um padrão escolhido. No gráfico de curvas normalizadas, distingue-se os homozigotos CC/GG e TT/AA por posição da curva. Enquanto os primeiros dissociam em maior temperatura, o segundo, em menor. O heterozigoto diferencia-se por formato da curva, como visualizado na Figura 3.1 (REJA *et al.*, 2010).

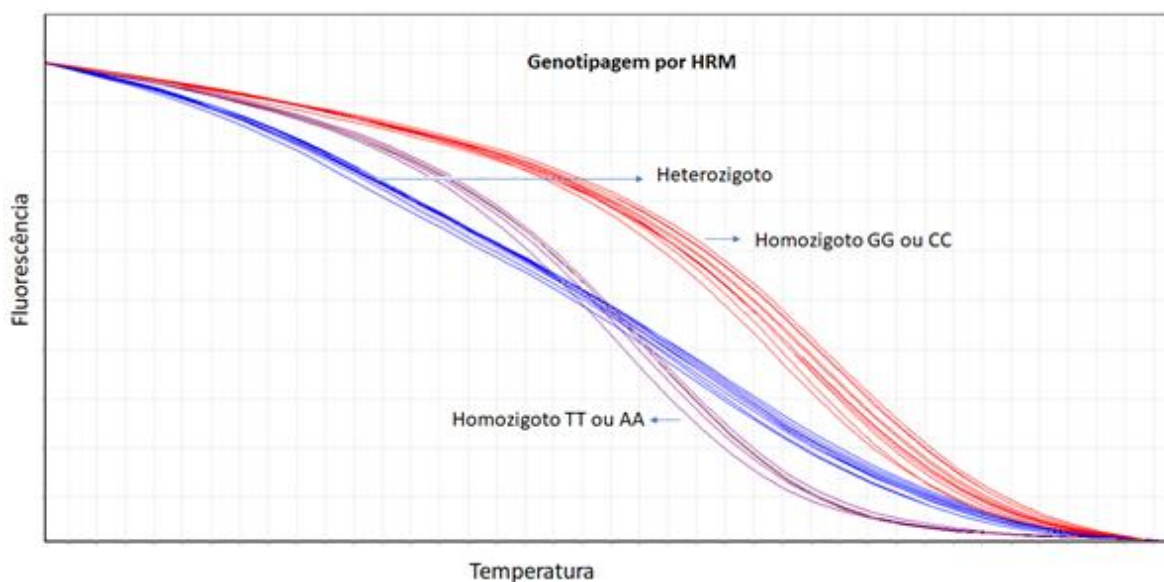


Figura 3.1. Exemplo de genotipagem por HRM. Cada curva representa uma amostra, e elas agrupam-se em três padrões distintos, correspondentes a cada genótipo. O padrão de curva do genótipo CC ou GG apresenta maior temperatura de dissociação da dupla fita, enquanto o do genótipo TT ou AA dissocia-se em menor temperatura. O heterozigoto apresenta uma curva intermediária com formato diferente das duas anteriores.

Reações que apresentaram os seguintes critérios foram excluídas da análise de HRM: 1) amplificação ineficaz; 2) picos inespecíficos na curva de dissociação; 3) curvas com padrões incompatíveis com os três genótipos possíveis para o polimorfismo. Os genótipos foram identificados através de comparação com amostras padrão previamente genotipadas por sequenciamento de Sanger. Todas as curvas e seus padrões são mostrados no Anexo II.

3.4.2. Genotipagem de CYP3A5 rs776746 por polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição

As amostras do grupo controle foram genotipadas para CYP3A5 rs776746 através de PCR – polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP), técnica em que após a amplificação da região de interesse, é realizada digestão com enzima de restrição. Nessa técnica, a presença de um dos alelos cria um sítio de restrição, em que a enzima cliva o DNA. Diferentes padrões de bandas são observados após eletroforese, distinguindo os genótipos.

O método foi realizado segundo protocolo descrito anteriormente por Van Schaik *et al.* (2002). Foi realizada uma PCR com volume final de 20 µL, na qual foram utilizados os seguintes reagentes: MgCl₂ (2,0 mM); Desoxirribonucleotídeos Trifosfato (dNTPs) (200 µM); oligonucleotídeos iniciadores (200 nM) (Quadro 3.3); Taq DNA polimerase (1 U); e DNA (40 ng). O termociclador Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems) foi programado para uma desnaturação inicial à 94°C por 7 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após os ciclos, houve uma etapa de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Quadro 3.3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para genotipagem de CYP3A5 rs776746.

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores	Comprimento do amplicon (pb)
CYP3A5	Senso: 5' CATCAGTTAGTAGACAGATGA 3'	293
	Anti-senso: 5' GGTCCAAACAGGGAAGAAATA 3'	

pb: pares de bases (VAN SCHAİK *et al.*, 2002)

Após a PCR, foi realizada digestão de 8,0 µL do produto com 2 U da endonuclease SspI (Fermentas) em volume final de 12,0 µL. A solução foi incubada a 37°C por 3 horas, seguida por inativação da enzima a 65°C por 20 minutos. Em seguida, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 2,5% pré corado com gel-red® (Biotium), a 100 volts por 90 minutos. Após essa etapa foi possível visualizar as bandas correspondentes aos fragmentos gerados na digestão enzimática (Quadro 3.4). A Figura 3.2 mostra um gel visualizado à luz ultravioleta após a eletroforese.

Quadro 3.4. Fragmentos formados pela digestão enzimática.

Genótipo	Comprimento dos Fragmentos formados (pb)
AA	168, 125
AG	168, 148, 125 e 20
GG	148, 125 e 20

Pb: pares de bases

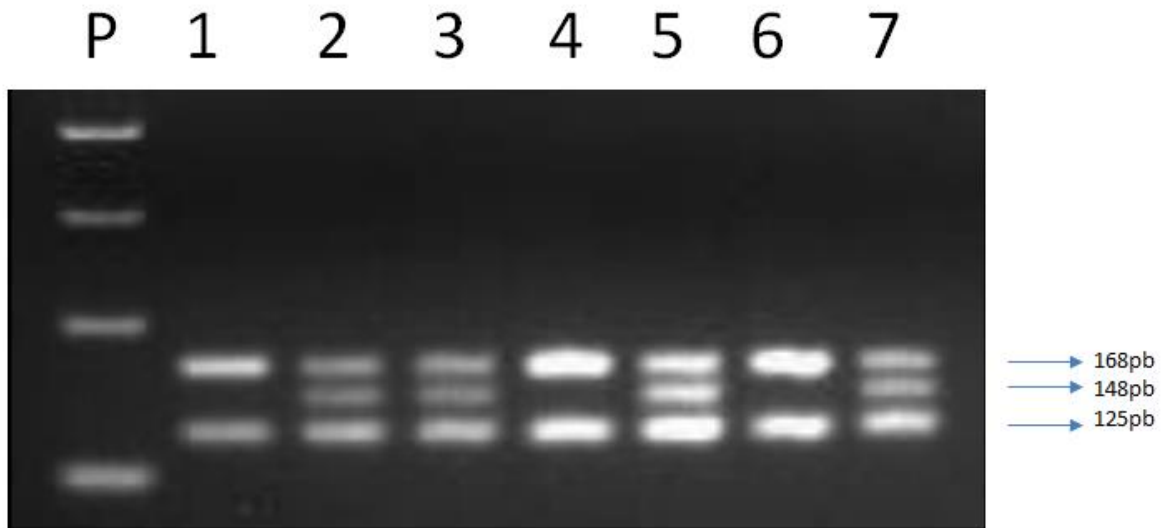


Figura 3.2. Gel de eletroforese para identificação de CYP3A5 rs776746. P: padrão de peso molecular de 100 pares de bases; 1, 4, 6: genótipo AA; 2, 3, 5, 7: genótipo AG.

3.4.3. Genotipagens para deleções de *GSTM1* e *GSTT1*

Para identificação das deleções em homozigose de *GSTM1* e *GSTT1*, foi realizada uma PCR multiplex com três pares de oligonucleotídeos iniciadores, conforme descrito anteriormente na literatura (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 1996). Os oligonucleotídeos utilizados e o comprimento do fragmento que eles geram após a PCR estão descritos no Quadro 3.5. Um fragmento do gene *CYP1A1* foi amplificado juntamente com os fragmentos de *GSTT1* e *GSTM1*, como controle interno da reação. A amplificação desse controle diferencia a deleção de ambos os genes em homozigose de reações cuja amplificação falhou.

Quadro 3.5. Oligonucleotídeos iniciadores para genotipagem de GSTM1 e GSTT1.

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores	Comprimento do fragmento amplificado (pb)
GSTT1	Senso: 5' TCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3'	480
	Anti-senso: 5' TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	
CYP1A1	Senso: 5' GAACTGCCACTTCAGCTGTCT 3'	312
	Anti-senso: 5' CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC 3'	
GSTM1	Senso: 5' GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3'	215
	Anti-senso: 5' GTTGGGCTCAAATATACGGTGG 3'	

pb: pares de bases. (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 1996)

Para essa reação, com volume final de 25 µL, foram utilizados os seguintes reagentes: MgCl₂ (1,5 mM); Desoxirribonucleotídeos Trifosfato (dNTPs) (200 µM); oligonucleotídeos iniciadores (300 nM); Taq DNA polimerase (1 U); e DNA (150 ng). O termociclador Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems) foi programado para uma desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 2 minutos, 59°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após os ciclos, houve uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Após a amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose a 2% a 110 volts por uma hora. Foi utilizado como intercalante de DNA, o brometo de etídio em pós-coloração por 15 minutos. Após essa etapa, o gel foi exposto à luz ultravioleta em transiluminador Gel Doc XR+ (Bio-Rad), em que é possível visualizar as bandas (Figura 3.3). A ausência de amplificação do controle interno foi interpretada como falha da reação. Amostras com deleção em homozigose de um dos genes avaliados não apresentam a banda relacionada a ele.

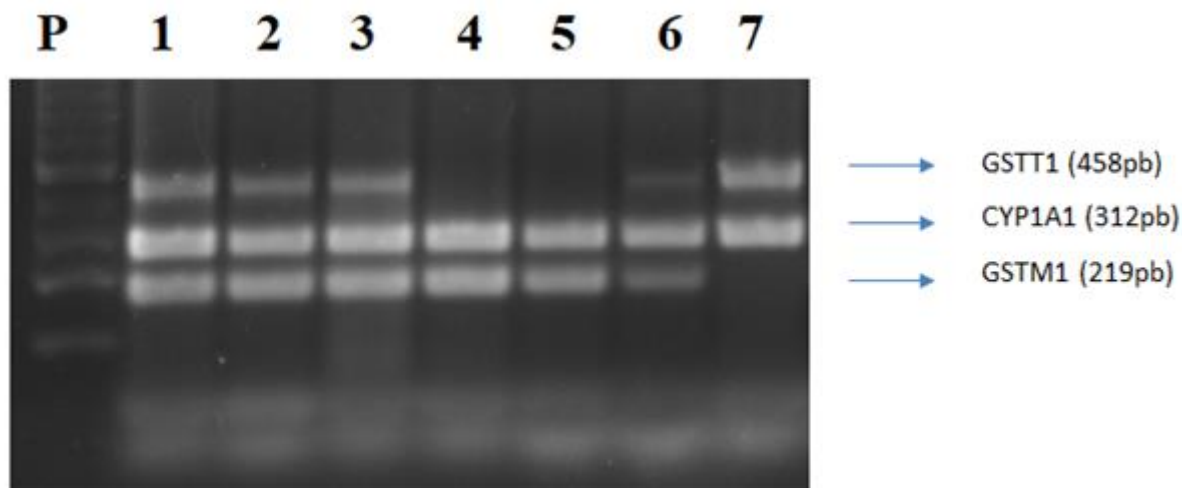


Figura 3.3. Gel de eletroforese para identificação de deleções em homozigose de *GSTT1* e *GSTM1*. P, padrão de peso molecular de 100 pares de bases; 1, 2, 3, 6: *GSTT1* não-nulo *GSTM1* não-nulo; 4, 5: *GSTT1* nulo *GSTM1* não-nulo; 7: *GSTT1* não-nulo *GSTM1* nulo.

3.5. Considerações éticas

Este projeto faz parte de um estudo epidemiológico-molecular denominado “Estudos de polimorfismos de genes do metabolismo de folato e metilação global em leucemias pediátricas”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em 28/04/2014, com o número de parecer 626.268 28 (ANEXO III). Os aspectos de diagnóstico de leucemia e disponibilidade das amostras estão contemplados no projeto “Estudos multi-institucional das leucemias infantis: contribuição dos marcadores imuno-moleculares na distinção de seus subtipos e de fatores de riscos etiopatogênicos – Acrônimo EMiLI”, aprovado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 33243214.7.0000.5274; e no CEP, com número do parecer 1.394.043 em 25 de Janeiro de 2016 (ANEXO IV).

3.6. Análises estatísticas

Para comparação de características demográficas entre casos e controles foi utilizado teste de qui-quadrado. O mesmo teste foi usado para verificar se as frequências genótípicas dos grupos estavam compatíveis com a lei de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Regressão logística uni e multivariada foram utilizadas para identificar as magnitudes de risco. Foi calculada a razão de chances (OR) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Considerou-se estatisticamente significativa um p-valor < 0,05. Os testes estatísticos foram realizados no *software* IBM SPSS Statistics®.

Foi considerado padrão para comparação com os outros genótipos (OR = 1,0), o homocigoto tipo selvagem, exceto para as deleções de *GSTT1* e *GSTM1*, em que o padrão foi a soma dos dois genótipos não nulos. Foram também realizadas análises nos modelos dominante (aa + Aa versus AA) e recessivo (aa versus Aa + AA) (INIESTA *et al.*, 2005). Foram realizadas análises estratificadas por sexo (masculino e feminino), cor de pele declarada pelos pais (brancos e não brancos), subtipo de LLA (LLA-cpB e LLA-T) e idade (≤ 5 anos e > 5 anos). O ponto de corte para estratificação por idade levou em consideração o fato de que a LLA de crianças com até cinco anos de idade é predominantemente de origem intrauterina, enquanto que em crianças mais velhas, tornam-se mais frequentes leucemias com alterações de origem pós-natal. Os polimorfismos em genes envolvidos nas mesmas vias ou que formam haplótipos foram analisados em combinação de dois genótipos.

4. RESULTADOS

4.1. Características dos sujeitos

Foram identificados 494 casos de LLA incidentes no período do estudo. Dez desses foram excluídos por tratar-se de casos com síndromes genéticas. Dos 484 elegíveis, tivemos acesso ao material biológico de 344 casos (71%). As análises dos casos incidentes cujos polimorfismos não foram avaliados são semelhantes em relação ao sexo, idade, cor de pele e subtipos de LLA, o que nos leva a crer que não foi introduzido viés na seleção dos casos (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Características demográficas dos casos genotipados e não genotipados, Brasil, 2012-2015.

Característica		Genotipados, n, 344 (%)	Não genotipados, n, 140 (%)	P-valor
Idade (anos)	Mediana	5,0 (0-19)	5,0 (0-19)	0,63
	≤5	190 (55,2)	74 (52,8)	
	>5	154 (44,8)	66 (47,2)	
Sexo	Masculino	212 (61,6)	86 (61,4)	0,97
	Feminino	132 (38,4)	54 (38,6)	
Cor da pele	Não-brancos	178 (51,7)	75 (53,6)	0,71
	Branços	166 (48,3)	65 (46,4)	
Subtipo de LLA	LLA-cpB	281 (81,7%)	123 (87,8)	0,09
	LLA-T	63 (18,3%)	17 (12,2)	

Abreviações: n, número; LLA, leucemia linfoblástica aguda; LLA-T, LLA de células T; LLA-cpB, LLA de células precursoras B; NA, não aplicável.

A Tabela 4.2 sumariza as principais características demográficas dos sujeitos do estudo. A mediana de idade dos casos foi de 5 anos, enquanto os controles foram amostras de recém-nascidos. Essa diferença entre os grupos, porém, não compromete a qualidade do estudo, já que a idade não altera os genótipos e a probabilidade de um dos controles incluídos desenvolver LLA posteriormente é muito baixa. Entre os casos, houve um predomínio do sexo masculino, com proporção de

1,6:1, enquanto entre os controles, essa proporção foi 1,2:1. Essa diferença não foi estatisticamente significativa. A distribuição das frequências da cor de pele mostrou equilíbrio de brancos e não brancos entre os casos, no entanto, no grupo controle observamos predomínio de não brancos ($p < 0,001$) (Tabela 4.2). Devido a essa diferença entre os grupos e considerando que a frequência dos genótipos é diferente nos distintos grupos étnicos, as análises de associações de risco foram ajustadas para cor de pele.

Tabela 4.2. Características demográficas de casos e controles, Brasil, 2012-2015.

Característica		Casos, n, 344 (%)	Controles, n, 358 (%)	p-valor
Idade (anos)	Mediana	5,0 (0-19)	0	NA
	≤5	190	358	
	>5	154	0	
Sexo	Masculino	212 (61,6)	197 (55,0)	0,08
	Feminino	132 (38,4)	161 (45,0)	
Cor da pele	Não-brancos	178 (51,7)	220 (61,5)	0,0005
	Brancos	166 (48,3)	118 (32,9)	
Subtipo de LLA	LLA-cpB	281 (81,7%)	NA	NA
	LLA-T	63 (18,3%)	NA	NA

Abreviações: n, número; LLA, leucemia linfoblástica aguda; LLA-T, LLA de células T; LLA-cpB, LLA de células precursoras B; NA, não aplicável. Em 20 controles (5,6%) não foi possível estabelecer a cor de pele.

Tanto os casos quanto os controles tiveram suas frequências genotípicas analisadas e dentro dos limites das leis de equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os polimorfismos avaliados (Tabela 4.3). Ressaltamos que como o método utilizado para identificar as deleções de GSTT1 e GSTM1 não é capaz de distinguir homozigotos não deletados de heterozigotos, não foi possível verificar o equilíbrio.

Tabela 4.3. Frequências alélicas e equilíbrio segundo as leis de Hardy-Weinberg entre casos e controles, Brasil, 2012-2015.

Polimorfismo	Frequencia do alelo variante	EHW (P-valor)
<i>MTHFR</i> rs1801133		
Casos	0,32	0,63
Controles	0,28	0,31
<i>CRHR1</i> rs242941		
Casos	0,41	0,84
Controles	0,40	0,58
<i>GLCCI1</i> rs37972		
Casos	0,36	0,79
Controles	0,31	0,40
<i>VDR</i> rs1544410		
Casos	0,34	0,87
Controles	0,34	0,15
<i>VDR</i> rs2228570		
Casos	0,36	0,83
Controles	0,31	0,60
<i>CYP3A5</i> rs776746		
Casos	0,66	0,25
Controles	0,63	0,21

Abreviações: EHW, equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4.2. Associações entre genótipos e o risco para LLA

As análises detalhadas das associações entre os genótipos e o risco para LLA pediátrica estão contidas no Anexo IV (Tabelas 8.1 a 8.5). Os resultados mais importantes foram expostos em gráficos para facilitar a visualização.

Os percentuais de perdas por falha na reação ou DNA insuficiente para genotipagem de todos polimorfismos foram, em casos e controles respectivamente: 4% e 3% para *MTHFR* rs1801133; 5% e 4% para *CRHR1* rs242941; 2% e 4% para *GLCCI1* rs37972; 3% e 3% para *VDR* rs1544410; 3% e 4% para *VDR* rs2228570; 7% e 3% para *CYP3A5* rs776746; e 11% e 3% para as deleções de *GSTM1* e *GSTT1*.

4.2.1. *MTHFR* rs1801133

Em análise não estratificada, o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 não foi associado ao risco para LLA (Tabela 8.1). Quando realizamos a estratificação por cor de pele, esse SNP mostrou efeitos distintos. Em crianças não brancas, houve um resultado limítrofe com a significância estatística para aumento de risco conferido pelo genótipo TT (OR 2,49; IC95% 0,99-6,25) e pelo modelo dominante (OR 1,49; IC95% 0,99-2,24). Já entre os brancos, o polimorfismo reduziu o risco no modelo recessivo (OR 0,51; IC95% 0,26-0,99). Esses dados estão sumarizados na Figura 4.1. Quanto à estratificação por idade, as análises brutas mostraram aumento do risco para LLA apenas entre menores de cinco anos para o genótipo CT (OR 1,53; IC95% 1,05-2,23) e para o modelo dominante (OR 1,49; IC95% 1,04-2,14). Após ajuste por cor de pele, porém, essa associação não foi estatisticamente significativa (Tabela 8.4).

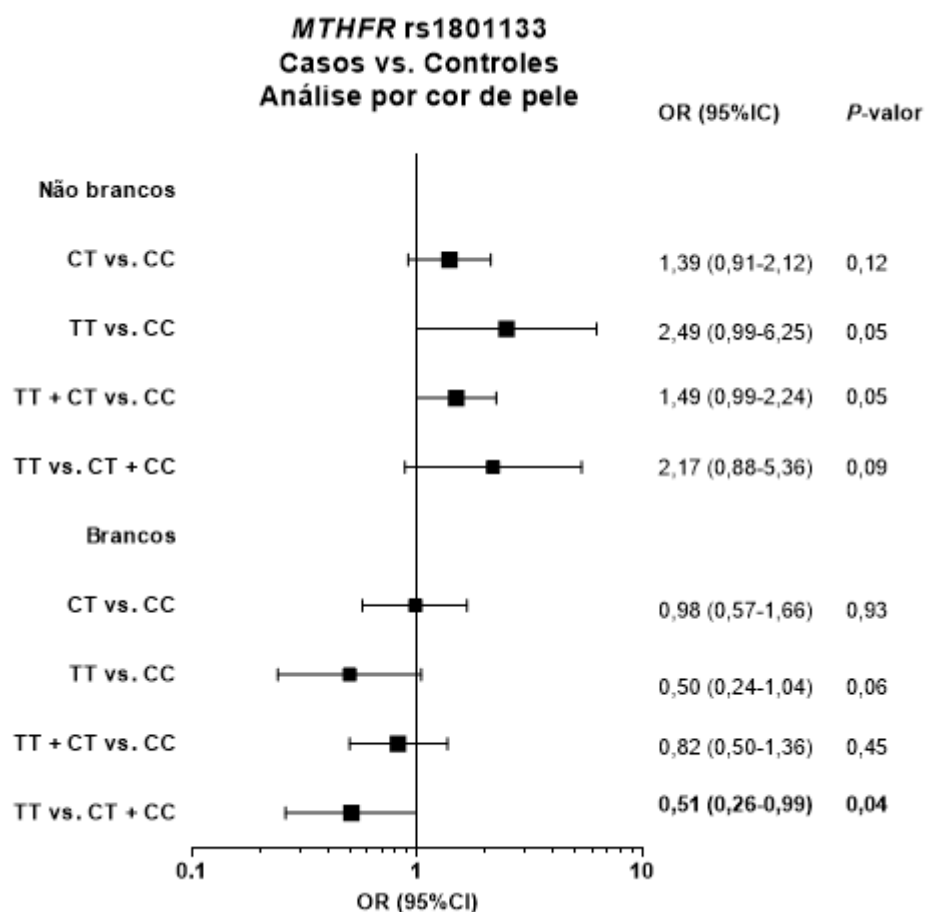


Figura 4.1. Associações entre o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 e o risco para LLA de acordo com a cor de pele. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus.

4.2.2. *CRHR1* rs242941 e *GLCCI1* rs37972

Quanto aos polimorfismos em genes envolvidos na ação e secreção de glicocorticoides, o genótipo TT para *GLCCI1* rs37972 foi associado ao risco para LLA em análise bruta (OR 1,71; IC95% 1,03-2,85) (Tabela 8.1). Em análise ajustada, esse SNP mostrou valores próximos à significância para o genótipo TT (OR 1,64; IC95% 0,98-2,76) e para o modelo recessivo (OR 1,59; IC95% 0,98-2,58) (Figura 4.2).

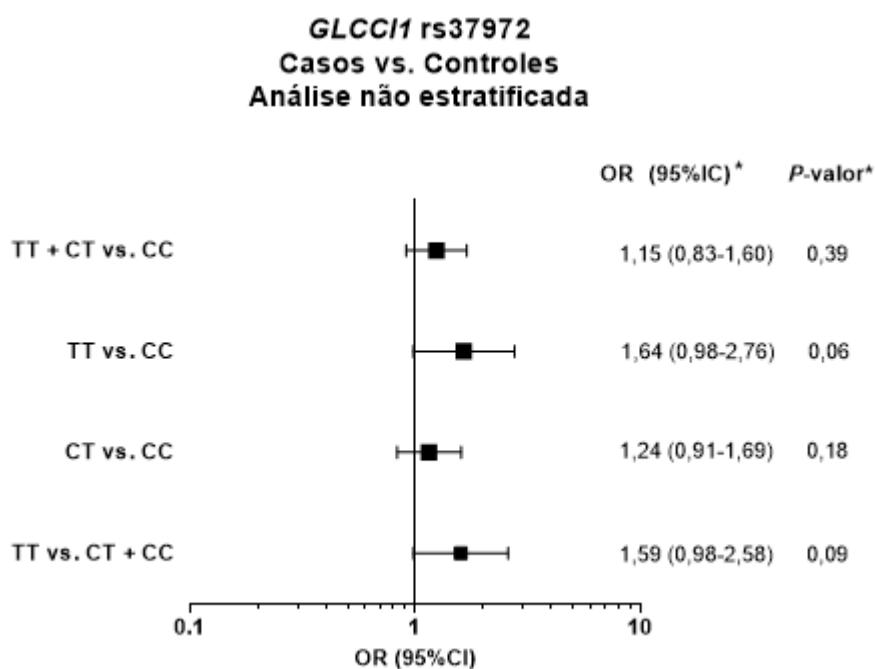


Figura 4.2. Associações entre o polimorfismo *GLCCI1* rs37972 e o risco para LLA em análise não estratificada. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus.*Ajustado por cor de pele.

Quando analisamos as magnitudes de riscos conferidas por esse polimorfismo de acordo com o subtipo de LLA, verificamos que a associação identificada na análise não estratificada ocorre apenas em LLA-cpB, e não em LLA-T. O genótipo TT, em comparação com o tipo selvagem CC, aumentou o risco para LLA-cpB (OR 1,78 IC95% 1,04-3,06). A Figura 4.3 sumariza os resultados referentes à análise por subtipo de LLA.

GLCCI1 rs37972
Casos vs. Controles
Análise por subtipos de LLA

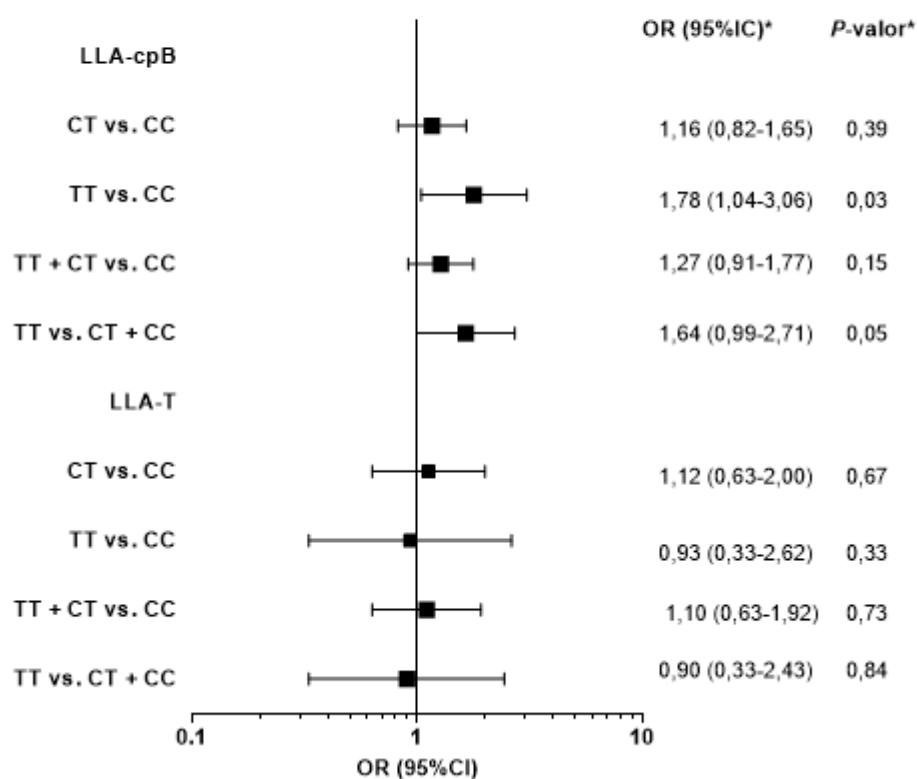


Figura 4.3. Associações entre o polimorfismo *GLCCI1* rs37972 e o risco para LLA de acordo com o subtipo da doença. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus. *Ajustado por cor de pele.

Na análise estratificada por idade ao diagnóstico da LLA, o genótipo TT apresentou associação direta limítrofe com a significância estatística entre crianças com até cinco anos (OR 1,81 IC95% 1,00-3,28), enquanto que entre as crianças mais velhas, o polimorfismo não alterou o risco para a doença. Os dados referentes à análise desse SNP por idade são mostrados na Figura 4.4.

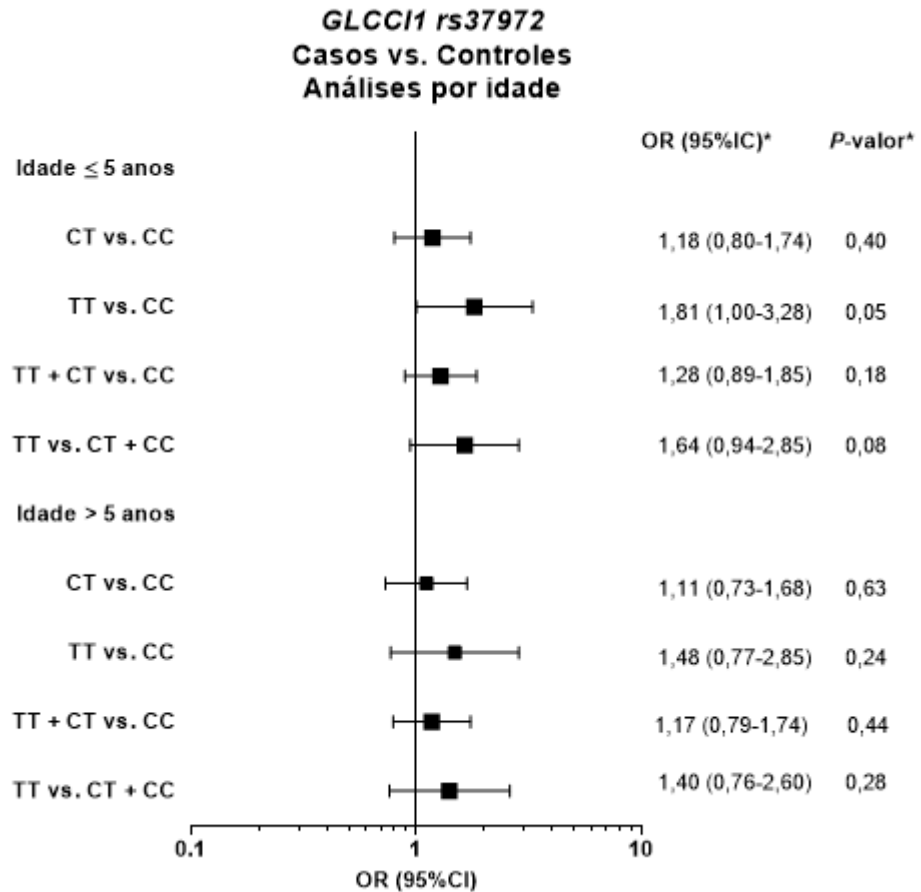


Figura 4.4. Associações entre o polimorfismo *GLCC11* rs37972 e o risco para LLA de acordo com a idade. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus. *Ajustado por cor de pele.

Embora as análises brutas tenham mostrado uma associação direta entre esse polimorfismo e o risco para LLA entre crianças do sexo masculino, após o ajuste por cor de pele, esse SNP não foi associado ao risco em análise estratificada por sexo. (Tabela 8.5). O polimorfismo *CRHR1* rs242941 não foi associado ao risco para LLA em nenhuma das análises realizadas.

4.2.3. *VDR* rs1544410 e *VDR* rs2228570

Nosso estudo investigou os efeitos de dois polimorfismos (rs1544410 rs2228570) no gene *VDR*, que codifica o receptor de vitamina D, sobre o risco para LLA. O genótipo TT para rs2228570 foi associado a aumento do risco para LLA em análise não estratificada (OR 1,85 IC95% 1,07-3,20), como mostrado na Figura 4.5.

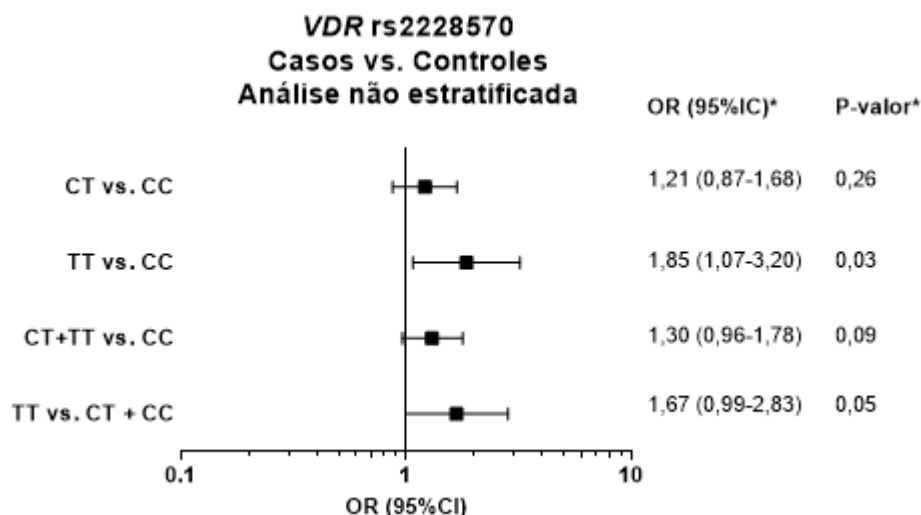


Figura 4.5. Associações entre o polimorfismo *VDR* rs2228570 e o risco para LLA em análise não estratificada. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus.*Ajustado por cor de pele.

A análise estratificada por subtipo de LLA mostrou que o alelo T para esse SNP foi fortemente associado ao risco para LLA-cpB, como verificado nas análises para o genótipo TT (OR 2,02 IC95% 1,14-3,56) e para o modelo recessivo (OR 1,79 IC95% 1,04-3,06). Para LLA-T, no entanto, essa variante não foi associada ao risco (Figura 4.6).

VDR rs2228570
Casos vs. Controles
Análise por subtipo de LLA

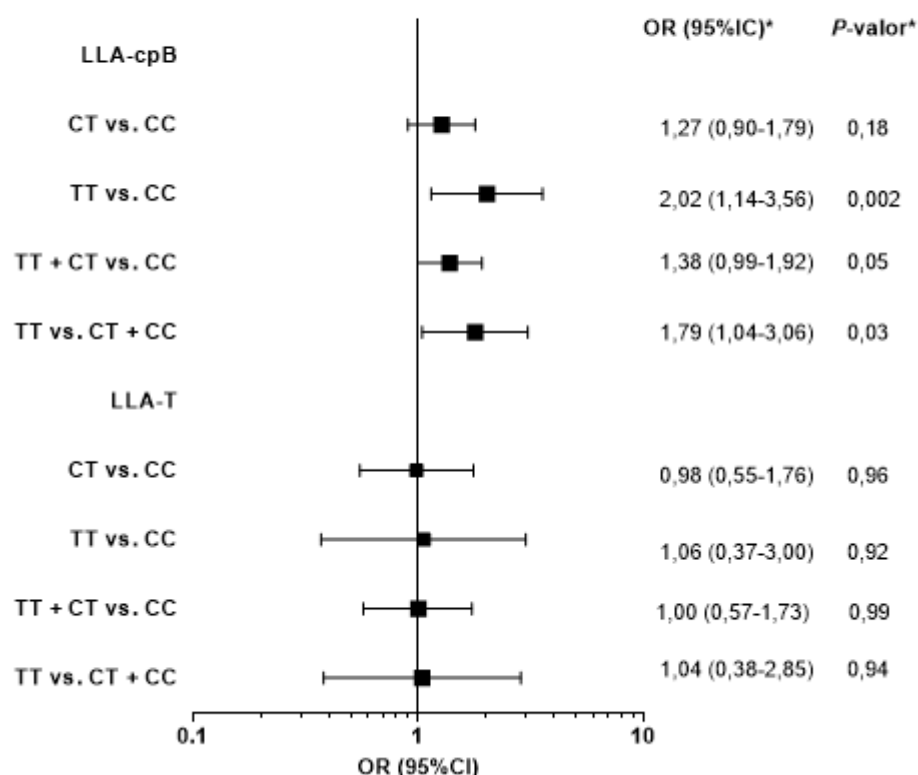


Figura 4.6. Associações entre o polimorfismo *VDR* rs2228570 e o risco para LLA de acordo com o subtipo da doença. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus. *Ajustado por cor de pele.

Quando avaliamos o efeito desse polimorfismo de acordo com a idade ao diagnóstico, verificamos que o aumento do risco conferido por essa variante se deu principalmente entre crianças diagnosticadas após os cinco anos de idade, que tiveram tempo maior de exposição a fatores de risco ambientais e apresentam menor frequência de alterações genéticas de origem intrauterina. O genótipo TT (OR 2,13; IC95% 1,10-4,12) e o modelo recessivo (OR 1,96; IC95% 1,05-3,63) foram associados ao risco para LLA entre crianças com idade superior a cinco anos (Figura 4.7).

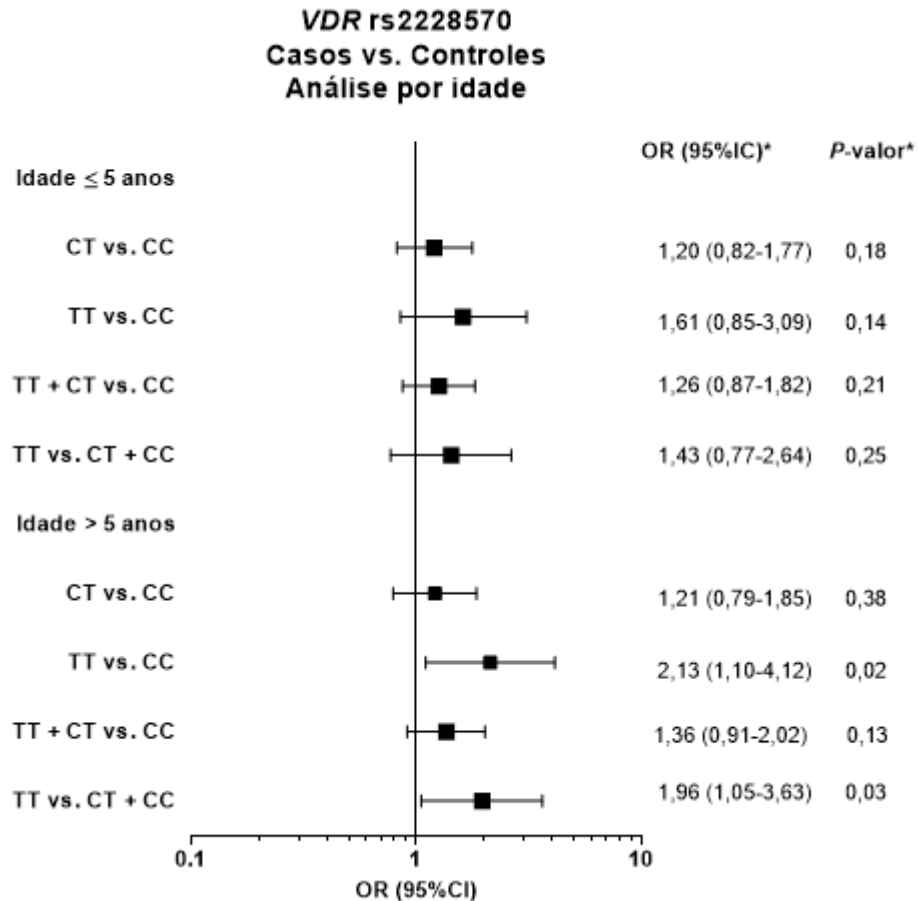


Figura 4.7. Associações entre o polimorfismo *VDR* rs2228570 e o risco para LLA de acordo com a idade. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus. *Ajustado por cor de pele.

O efeito de *VDR* rs2228570 diferiu conforme a cor de pele, tendo o genótipo TT aumentado o risco apenas entre crianças não brancas (OR 2,32; IC95% 1,06-5,07). A análise estratificada por sexo mostrou que as crianças do sexo feminino são mais suscetíveis ao efeito desse polimorfismo. Nesse grupo, os genótipos CT (OR 1,80; IC95% 1,08-2,99) e TT (OR 2,63; IC95% 1,13-6,09), além do modelo dominante (OR 1,93; IC95% 1,19-3,15) foram associados ao risco para LLA, enquanto nenhum dos genótipos alterou o risco em crianças do sexo masculino. As análises estratificadas por sexo e cor de pele estão ilustradas na Figura 4.8.

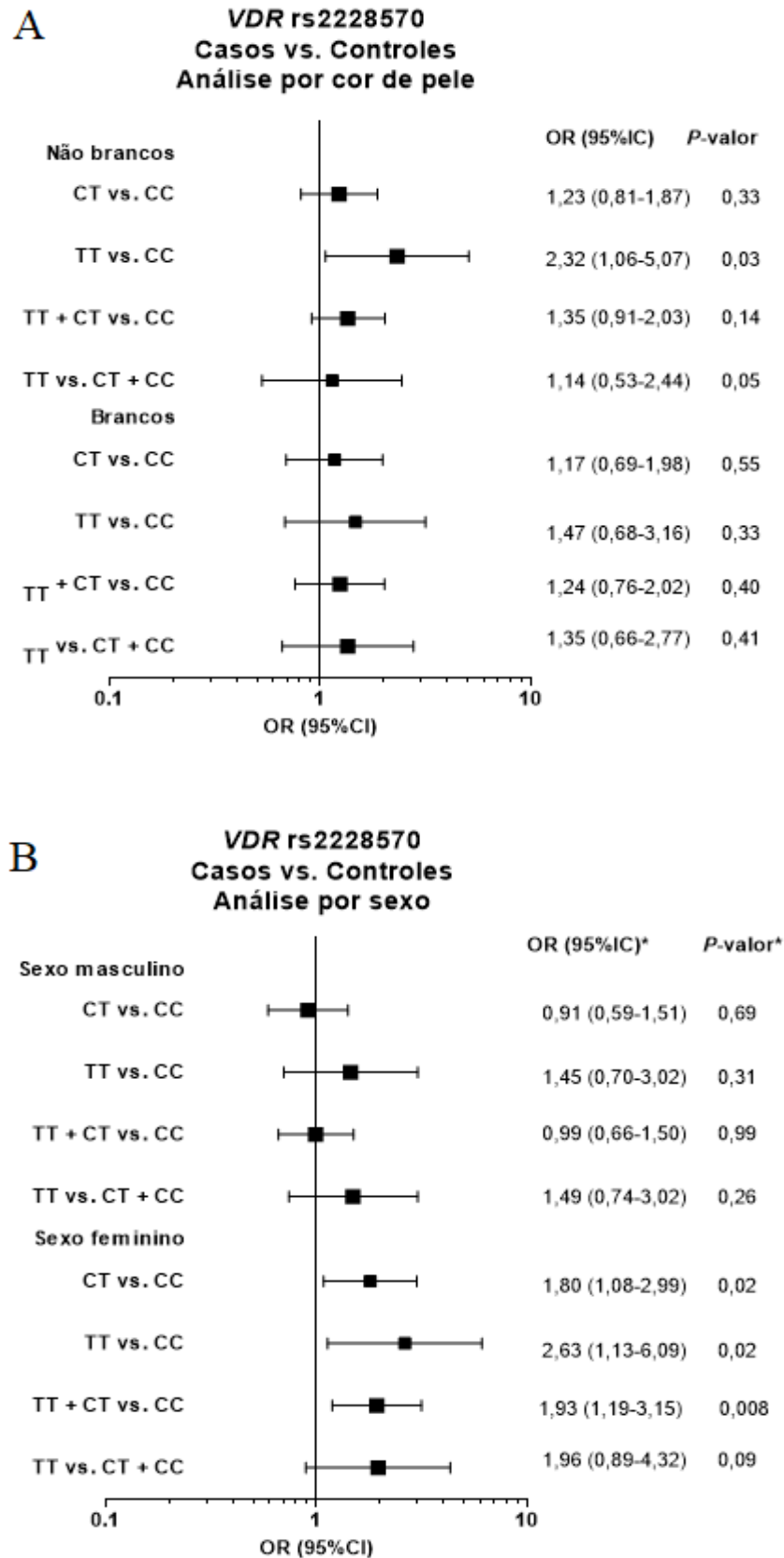


Figura 4.8. Associações entre o polimorfismo *VDR* rs2228570 e o risco para LLA de acordo sexo e cor de pele. A. Análises por cor de pele B. Análises por sexo. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus. *Ajustado por cor de pele.

Já o polimorfismo *VDR* rs1544410 foi inversamente associado com o risco para LLA entre crianças do sexo feminino no modelo recessivo (OR 0,42; IC95% 0,20-0,86). Como houve uma variação grande entre as frequências do genótipo TT entre os controles dos sexos masculino e feminino, não atribuímos essa associação a um fenômeno biológico (Tabela 8.5).

4.2.4. *CYP3A5* rs776746 e deleções de *GSTM1* e *GSTT1*

Nosso estudo investigou o papel de três variantes em genes que codificam enzimas de biotransformação de xenobióticos, sendo elas, o SNP *CYP3A5* rs776746, responsável pela ausência de expressão da enzima de fase 1 *CYP3A5*, e as deleções completas dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, que participam da fase 2 da biotransformação. O genótipo GG para *CYP3A5* rs776746 foi associado com o risco para LLA-T em análise bruta (OR 3,68; IC95% 1,08-12,55), porém, em análise ajustada, essa associação não foi estatisticamente significativa (Tabela 8.2). Já a deleção de *GSTM1* foi associada ao risco para LLA-cpB em análise bruta (OR 2,09; IC95% 1,45-3,02), associação que também não se manteve após o ajuste (Tabela 8.2).

A deleção em homozigose de *GSTT1* foi um forte fator de risco para LLA em nossas análises. Esse polimorfismo aumentou o risco para a doença em análise não estratificada (OR 2,04; IC95% 1,42-2,94) e em todos os estratos de sexo, idade e cor de pele. Seu efeito, porém, restringiu-se à LLA-cpB, não tendo alterado significativamente o risco para LLA-T, assim como os demais polimorfismos investigados. As análises referentes a essa variante estão ilustradas na Figura 4.9).

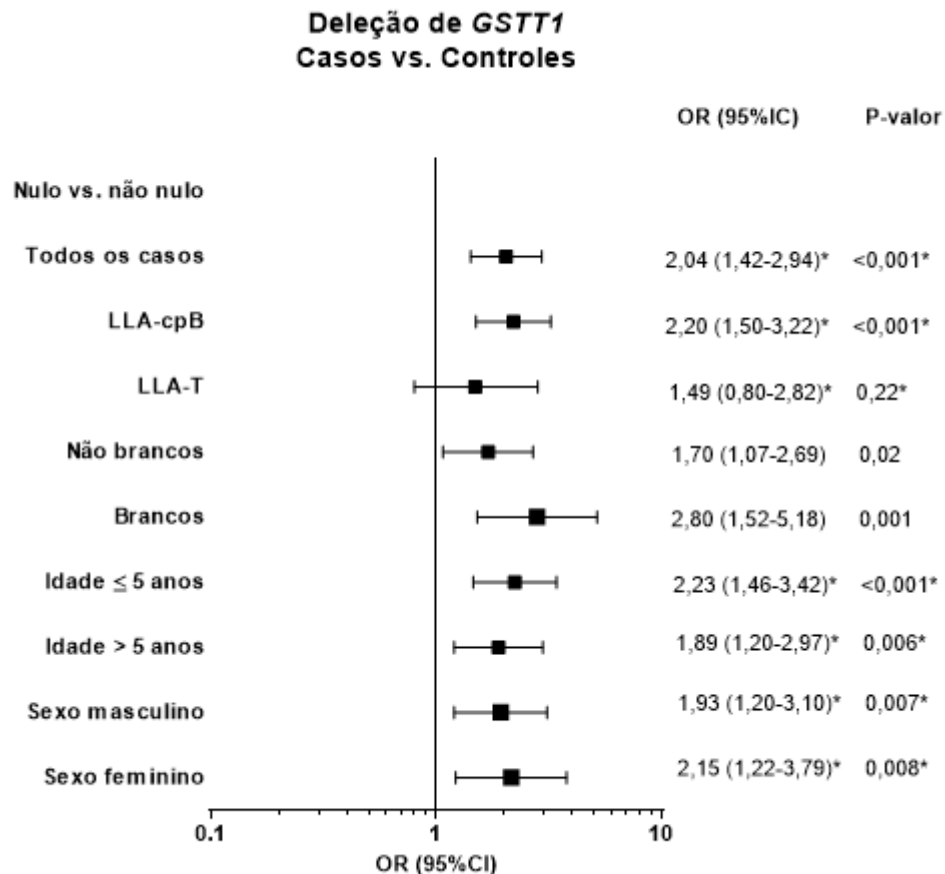


Figura 4.9. Associações entre o genótipo *GSTT1* nulo e o risco para LLA em análises geral e estratificadas. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus. *Ajustado por cor de pele.

4.2.5. Combinações genotípicas e o risco para LLA

Considerando que interações gene-gene podem influenciar o efeito dos genótipos sobre o fenótipo, investigamos o efeito de combinações genotípicas sobre o risco para LLA. Foram realizadas as seguintes combinações genotípicas: 1) os dois polimorfismos envolvidos na atuação dos glicocorticoides (*GLCCI1* rs37972 e *CRHR1* rs242941); 2) os SNPs em *VDR*, que podem determinar conjuntamente a atividade da enzima (*VDR* rs2228570 e rs1544410); 3) ambos os SNPs em *VDR*, que influenciam a expressão de enzimas da família *CYP3A*, e a variante *CYP3A5* rs776746; 4) *CYP3A5* rs776746, que reduz a eficiência da fase 1 de biotransformação, com as deleções de *GSTT1* e *GSTM1*, que prejudicam as reações de fase 2; 5) as deleções de *GSTT1* e *GSTM1*, que podem conjuntamente alterar a conjugação com glutatona de xenobióticos. Os resultados detalhados das combinações genotípicas estão expostos na Tabela 8.6.

Quanto aos SNPs em VDR, a combinação do genótipo TT para rs2228570 com o homocigoto tipo selvagem GG para rs1544410 aumentou o risco para LLA quando comparada a ambos os tipos selvagens combinados (OR 2,92; IC95% 1,25-6,83). Os resultados para as combinações rs2228570 e rs1544410 estão ilustrados na Figura 4.10.

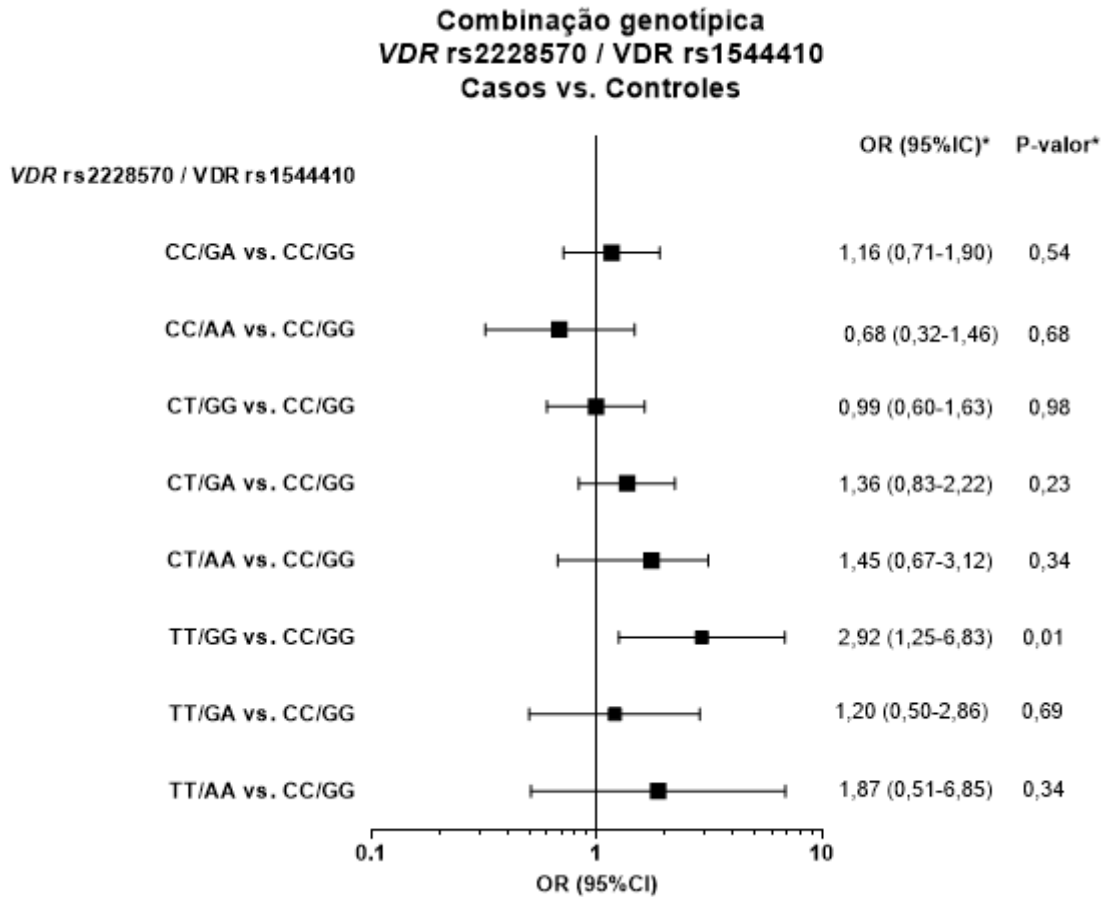


Figura 4.10. Associações entre combinações genotípicas dos polimorfismos rs2228570 e rs1544410 em VDR e o risco para LLA. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus. *Ajustado por cor de pele.

Quanto aos polimorfismos em genes que codificam enzimas de biotransformação de xenobióticos, a ocorrência concomitante de *CYP3A5* rs776746 AG e *GSTT1* nulo aumentou o risco para LLA (OR 2,02; IC95% 1,01-4,03) (Figura 4.11). A análise da combinação das deleções de *GSTT1* e *GSTM1* revelou que o genótipo nulo para *GSTT1* aumenta o risco para LLA mesmo combinado com *GSTM1* não nulo (OR 1,99 IC95% 1,19-3,35). A combinação de ambas as deleções, porém, apresentou magnitude de risco maior (OR 2,26 IC95% 1,39-3,68) (Figura 4.12).

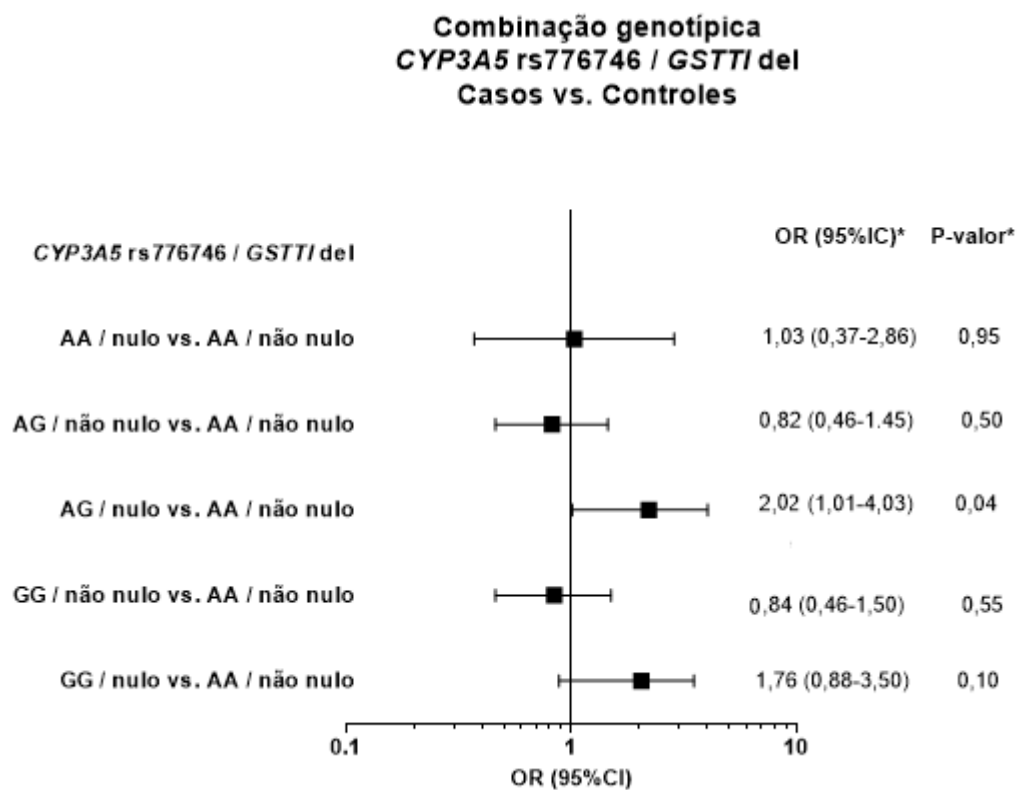


Figura 4.11. Associações entre combinações genotípicas dos polimorfismos *CYP3A5* rs776746 e *GSTT1* del e o risco para LLA. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus; del, deleção. *Ajustado por cor de pele.

**Combinação genotípica
GSTT1 del / GSTM1 del
Casos vs. Controles**

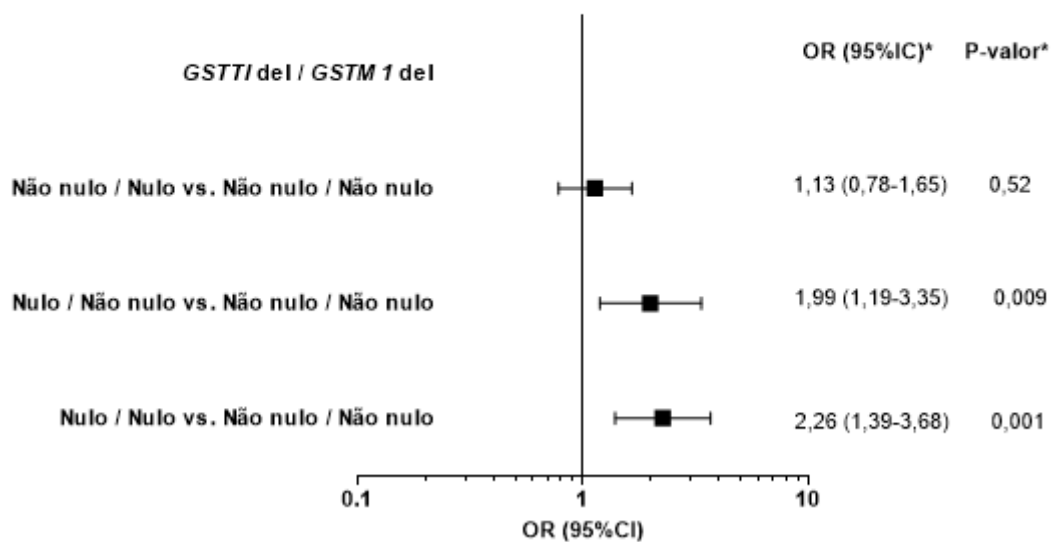


Figura 4.12. Associações entre combinações genotípicas dos polimorfismos *GSTT1* del e *GSTM1* del e o risco para LLA. OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; vs, versus; del, deleção. *Ajustado por cor de pele.

5. DISCUSSÃO

A LLA pediátrica é uma doença que na maioria das vezes tem origem na vida intrauterina, durante a qual as questões relacionadas à vida materna, como exposição a carcinógenos e alimentação interagem com o perfil genético do feto na gênese da alteração genética fundadora. Essa alteração ainda não é suficiente para causar a doença, sendo necessária a aquisição de outras mutações após o nascimento, quando novamente fatores genéticos e ambientais influenciam a eliminação dos clones leucêmicos ou a sobrevivência dessas células e surgimento das mutações secundárias. Corroboram com esse modelo, diversos estudos que identificaram fatores genéticos e ambientais, relacionados aos períodos intrauterino e pós-natal como capazes de influenciar o risco para LLA (WHITEHEAD *et al.*, 2016; GREAVES, 2018;).

Quanto à vida materna, algumas das principais questões investigadas são referentes à alimentação e à exposição a carcinógenos ambientais. Maior ingestão de frutas e hortaliças é um fator protetor, fato que pode ser explicado em parte por serem fontes naturais de nutrientes envolvidos no metabolismo de um carbono. Estudos que avaliaram a ingestão de nutrientes específicos verificaram que maior ingestão de folato e vitaminas B12, B6 e B2 é associada a redução do risco, bem como a suplementação com ácido fólico antes e durante a gestação (WHITEHEAD *et al.*, 2016). Quanto ao papel dos carcinógenos químicos, a exposição a pesticidas, tabaco, tintas, solventes, poluentes do ar e da água, medicamentos (dipirona, metronidazol e anticoncepcionais) e cosméticos já foram diretamente associadas ao risco para LLA (POMBO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2012; COUTO *et al.*, 2013; WHITEHEAD *et al.*, 2016).

Após o nascimento, tornam-se relevantes fatores relacionados ao desenvolvimento do sistema imunológico, sendo a exposição precoce a antígenos crucial para esse processo. Já foi demonstrado que exposição a infecções em idades precoces reduz o risco para LLA (MAIA; WUNSCH-FILHO, 2013). Outro conhecido fator protetor para LLA é aleitamento materno, e sabe-se que o leite contém microorganismos, antígenos, citocinas, proteínas imunoestimulantes e fatores bifidogênicos, que contribuem para o desenvolvimento de um sistema imunológico eficaz (GUISE *et al.*, 2005; HENRICK *et al.*, 2017). Além de o sistema imune poder eliminar células pré-leucêmicas diretamente, uma resposta inflamatória eleva a

secreção de glicocorticoides endógenos, potentes agentes anti-leucêmicos (SCHMIEGELOW *et al.*, 2008).

Polimorfismos genéticos acarretam em maior ou menor sensibilidade às exposições ambientais, podendo intermediar a associação entre o ambiente e a leucemogênese. Variantes em genes que participam da diferenciação celular de linfócitos, do sistema imune, do metabolismo de folatos e do sistema de reparo do DNA já foram associados ao risco para LLA (BRISSEON *et al.*, 2015). Nesse sentido, nosso estudo abordou alguns polimorfismos em genes do metabolismo de xenobióticos e outros que além de participarem indiretamente desse processo, controlam processos endógenos importantes para a leucemogênese, como o metabolismo dos folatos, a ação de glicocorticoides e da vitamina D.

Embora o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 tenha sido abordado por numerosos estudos, não há consenso quanto a seu papel na leucemogênese. Enquanto estudos individuais apresentam resultados discordantes, uma metanálise que incluiu 35 estudos de caso-controle em população pediátrica, identificou ausência de associação entre o SNP e o risco para LLA (LI *et al.*, 2015). O efeito dessa variante é modulado por outros fatores, como o estado nutricional de folatos e outros nutrientes envolvidos no metabolismo de um carbono, a suplementação com ácido fólico durante a gestação, o uso de álcool e a presença de outras variantes em genes importantes para o metabolismo de um carbono (MILNE *et al.*, 2015). Sendo assim, em populações expostas a diferentes fatores ambientais e com características genéticas distintas, esse polimorfismo pode desempenhar papéis diferentes.

Nossos resultados mostraram que o SNP *MTHFR* rs1801133 apresenta efeitos diferentes a depender da cor de pele. Entre crianças brancas, o genótipo homocigoto variante reduziu o risco para LLA, enquanto um valor próximo à significância para aumento de risco foi observado entre não brancos. A ancestralidade genética da população brasileira é majoritariamente de origem europeia e africana, enquanto os ameríndios contribuem com uma parcela menor. Embora os brasileiros autodeclarados brancos e pretos sejam geneticamente distintos respectivamente de europeus e africanos, a cor de pele serve como marcador da proporção em que cada origem contribui com os marcadores de ancestralidade genética (SUAREZ-KURTZ *et al.*, 2014). Nossos achados são coerentes com o fato de que os estudos realizados em populações de origem europeia identificaram associação inversa ou nula entre o

SNP e a LLA (OLIVEIRA *et al.*, 2005; SCHNAKENBERG *et al.*, 2005; CHATZIDAKIS *et al.* 2006; PETRA *et al.*, 2007; DE JONGE *et al.* 2009; DAMNJANOVIC *et al.*, 2010; LIGHTFOOT *et al.*, 2010; LAUTNER-CSORBA *et al.*, 2013; KREILE *et al.*, 2014; GORIČAR *et al.*, 2015). Já aumento do risco foi descrito em populações da Índia e do Brasil (SOOD *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013).

Além do nosso, três estudos de caso-controle investigaram o papel de *MTHFR* rs1801133 sobre o risco para LLA na população brasileira. Franco *et al.* (2001) incluíram 71 crianças com LLA provenientes da região Sudeste do Brasil, e o mesmo número de controles de origem hospitalar. A amostra foi majoritariamente de crianças de cor de pele brancas (90%). Apesar do reduzido número amostral, foi identificada redução do risco associada ao genótipo TT (OR 0,3 IC95% 0,09- 0,80). Esse resultado é semelhante ao que verificamos entre crianças de cor de pele branca. Posteriormente, Zanrosso *et al.* (2005) incluíram 176 pacientes com LLA pediátrica e 199 controles. Semelhantemente aos nossos resultados, a análise da totalidade dos casos não mostrou associação significativa. Após estratificação por cor de pele, porém, verificaram resultados divergentes dos nossos. O genótipo CT reduziu o risco apenas entre crianças não brancas (OR 0,46 IC95% 0,22–0,97). Já Silva *et al.* (2013) incluíram 144 casos e 224 controles provenientes de um hospital situado na região Nordeste do Brasil. Esse estudo verificou aumento do risco para LLA de 1,6 vezes conferido pelo genótipo CT, e não levou em consideração a cor de pele dos pacientes.

Em nosso estudo, as análises brutas mostraram associação direta entre o genótipo *MTHFR* rs1801133 CT e o risco para LLA entre crianças com idade menor ou igual a cinco anos. Embora após o ajuste por cor de pele essa diferença tenha perdido a significância estatística, é possível que esse resultado seja explicado pela biologia da doença. A maioria das leucemias da primeira infância apresentam origem intrauterina, e nessa fase da vida, o metabolismo de um carbono exerce importante papel no estabelecimento do padrão de metilação do DNA. Após a fertilização do óvulo, todo o padrão de metilação herdado dos pais é apagado e posteriormente reestabelecido, o que demanda eficácia na produção de doadores do radical metil. Sabe-se que a deficiência de folato e outros nutrientes relacionados ao metabolismo de um carbono podem gerar hipometilação global, hipometilação de regiões promotoras de oncogenes e hipermetilação de genes supressores de tumor. Como o polimorfismo *MTHFR* rs1801133 reduz a capacidade de sintetizar SAMe e portanto, a eficácia do metabolismo de um carbono, na LLA da primeira infância, o efeito pró-

leucemogênico dessa variante pode prevalecer (CRIDER *et al.*, 2012; CHANG *et al.*, 2013; GREAVES, 2018).

Os glicocorticoides são capazes induzir células imaturas da linhagem linfóide à morte celular programada, motivo pelo qual análogos do cortisol estão entre os principais fármacos utilizados na fase de indução do tratamento da LLA. Uma das principais hipóteses para a etiologia da LLA-cpB se baseia na premissa de que maiores níveis séricos de cortisol podem eliminar clones pré-leucêmicos antes de adquirirem mutações adicionais e o fenótipo maligno (SCHMIEGELOW *et al.*, 2008). Embora essa hipótese seja suportada por uma importante base epidemiológica e biológica, o papel de polimorfismos em genes relacionados à fisiologia dos glicocorticoides na leucemogênese não havia sido explorado anteriormente.

Os polimorfismos em genes que controlam a secreção e a ação de glicocorticoides foram estudados principalmente quanto à resposta ao tratamento com glicocorticoides exógenos. Polimorfismos no gene *GLCC11*, por exemplo, foram associados a reduzida resposta a glicocorticoides em indivíduos asmáticos, tanto por GWAS quanto por estudos com abordagem gene candidato (KESKIN *et al.*, 2019). Esse gene codifica uma proteína cuja exata função não é bem conhecida, mas sabe-se que exerce um papel na ativação do receptor de glicocorticoides e na indução de apoptose em resposta a essas substâncias (HU *et al.*, 2018; TANTISIRA *et al.*, 2011). Esse gene apresenta dois polimorfismos importantes, (rs37972 e rs37973) que estão em desequilíbrio de ligação completo, sendo necessário avaliar apenas um deles para testar o efeito das variantes em *GLCC11* (HAMADA *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, o genótipo TT de *GLCC11* rs37972 foi associado a aumento do risco para LLA-cpB e não modificou o risco para LLA-T. Esse resultado corrobora com a hipótese adrenal para a leucemogênese, segundo a qual a exposição a picos de cortisol durante os primeiros anos de vida eliminaria células pré-leucêmicas da linhagem B, que também apresentam melhor resposta aos glicocorticoides exógenos durante o tratamento (SCHMIEGELOW *et al.*, 2008). O aumento do risco ocorreu entre crianças com idade menor ou igual a cinco anos, o que também está de acordo com a hipótese adrenal da leucemogênese. Nessa faixa etária concentra-se a maior parte dos casos de LLA com HeH e *ETV6-RUNX1*, alterações originadas na vida intrauterina, que necessitariam de mutações adicionais para adquirir fenótipo

leucêmico, mas poderiam ser eliminadas precocemente pela exposição aos glicocorticoides.

Outro importante gene polimórfico relacionado à fisiologia dos glicocorticoides é *CRHR1*, que é responsável por grande parte da variabilidade interindividual na atuação do eixo HPA e na secreção de cortisol. Os polimorfismos nesse gene reduzem a expressão do receptor e são associados a melhor resposta a glicocorticoides inalados em indivíduos asmáticos (DUONG-THI-LY *et al.*, 2017). Embora polimorfismos nesse gene não tenham sido estudados quanto a seu papel na leucemogênese, dois estudos avaliaram o efeito do SNP *CRHR1* rs242941 nos efeitos tóxicos dos glicocorticoides no tratamento da LLA pediátrica. Jones *et al.* (2008) verificaram que esse polimorfismo é associado a menor densidade mineral óssea e Kandem *et al.* (2008) identificaram que esse SNP está entre os preditores de hipertensão secundária ao tratamento (JONES *et al.*, 2008; KANDEM *et al.*, 2008). Embora seja biologicamente plausível, a associação entre esse SNP e o risco para LLA não foi verificada em nosso estudo. Esse fato pode estar relacionado com a não avaliação de outros polimorfismos nesse gene que também alteram sua expressão.

A vitamina D desempenha importante papel em processos relacionados à carcinogênese, como proliferação celular, apoptose, autofagia, inflamação e eliminação de carcinógenos. Especificamente em células do sistema imune, a vitamina D estimula a ação de fagócitos e reduz a proliferação de células da linhagem linfóide. Por conta de seu efeito anti-proliferativo em células de LLA, análogos de vitamina D têm sido testados em estudos pré-clínicos e mostrado efeitos promissores como possíveis novos fármacos para o tratamento da LLA (MEDRANO *et al.*, 2018). Polimorfismos no gene *VDR* são conhecidamente associados ao risco de câncer de próstata, mama, cólon e melanoma (GANDINI *et al.*, 2014). Embora sejam conhecidos os efeitos anti-leucemogênicos da vitamina D, polimorfismos nesse gene não foram avaliados anteriormente quanto ao risco para LLA.

Por conta de seu efeito modulador da expressão de enzimas de biotransformação de xenobióticos, os estudos de polimorfismos em *VDR* em crianças com LLA abordaram seu efeito na toxicidade e nos resultados do tratamento. Esses polimorfismos têm sido associados a maior risco de toxicidade óssea após uso de glicocorticoides, manifestada como osteonecrose ou redução da densidade mineral óssea (ELHAROUNI *et al.*, 2018; ERDEM *et al.*, 2018). Além disso, um estudo

realizado por Rocha *et al* (2005) mostrou associação entre os polimorfismos rs2228570 e rs1544410 e o risco para recaída da LLA em sistema nervoso central (ROCHA *et al.*, 2005).

Com base nos efeitos anti-leucêmicos da vitamina D, hipotetizamos que polimorfismos em *VDR* possam ser associados também ao risco para LLA, o que foi confirmado em nossos resultados. Em nosso estudo, o genótipo rs2228570 TT foi fortemente associado ao risco para LLA, e esse efeito foi restrito ao subtipo LLA-cpB, sem apresentar influência sobre a LLA-T. A análise estratificada por idade revelou que esse polimorfismo tem maior importância no risco para LLA diagnosticada após os cinco anos de idade. Esse fato pode indicar que o mecanismo pelo qual *VDR* está envolvido na leucemogênese não envolve a vida intrauterina, e sim a aquisição de mutações adicionais durante a infância. O papel dessa variante foi maior entre meninas, e uma possível explicação para esse fato é a maior expressão de enzimas da família *CYP3A*, induzidas por *VDR*, no sexo feminino. Crianças de cor de pele não branca também foram mais sensíveis aos efeitos desse SNP, o que pode ser explicado pela maior frequência dos alelos mais ativos de *CYP3A4* e *CYP3A5* em populações negras (ZANGER; SCHWAB, 2013; PEZESHKI *et al.*, 2018).

Em nossos resultados, apenas a variante rs2228570 foi associada à LLA, enquanto rs1544410 não alterou o risco para a doença em nenhuma das análises para o polimorfismo individualmente. A análise de combinação genotípica mostrou que a ocorrência concomitante do homozigoto variante para rs2228570 e do homozigoto tipo selvagem para rs1544410 aumenta o risco para LLA, o que reforça a importância do SNP rs2228570 na leucemogênese. Estudos que abordaram o efeito dessas variantes em cânceres, de forma geral, identificaram o polimorfismo rs2228570 como sendo o mais relevante nesse gene (GANDINI *et al.*, 2014). A análise de combinações entre os genótipos para polimorfismos em *VDR* e *CYP3A5* não mostrou associações estatisticamente significantes, o que pode ter ocorrido por redução no poder estatístico nessa análise

O SNP *CYP3A5* rs776746 está presente na maior parte da população brasileira e que gera uma proteína truncada não funcional. Essa é a variação genética mais significativa na fase 1 de biotransformação. É um dos polimorfismos classicamente estudados quanto à resposta ao tratamento e à toxicidade de fármacos. Em LLA, é associado a maior toxicidade gastrointestinal e maior risco de infecções (KISHI *et al.*,

2007; MEEKER *et al.*, 2012). Seu papel na etiologia da doença, porém foi pouco explorado na literatura. Uma metanálise incluiu cinco estudos (três asiáticos, um europeu e um brasileiro) e identificou que esse polimorfismo é capaz de aumentar o risco para LLA (MA *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, *CYP3A5* rs776746 não foi associado ao risco para LLA quando analisada individualmente. Na população brasileira, foram realizados outros dois estudos abordando esse polimorfismo. Silveira *et al.* (2012) realizaram um estudo com 204 casos de LLA provenientes de um centro de tratamento situado na região Sudeste brasileira e 364 controles. Os casos incluídos nesse estudo foram majoritariamente de cor de pele branca (86%), diferentemente de nossa amostra. Esse estudo identificou aumento do risco para LLA conferido pelo polimorfismo. Já Lopes *et al.* (2015) abordaram o efeito desse polimorfismo especificamente na LLA de lactentes. Esse estudo incluiu 235 casos de crianças com até 24 meses de idade e 404 controles. Assim como em nosso estudo, o SNP não foi associado ao risco para a doença.

Embora *CYP3A5* rs776746 não tenha alterado individualmente o risco para LLA, a combinação desse SNP com a deleção em homozigose de *GSTT1* apresentou um efeito deletério. Esse fato demonstra que os polimorfismos em genes do metabolismo de xenobióticos agem em conjunto na leucemogênese. Interações gene-gene entre SNPs em CYPs e deleções em GSTs também foram descritas em estudo realizado por Canalle *et al.* (2004). Esse estudo mostrou que SNPs em *CYP1A1* e *CYP2E1* combinados com deleções de *GSTT1* e *GSTM1* são fortemente associados ao risco para LLA.

As GSTs são importantes para a biotransformação de substâncias tóxicas provenientes de exposições ambientais associadas ao risco para LLA. Elas metabolizam substâncias presentes na fumaça de tabaco, como benzeno, acroleína, e crotonaldeído, além de componentes de pesticidas tintas e solventes. A ausência de uma ou mais isoformas implica em menor eficácia da eliminação desses compostos (HOYOS-GIRALDO *et al.*, 2009; YUAN *et al.*, 2016; AHLUWALIA; KAUR, 2018). Essas deleções estão entre os polimorfismos mais estudados quanto ao risco para LLA. Uma recente metanálise de 30 estudos caso-controle realizada por Zhao *et al.* (2018) mostrou associação direta com o risco para LLA apenas para a deleção de *GSTM1*. A deleção de *GSTT1*, no entanto, confere aumento do risco entre asiáticos,

como demonstrado em outras duas metanálises (TANG *et al.*, 2013; MOULIK *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, diferentemente do descrito na metanálise mais recente, apenas a deleção de *GSTT1* foi associada ao risco para LLA em análise ajustada por cor de pele. Nosso resultado foi semelhante ao do estudo realizado por Moulik *et al.* (2014), que em amostra de 100 crianças indianas com LLA e 300 controles saudáveis, verificaram aumento do risco para LLA de 2,54 vezes conferido pela deleção de *GSTT1*, enquanto a de *GSTM1* não alterou o risco. As diferenças entre a importância de uma deleção ou outra nas diferentes populações pode dever-se às exposições ambientais presentes em cada população e à especificidade de substratos de cada enzima. Enquanto *GSTM1* metaboliza moléculas maiores, como as de acroleína e estilbenos, as menores, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são substratos da *GSTT1* (JANCOVA *et al.*, 2010).

Em nossos resultados, a deleção de *GSTT1* aumentou o risco para LLA em todos os estratos de sexo, cor de pele e idade, no entanto, seu efeito foi restrito ao subtipo LLA-cpB. Na população brasileira, além do nosso, foram realizados outros dois estudos. Canalle *et al.* (2004) incluíram 113 crianças com LLA e 221 controles e não identificaram associação entre as deleções e o risco para a doença. Já o estudo realizado por Lopes *et al.* (2015) entre crianças com até 24 meses de idade, também não verificou associação entre deleções de *GSTT1* ou *GSTM1* isoladamente com o risco para LLA.

Nossos resultados mostraram que a deleção concomitante de *GSTT1* e *GSTM1* é mais fortemente associado ao risco para LLA se comparada à ocorrência isolada de uma das deleções. Esse resultado é também semelhante ao descrito por Moulik *et al.* (2014), e indica que esses polimorfismos ajam em conjunto na determinação do risco para LLA.

Nenhum dos polimorfismos abordados nesse estudo foi associado ao risco para LLA-T, indicando que essa doença apresenta fatores etiológicos distintos dos associados à LLA-cpB. Pouco se conhece sobre os fatores de risco para LLA-T. Por ser menos frequente, a maioria dos estudos sobre a etiologia da LLA excluem casos de LLA-T ou analisam estes juntamente com os de LLA-cpB (KARRMAN e JOHANSSON, 2017).

Nosso estudo foi o primeiro a avaliar o papel de polimorfismos em genes envolvidos na ação dos glicocorticoides e da vitamina D na modulação do risco para LLA. Além disso, foi realizado com uma amostra representativa da população brasileira, proveniente de quatro das cinco regiões do país, e o número amostral robusto permitiu a realização de análises estratificadas. Usamos como controles, filhos de doadoras de cordão umbilical, o que consideramos superior ao uso de controles hospitalares, que podem apresentar outras patologias também associadas aos polimorfismos estudados.

Como trata-se de uma abordagem gene candidato, não foi possível avaliar todas as variantes que interferem em cada processo biológico. Também não foi possível avaliar o papel das exposições ambientais que podem interagir com os fatores genéticos investigados, o que seria ideal para a investigação da etiologia de uma doença multifatorial como a LLA. Se compararmos o número de casos incluídos no estudo ao de casos incidentes no período, tivemos uma perda de 29%. A análise das características demográficas dos casos incluídos no estudo e dos que não tivemos acesso ao material biológico, porém, não mostrou diferenças.

6. CONCLUSÕES

- O genótipo homozigoto variante para *MTHFR* rs1801133 apresentou distintos efeitos sobre o risco para LLA em função da cor de pele: reduziu o risco entre brancos e apresentou valor próximo à significância para aumento do risco entre não brancos.
- O polimorfismo rs37972, no gene *GLCCI1*, envolvido na ação dos glicocorticoides está associado o risco para LLA-cpB, principalmente entre crianças com idade menor ou igual a cinco anos. Nossos achados corroboram com a hipótese adrenal para a leucemogênese.
- O genótipo TT para o polimorfismo *VDR* rs2228570 está fortemente associado ao risco para LLA-cpB. O efeito desse SNP se deu principalmente entre crianças com idade maior que cinco anos, do sexo feminino, e cor de pele não branca. Esse resultado indica que a vitamina D exerce um papel na leucemogênese, de forma direta ou através de regulação da biotransformação de xenobióticos.
- A deleção em homozigose de *GSTT1* é um importante fator de risco para LLA na população brasileira, e seu efeito não é dependente da idade, do sexo ou da cor de pele. A relevância desse polimorfismo, porém, é restrita ao subtipo LLA-cpB.
- Os polimorfismos em genes do metabolismo de xenobióticos interagem na determinação do risco para LLA. O SNP *CYP3A5* rs776746 foi associado à LLA quando em combinação com a deleção de *GSTT1*, e a deleção concomitante de *GSTT1* e *GSTM1* conferem maior risco se comparada à ocorrência de uma delas isolada.
- O risco para LLA-T não foi modificado por nenhum dos polimorfismos estudados, o que corrobora com a hipótese de que essa doença apresenta fatores etiológicos distintos dos associados à LLA-cpB.
- Este estudo traz elementos para melhorar a compreensão da susceptibilidade genética e da etiologia da LLA pediátrica, especialmente para a população brasileira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S. Z. *et al.* A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Lett**, v. 107, n. 2, p. 229-33, Oct 22 1996.

ABIRI, B. *et al.* Effects of maternal diet during pregnancy on the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review. **Nutrition and cancer**, v. 68, n. 7, p. 1065-1072, 2016.

ADCOCK, I. M.; MUMBY, S. Glucocorticoids. **Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD**. p. 171-196, 2016.

AHLUWALIA, M.; KAUR, A.. Modulatory role of GSTT1 and GSTM1 in Punjabi agricultural workers exposed to pesticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 12, p. 11981-11986, 2018.

AIRD, K. M. *et al.* Suppression of nucleotide metabolism underlies the establishment and maintenance of oncogene-induced senescence. **Cell reports**, v. 3, n. 4, p. 1252-1265, 2013.

ALLOCATI, N. *et al.* Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. **Oncogenesis**, v. 7, n. 1, p. 8, 2018.

AMIGOU, A. *et al.* Folic acid supplementation, MTHFR and MTRR polymorphisms, and the risk of childhood leukemia: the ESCALE study (SFCE). **Cancer Causes Control**. v. 23 p. 1265-1277. 2012.

ARAUJO, N. *et al.* Improving DNA extraction quality by the salting-out method to prepare blood samples for real-time PCR.(LB124). **The FASEB Journal**, v. 28, n. 1_supplement, p. LB124, 2014.

AWASTHI, S. *et al.* CRHR1 gene SNPs and response to systemic corticosteroids in Indian asthmatic children during acute exacerbation. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 82, n. 9, p. 781-786, 2015.

AYDIN-SAYITOGLU, Muge *et al.* Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias. **American journal of hematology**, v. 81, n. 3, p. 162-170, 2006.

AZEVEDO-SILVA, F. *et al.* Implications of infectious diseases and the adrenal hypothesis for the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 3, p. 226-229, 2010.

BAILEY, H. D. *et al.* Home pesticide exposures and risk of childhood leukemia: Findings from the childhood leukemia international consortium. **International journal of cancer**, v. 137, n. 11, p. 2644-2663, 2015.

BAILEY, H. D. *et al.* Home paint exposures and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: findings from the Childhood Leukemia International Consortium. **Cancer Causes & Control**, v. 26, n. 9, p. 1257-1270, 2015.

BAILEY, D.H. *et al.* Paternal intake of folate and vitamins B6 and B12 before conception and risk of childhood acute lymphoblastic leucemia. **Cancer Causes Control**. v. 25 p. 1615–1625. 2014.a.

BAILEY, H. D. *et al.* Parental occupational pesticide exposure and the risk of childhood leukemia in the offspring: findings from the childhood leukemia international consortium. **International journal of cancer**, v. 135, n. 9, p. 2157-2172, 2014.b

BAILEY, D.H. *et al.* Maternal dietary intake of folate and vitamins B6 and B12 during pregnancy and the risk of childhood acute lymphoblastic leucemia. **Nutrition and Cancer**. v. 64 p. 1122-1130. 2012.

BARNABÉ, A. *et al.* Folate, vitamin B12 and Homocysteine status in the post-folic acid fortification era in different subgroups of the Brazilian population attended to at a public health care center. **Nutrition journal**, v. 14, n. 1, p. 19, 2015.

BARRINGTON-TRIMIS, J. L. *et al.* Trends in childhood leukemia incidence over two decades from 1992 to 2013. **International journal of cancer**, v. 140, n. 5, p. 1000-1008, 2017.

BATAR, B. *et al.* DNA repair gene XPD and XRCC1 polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia research**, v. 33, n. 6, p. 759-763, 2009.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environmental health perspectives**, v. 115, n. 1, p. 138-145, 2006.

BONAVENTURE, A. *et al.* Childhood acute leukemia, maternal beverage intake during pregnancy, and metabolic polymorphisms. **Cancer Causes & Control**, v. 24, n. 4, p. 783-793, 2013.

BONAVENTURE, A. *et al.* Childhood acute leukemia, maternal beverage intake during pregnancy, and metabolic polymorphisms. **Cancer Causes & Control**, v. 24, n. 4, p. 783-793, 2013.

BRISSON, G. D. *et al.* EPHX1 rs1051740 T> C (Tyr113His) is strongly associated with acute myeloid leukemia and KMT2A rearrangements in early age. **Archives of toxicology**, p. 1-12, 2018.

BRISSON, G. D.; ALVES, L. R.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review. **Ecancermedicalscience**, v. 9, 2015.

BROWN, P. *et al.* How I treat infant leukemia. **Blood**, v. 133, n. 3, p. 205-214, 2019.

BUTTGEREIT, F. *et al.* Exogenous and endogenous glucocorticoids in rheumatic diseases. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 1, p. 1-9, 2011.

CANALLE, R. *et al.* Impact of thymidylate synthase promoter and DNA repair gene polymorphisms on susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 52, n. 6, p. 1118-1126, 2011.

CANALLE, R. *et al.* Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 43, n. 2, p. 100-109, 2004.

CANTARELLA, C. D. *et al.* Folate deficiency as predisposing factor for childhood leukaemia: a review of the literature. **Genes & Nutrition**, v. 12, n. 1, dez. 2017.

CARLOS-WALLACE, F. M. *et al.* Parental, in utero, and early-life exposure to benzene and the risk of childhood leukemia: a meta-analysis. **American journal of epidemiology**, v. 183, n. 1, p. 1-14, 2015.

CHAN, J. Y. S. *et al.* Xenobiotic and folate pathway gene polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia in Javanese children. **Hematol Oncol**. v. 29. p.116–123. 2011.

CHANG, S. *et al.* Long interspersed nucleotide element-1 hypomethylation in folate-deficient mouse embryonic stem cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 114, n. 7, p. 1549-1558, 2013.

CHANG, J. S. *et al.* Genetic polymorphisms in adaptive immunity genes and childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, p. 1055-9965. EPI-10-0389, 2010.

CHATZIDAKIS, K. *et al.* Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism: Association With Risk for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Response During the Initial Phase of Chemotherapy in Greek Patients. **Pediatr Blood Cancer**. v. 47. p.147–151. 2006.

CHRISTAKOS, S. *et al.* Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. **Physiological reviews**, v. 96, n. 1, p. 365-408, 2015.

CHRZANOWSKA, K. H. *et al.* Carrier frequency of mutation 657del5 in the NBS1 gene in a population of Polish pediatric patients with sporadic lymphoid malignancies. **International journal of cancer**, v. 118, n. 5, p. 1269-1274, 2006.

CONSOLINI, R. *et al.* Effects of vitamin D on the growth of normal and malignant B-cell progenitors. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 126, n. 2, p. 214-219, 2001.

COOPER S. L; BROWN P. A. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Clin North Am**. v.62 p. 61-73. 2015.

COUTO, Arnaldo C. *et al.* Pregnancy, maternal exposure to analgesic medicines, and leukemia in Brazilian children below 2 years of age. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 24, n. 3, p. 245-252, 2015.

COUTO, A. C. *et al.* Pregnancy, maternal exposure to hair dyes and hair straightening cosmetics, and early age leukemia. **Chemico-biological interactions**, v. 205, n. 1, p. 46-52, 2013.

CRIDER, K. S. *et al.* Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. **Advances in nutrition**, v. 3, n. 1, p. 21-38, 2012.

CROOM, Edward. Metabolism of xenobiotics of human environments. In: Progress in molecular biology and translational science. **Academic Press**, 2012.

DALMASSO, P. *et al.* Temporal trends in the incidence of childhood leukemia, lymphomas and solid tumors in north-west Italy, 1967-2001. A report of the Childhood Cancer Registry of Piedmont. **haematologica**, v. 90, n. 9, p. 1197-1204, 2005.

DAMNJANOVIC, T. *et al.* Association Between the Methylene tetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia in Serbian Children. **J Pediatr Hematol Oncol.** v. 32. p.148-150. 2010.

DE CAMARGO, B. *et al.* **Cancer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade.** Rio de Janeiro. 2008.

DE JONGE, R. *et al.* Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Blood.** v. 113. p.2284-2289. 2009.

DEZIEL, N. C. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in residential dust and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Environmental research,** v. 133, p. 388-395, 2014.

DI PIETRO, G.; MAGNO, L. A. V.; RIOS-SANTOS, F. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology,** v. 6, n. 2, p. 153-170, 2010.

DOU, R. *et al.* Vitamin D and colorectal cancer: molecular, epidemiological and clinical evidence. **British Journal of Nutrition,** v. 115, n. 9, p. 1643-1660, 2016.

DUCKER, G. S.; RABINOWITZ, J. D. One-carbon metabolism in health and disease. **Cell metabolism,** v. 25, n. 1, p. 27-42, 2017.

DUONG-THI-LY, H. *et al.* Effects of genetic factors to inhaled corticosteroid response in children with asthma: a literature review. **Journal of International Medical Research,** v. 45, n. 6, p. 1818-1830, 2017.

DUSSO, A. S. *et al.* Vitamin D. **J. Am. Board Fam. Pract,** v. 18, n. 5, p. 445-446, 2005.

ELHAROUNI, D. *et al.* A Pharmacogenetic Study of VDR fok1 and TYMS Polymorphisms and Their Association With Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis in Egyptian Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. **Frontiers in oncology,** v. 8, 2018.

ERDEM, M. *et al.* The Investigation of Relationship Between Fok1 and Col1A1 Gene Polymorphisms and Development of Treatment-Related Bone Complications in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Turkish journal of haematology: official journal of Turkish Society of Haematology,** 2018.

FATHI, N. *et al.* Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 391-401, 2019.

FENECH, M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 733, n. 1-2, p. 21-33, 2012.

FERREIRA, J. D. *et al.* Maternal alcohol consumption during pregnancy and early age leukemia risk in Brazil. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

FERREIRA, J. D. *et al.* In utero pesticide exposure and leukemia in Brazilian children < 2 years of age. **Environmental health perspectives**, v. 121, n. 2, p. 269-275, 2012.

FERTRIN, K. Y. It is never too late to rethink serum folate. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 40, n. 4, p. 295-297, 2018.

FILIPPINI, T. *et al.* A review and meta-analysis of outdoor air pollution and risk of childhood leukemia. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 33, n. 1, p. 36-66, 2015.

FINCH, S. C. Radiation-induced leukemia: lessons from history. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 20, n. 1, p. 109-118, 2007.

FLEET, J. C. *et al.* Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. **Biochemical Journal**, v. 441, n. 1, p. 61-76, 2012.

FOTI, R. S.; DALVIE, D. K. Cytochrome P450 and non-cytochrome P450 oxidative metabolism: Contributions to the pharmacokinetics, safety and efficacy of xenobiotics. **Drug Metabolism and Disposition**, p. dmd. 116.071753, 2016.

FRANCO, R. F. *et al.* The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. **British journal of haematology**, v. 115, n. 3, p. 616-618, 2001.

GABRYEL, M. *et al.* The impact of genetic factors on response to glucocorticoids therapy in IBD. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 51, n. 6, p. 654-665, 2016.

GALE, K. B. *et al.* Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, v. 94, n. 25, p. 13950–13954, 9 dez. 1997.

GANDINI, S. *et al.* Vitamin D receptor polymorphisms and cancer. **Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer**. New York, NY, 2014.

GAST, A. *et al.* Folate metabolic gene polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a case–control study. **Leukemia**. v. 21. p. 320–325. 2007.

GELDMEYER-HILT, K. *et al.* 1, 25-dihydroxyvitamin D3 impairs NF-κB activation in human naïve B cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 407, n. 4, p. 699-702, 2011.

GERBER, Anthony N. Measuring safety of inhaled corticosteroids in asthma. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 117, n. 6, p. 577-581, 2016.

GIAMMANCO, Marco *et al.* Vitamin D in cancer chemoprevention. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 10, p. 1399-1434, 2015.

GONÇALVES, B. A. A. *et al.* NQO1 rs1800566 (C609T), PON1 rs662 (Q192R), and PON1 rs854560 (L55M) polymorphisms segregate the risk of childhood acute leukemias according to age range distribution. **Cancer Causes & Control**, v. 23, n. 11, p. 1811-1819, 2012.

GORIČAR, K. *et al.* The association of folate pathway and DNA repair polymorphisms with susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Gene**. v. 562. p. 203–209. 2015.

GREAVES, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, p. 1, 2018.

GREAVES, M. F. Leukemia in twins: lessons in natural history. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2321–2333, 5 jun. 2003.

GREAVES, M. F.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639–649, set. 2003.

GREENSTEIN, S. *et al.* Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. **Clinical cancer research**, v. 8, n. 6, p. 1681-1694, 2002.

GROVES, F. D. *et al.* Birth Weight and Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Arizona, Illinois, and Kentucky. **Southern medical journal**, v. 111, n. 10, p. 579-584, 2018.

GUHA, N. *et al.* NQO1 polymorphisms and de novo childhood leukemia: a HuGE review and meta-analysis. **American journal of epidemiology**, v. 168, n. 11, p. 1221-1232, 2008.

GUISE, J.M *et al.* Review of case-control studies related to breastfeeding and reduced risk of childhood leukemia. **Pediatrics**, v. 116, n. 5, p. e724-e731, 2005.

GULLIVER, L. S. M. xenobiotics and the Glucocorticoid Receptor. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 319, p. 69-79, 2017.

GUTIERREZ-CAMINO, A. *et al.* Genetic susceptibility in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Medical Oncology**, v. 34, n. 10, p. 179, 2017.

HAMADA, A. M. *et al.* Association Between GLCCI1 Promoter Polymorphism (Rs37972) and Post-Transplant Hypertension in Renal Transplant Recipients. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 42, n. 6, p. 1155-1163, 2017.

HAN, S. *et al.* Polymorphisms in innate immunity genes and risk of childhood leukemia. **Human immunology**, v. 71, n. 7, p. 727-730, 2010.

HATTORI, H. *et al.* Regulatory polymorphisms of multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with the development of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia research**, v. 31, n. 12, p. 1633-1640, 2007.

HENRICK, B. M. *et al.* Breastfeeding behaviors and the innate immune system of human milk: working together to protect infants against inflammation, HIV-1, and other infections. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1631, 2017.

HOHMANN, N. *et al.* CYP3A activity: towards dose adaptation to the individual. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 12, n. 5, p. 479-497, 2016.

HOWARD, S. C. *et al.* Childhood cancer epidemiology in low-income countries. **Cancer**, v. 112, n. 3, p. 461-72, Feb 1 2008.

HOYOS-GIRALDO, L. S. *et al.* Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair

genes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 666, n. 1, p. 8-15, 2009.

HU, C. P. *et al.* Effects of Glucocorticoid-Induced Transcript 1 Gene Deficiency on Glucocorticoid Activation in Asthmatic Mice. **Chinese medical journal**, v. 131, n. 23, p. 2817, 2018.

HU, C. *et al.* GLCCI1 variation is associated with asthma susceptibility and inhaled corticosteroid response in a Chinese Han population. **Archives of medical research**, v. 47, n. 2, p. 118-125, 2016.

HUANG, Z. *et al.* Effects of cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5 gene polymorphisms on daunorubicin metabolism and adverse reactions in patients with acute leukemia. **Molecular medicine reports**, v. 15, n. 6, p. 3493-3498, 2017.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukemia in children. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541-1552, 2015.

IACOBUCCI, I.; MULLIGHAN, C. G. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 35, n. 9, p. 975-983, 2017.

IHUNNAH, C. A. *et al.* Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 8, p. 956-963, 2011.

INFANTE-RIVARD, C. *al.* GSTT1 and CYP2E1 polymorphisms and trihalomethanes in drinking water: effect on childhood leukemia. **Environmental health perspectives**, v. 110, n. 6, p. 591, 2002.

INIESTA, R. *et al.* Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. **Gaceta Sanitaria**, v. 19, n. 4, p. 333-341, 2005.

JAMROZIAK, K. *et al.* Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. **European journal of haematology**, v. 72, n. 5, p. 314-321, 2004.

JANCOVA, P. *et al.* Phase II drug metabolizing enzymes. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 154, n. 2, p. 103-116, 2010.

JENSEN, C. D. *et al.* Maternal dietary risk factors in childhood acute lymphoblastic leukemia (United States). **Cancer Causes & Control**, v. 15, n. 6, p. 559-570, 2004.

JIN, M. W. *et al.* A review of risk factors for childhood leukemia. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 18, p. 3760-3764, 2016.

JONES, T. S. *et al.* CRHR1 polymorphisms predict bone density in survivors of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 18, p. 3031-3037, 2008.

JOSEPH, T. *et al.* DNA repair gene XRCC1 polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer letters**, v. 217, n. 1, p. 17-24, 2005.

KAMDEM, L. K. *et al.* Genetic predictors of glucocorticoid-induced hypertension in children with acute lymphoblastic leukemia. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 18, n. 6, p. 507-514, 2008.

KARRMAN, K.; JOHANSSON, B. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 56, n. 2, p. 89-116, 2017.

KESKIN, O. *et al.* Genetic associations of the response to inhaled corticosteroids in asthma: a systematic review. **Clinical and translational allergy**, v. 9, n. 1, p. 2, 2019.

KFIR-ERENFELD, S. *et al.* Protein kinase networks regulating glucocorticoid-induced apoptosis of hematopoietic cancer cells: fundamental aspects and practical considerations. **Leukemia & lymphoma**, v. 51, n. 11, p. 1968-2005, 2010.

KISHI, S. *et al.* Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 67-72, 2004.

KISHI, S. *et al.* Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. **Blood**, v. 109, n. 10, p. 4151-4157, 2007.

KOIFMAN, Sergio. Pregnancy, maternal tobacco smoking and early age leukemia in Brazil. **Frontiers in oncology**, v. 2, p. 151, 2012.

KOPPEN, I. J. N; *et al.* Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. **British journal of haematology**, v. 148, n. 1, p. 3-14, 2010.

KRAJINOVIC, M. *et al.* Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 252-257, 2004.

KRAJINOVIC, M. *et al.* Genetic polymorphisms of N-acetyltransferases 1 and 2 and gene-gene interaction in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 9, n. 6, p. 557-562, 2000.

KREILE, M. *et al.* Lack of Association between Polymorphisms in Genes MTHFR and MDR1 with Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 15. p. 9707-9711. 2014.

KRÜGER, M. *et al.* The impact of GSTM1/GSTT1 polymorphism for the risk of oral cancer. **Clinical oral investigations**, v. 19, n. 8, p. 1791-1797, 2015.

KRUTH, K. *et al.* Suppression of B-cell development genes is key to glucocorticoid efficacy in treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 2017.

KULLING, P. M. *et al.* Vitamin D in hematological disorders and malignancies. **European journal of haematology**, v. 98, n. 3, p. 187-197, 2017.

KWAN, M. L. *et al.* Maternal diet and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Public health reports**, v. 124, n. 4, p. 503-514, 2009.

LAMBA, J. K. *et al.* Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 10, p. 1271-94, Nov 18 2002.

LAMPRECHT, S. A.; LIPKIN, M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 8, p. 601, 2003.

LAUTNER-CSORBA, O. *et al.* Roles of Genetic Polymorphisms in the Folate Pathway in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Evaluated by Bayesian Relevance and Effect Size Analysis. **PLoS One**. v. 8. p. 1-13. 2013.

LEI, Y. *et al.* GLCCI1 rs37973: a potential genetic predictor of therapeutic response to inhaled corticosteroids in Chinese chronic obstructive pulmonary disease patients. **Scientific reports**, v. 7, p. 42552, 2017.

LI, J. *et al.* Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001–2003. **Pediatrics**, v. 121, n. 6, p. e1470-e1477, 2008.

LI, S. *et al.* Association between MTHFR C677T polymorphism and risk of acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis based on 51 case-control studies. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, p. 740, 2015.

LIEW, S. C.; GUPTA, E. D. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. **European journal of medical genetics**, v. 58, n. 1, p. 1-10, 2015.

LIGHTFOOT, T. J. *et al.* Genetic variation in the folate metabolic pathway and risk of childhood leukemia. **Blood**. v.115. p. 3923-3929. 2010.

LINABERY, A. M.; ROSS, J. A. Trends in childhood cancer incidence in the US (1992–2004). **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 112, n. 2, p. 416-432, 2008.

LINDH, J. D. *et al.* Vitamin D and drug-metabolising enzymes. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, n. 12, p. 1797-1801, 2012.

LINET, M. S. *et al.* International long-term trends and recent patterns in the incidence of leukemias and lymphomas among children and adolescents ages 0–19 years. **International journal of cancer**, v. 138, n. 8, p. 1862-1874, 2016.

LIU, R. *et al.* Paternal smoking and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: systematic review and meta-analysis. **Journal of oncology**, v. 2011, 2011.

LIU, Y. *et al.* KML001 and doxercalciferol induce synergistic antileukemic effect in acute lymphoid leukemia cells. **Oncology reports**, v. 38, n. 1, p. 481-487, 2017.

LOPES, B. A. *et al.* Polymorphisms in CYP1B1, CYP3A5, GSTT1, and SULT1A1 are associated with early age acute leukemia. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0127308, 2015.

MA, L. M. *et al.* CYP3A5* 3 genetic polymorphism is associated with childhood acute lymphoblastic leukemia risk: A meta-analysis. **Biomed J**, v. 38, p. 428-432, 2015.

MACKOWIAK, B.; WANG, H. Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 9, p. 1130-1140, 2016.

MAIA, R. R. P.; WUNSCH-FILHO, V. Infection and childhood leukemia: review of evidence. **Revista de saude publica**, v. 47, p. 1172-1185, 2013.

MCREYNOLDS, L. J.; SAVAGE, S. A. Pediatric leukemia susceptibility disorders: manifestations and management. **ASH Education Program Book**, v. 2017, n. 1, p. 242-250, 2017.

MEDRANO, M. *et al.* Vitamin D: effect on haematopoiesis and immune system and clinical applications. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2663, 2018.

MEEKER, N. D. *et al.* Pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 11, n. 10, p. 1621-1632, 2010.

METAYER, C. *et al.* Maternal supplementation with folic acid and other vitamins and risk of leukemia in the offspring: a childhood leukemia international consortium study. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 25, n. 6, p. 811, 2014.

MEZA-ESPINOZA, J. P. *et al.* XRCC1 polymorphisms and haplotypes in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia. **Genet Mol Res**, v. 8, n. 4, p. 1451-1458, 2009.

MIEDEMA, K. G. E. *et al.* Polymorphisms in the TLR6 gene associated with the inverse association between childhood acute lymphoblastic leukemia and atopic disease. **Leukemia**, v. 26, n. 6, p. 1203, 2012.

MIGLIORINI, G. *et al.* Variation at 10p12. 2 and 10p14 influences risk of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia and phenotype. **Blood**, p. blood-2013-03-491316, 2013.

MIKHAK, B. *et al.* Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and haplotypes, interactions with plasma 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D, and prostate cancer risk. **The Prostate**, v. 67, n. 9, p. 911-923, 2007.

MILNE, E. *et al.* Folate pathway gene polymorphisms, maternal folic acid use, and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 24, n. 1, p. 48-56, 2015.

MONK, D. Genomic imprinting in the human placenta. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 213, n. 4, p. S152-S162, 2015.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23, 2013.

MOREL, F.; ANINAT, C. The glutathione transferase kappa family. **Drug metabolism reviews**, v. 43, n. 2, p. 281-291, 2011.

MORI, H. *et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 12, p. 8242–8247, 11 jun. 2002.

MORSI, A. *et al.* The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Fetus. **Hormone research in paediatrics**, v. 89, n. 5, p. 380-387, 2018.

MOULIK, N. R. *et al.* Glutathione-S-transferase polymorphism and acute lymphoblastic leukemia (ALL) in north Indian children: a case–control study and meta-analysis. **Journal of human genetics**, v. 59, n. 9, p. 529, 2014.

NEWBERRY, Sydne J. *et al.* Vitamin D and calcium: a systematic review of health outcomes (update). **Evid Rep Technol Assess (Full Rep)**. v.217 p.1-929. 2014.

NIGRO, L. L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 35, n. 4, p. 245-252, 2013.

OLIVEIRA, E. *et al.* The MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms and Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Portugal. **J Pediatr Hematol Oncol**. v. 27. p. 425–429. 2005.

OMIECINSKI, C. J. *et al.* Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. p. S49-S75, 2010.

OOSTEROM, N. *et al.* A decrease in vitamin D levels is associated with methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. **Supportive Care in Cancer**, v. 27, n. 1, p. 183-190, 2019.

ORSI, L. *et al.* Genetic polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: GWAS of the ESCALE study (SFCE). **Leukemia**, v. 26, n. 12, p. 2561, 2012.

PAPAEMMANUIL, E *et al.* Loci on 7p12. 2, 10q21. 2 and 14q11. 2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Nature genetics**, v. 41, n. 9, p. 1006, 2009.

PASTORCZAK, A. *et al.* Role of 657del5 NBN mutation and 7p12. 2 (IKZF1), 9p21 (CDKN2A), 10q21. 2 (ARID5B) and 14q11. 2 (CEBPE) variation and risk of childhood ALL in the Polish population. **Leukemia research**, v. 35, n. 11, p. 1534-1536, 2011.

PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®). **PDQ cancer information summaries**, 2019.

PEI, J. S. *et al.* The Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase Genotypes with the Risk of Childhood Leukemia in Taiwan. **PLoS One**. v. 10. p. 1-12. 2015.

PERIM, A. L. *et al.* CXCL12 and TP53 genetic polymorphisms as markers of susceptibility in a Brazilian children population with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Molecular biology reports**, v. 40, n. 7, p. 4591-4596, 2013.

PETRA. B. G. *et al.* Gene – gene interactions in the folate metabolic pathway influence the risk for acute lymphoblastic leukemia in children. **Leukemia & Lymphoma**. v.48. p. 786–792. 2007.

PETRIDOU, E. *et al.* Maternal diet and acute lymphoblastic leukemia in young children. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 14, n. 8, p. 1935-1939, 2005.

PEZESHKI, S. M. S. *et al.* Vitamin D and its receptor polymorphisms: New possible prognostic biomarkers in leukemias. **Oncology reviews**, v. 12, n. 2, 2018.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. Maternal hormonal contraception and childhood leukaemia. **The Lancet Oncology**, v. 19, n. 10, p. 1261-1262, 2018.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; ANDRADE, F. G. *et al.* Early-age acute leukemia: revisiting two decades of the Brazilian Collaborative Study Group. **Archives of medical research**, v. 47, n. 8, p. 593-606, 2016.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. *et al.* Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 15, n. 12, p. 2336-2341, 2006.

PUI, C. H. *et al.* Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **Journal of clinical oncology**, v. 29, n. 5, p. 551, 2011.

RAHMADHANI, R. *et al.* The associations between VDR BsmI polymorphisms and risk of vitamin D deficiency, obesity and insulin resistance in adolescents residing in a tropical country. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0178695, 2017.

RAI, V. *et al.* Vitamin D receptor polymorphism and cancer: an update. **Anticancer Research**, v. 37, n. 8, p. 3991-4003, 2017.

RAZIS, A. A. *et al.* Isothiocyanates and xenobiotic detoxification. **Molecular nutrition & food research**, v. 62, n. 18, p. 1700916, 2018.

REED, L.; *et al.* The role of cytochrome P450 enzymes in carcinogen activation and detoxication: an in vivo–in vitro paradox. **Carcinogenesis**, v. 39, n. 7, p. 851-859, 2018.

REIS, R. S. *et al.* Mother and child characteristics at birth and early age leukemia: a case-cohort population-based study. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 6, p. 610-618, 2017.

REIS, R. S. *et al.* Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. **Pediatric hematology and oncology**, v. 33, n. 2, p. 83-93, 2016.

REIS, R. S. *et al.* Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatr Blood Cancer**, v. 56, n. 1, p. 58-64, Jan 2011.

REISI, N. *et al.* Vitamin D and bone minerals status in the long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. **International journal of preventive medicine**, v. 6, 2015.

REJA, V. *et al.* ScreenClust: Advanced statistical software for supervised and unsupervised high resolution melting (HRM) analysis. **Methods**, v. 50, n. 4, p. S10-S14, 2010.

ROCHA, J.C.C. *et al.* Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leucemia. **Blood**. v. 105 p. 4752 – 4758. 2005.

SASSI, F.; TAMONE, C.; D'AMELIO, P. Vitamin D: nutrient, hormone, and immunomodulator. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1656, 2018.

SCHMIEGELOW, K. *et al.* Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: the adrenal hypothesis. **Leukemia**, v. 22, n. 12, p. 2137, 2008.

SCHNAKENBERG, E. *et al.* Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population. **BMC Medical Genetics**, v. 6, p. 1-5, 2005.

SCHRAW, J. M. *et al.* Do longer formula feeding and later introduction of solids increase risk for pediatric acute lymphoblastic leukemia?. **Cancer Causes & Control**, v. 25, n. 1, p. 73-80, 2014.

SCHÜZ, J.; ERDMANN, F. Environmental exposure and risk of childhood leukemia: an overview. **Archives of medical research**, v. 47, n. 8, p. 607-614, 2016.

SEMSEI, Á. F. *et al.* Association of some rare haplotypes and genotype combinations in the MDR1 gene with childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Leukemia research**, v. 32, n. 8, p. 1214-1220, 2008.

SHERBORNE, A. L. *et al.* Variation in CDKN2A at 9p21. 3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. **Nature genetics**, v. 42, n. 6, p. 492, 2010.

SHU, X. Ou *et al.* Diagnostic X-rays and ultrasound exposure and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia by immunophenotype. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 11, n. 2, p. 177-185, 2002.

SHUMYANTSEVA, V. V. *et al.* From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450. **Biosensors and Bioelectronics**, 2018.

SILVA, R. M. S. *et al.* Polymorphisms involved in folate metabolism pathways and the risk of the development of childhood acute leukemia. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 17, n. 2, p. 147-152, 2013.

SILVEIRA, V. S. *et al.* CYP3A5 and NAT2 gene polymorphisms: role in childhood acute lymphoblastic leukemia risk and treatment outcome. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 364, n. 1-2, p. 217-223, 2012.

SINGER, A. W. *et al.* Maternal prenatal intake of one-carbon metabolism nutrients and risk of childhood leukemia. **Cancer Causes & Control**, v. 27, n. 7, p. 929-940, 2016.

SOLANO, M. E. *et al.* Antenatal endogenous and exogenous glucocorticoids and their impact on immune ontogeny and long-term immunity. In: Seminars in immunopathology. **Springer Berlin Heidelberg**, 2016.

SOOD, S. *et al.* Metylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: association with risk for pediatric acute lymphoblastic leukemia in north Indians. **Leukemia & Lymphoma**, v. 51, p. 928–932, 2010.

SPECTOR, L. G. *et al.* Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 14, n. 3, p. 651-655, 2005.

SUAREZ-KURTZ, G. *et al.*, Pharmacogenomic implications of population admixture: Brazil as a model case. **Pharmacogenomics**, v. 15, n. 2, p. 209-219, 2014.

SUDAN, M. *et al.* Reported associations between asthma and acute lymphoblastic leukemia: insights from a hybrid simulation study. **European journal of epidemiology**, v. 31, n. 6, p. 593-602, 2016.

STAHN, C.; BUTTGEREIT, F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 4, n. 10, p. 525, 2008.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. **World Health Organization**, 2014.

TANG, Q. *et al.* GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and childhood acute leukemia risk: evidence from 26 case-control studies. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e78810, 2013.

TANTAWY, M. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism in Egyptian pediatric acute lymphoblastic leukemia correlation with BMD. **Meta gene**, v. 9, p. 42-46, 2016.

TANTISIRA, K. G. *et al.* Genomewide association between GLCCI1 and response to glucocorticoid therapy in asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 13, p. 1173-1183, 2011.

TIZAOUI, K.; HAMZAOU, K. Association between VDR polymorphisms and rheumatoid arthritis disease: systematic review and updated meta-analysis of case-control studies. **Immunobiology**, v. 220, n. 6, p. 807-816, 2015.

TOWER, R. L.; SPECTOR, L. G. The epidemiology of childhood leukemia with a focus on birth weight and diet. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 44, n. 3, p. 203-242, 2007.

TREVIÑO, L. R. *et al.* Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. **Nature genetics**, v. 41, n. 9, p. 1001, 2009.

ULUSOY, G. *et al.* Significance of genetic polymorphisms at multiple loci of CYP2E1 in the risk of development of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Oncology**, v. 72, n. 1-2, p. 125-131, 2007.

URAYAMA, K. Y. *et al.* MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 16, n. 6, p. 1172-1177, 2007.

VANDEWALLE, J. *et al.* Therapeutic mechanisms of glucocorticoids. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 42-54, 2018.

VIJAYAKRISHNAN, J.; HOULSTON, R. Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Haematologica**, v. 50, n. 37, 2010.

VROOMAN, L. M.; SILVERMAN, L. B. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic factors and clinical advances. **Current hematologic malignancy reports**, v. 11, n. 5, p. 385-394, 2016.

WALLACE, B. D.; REDINBO, M. R. Xenobiotic-sensing nuclear receptors involved in drug metabolism: a structural perspective. **Drug metabolism reviews**, v. 45, n. 1, p. 79-100, 2013.

WANG, T. T. *et al.* Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1, 25-dihydroxyvitamin D3 target genes. **Molecular endocrinology**, v. 19, n. 11, p. 2685-2695, 2005.

WANG, Z. *et al.* Interplay between vitamin D and the drug metabolizing enzyme CYP3A4. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 136, p. 54-58, 2013.

WARD, M. H. *et al.* Residential levels of polybrominated diphenyl ethers and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in California. **Environmental health perspectives**, v. 122, n. 10, p. 1110, 2014.

WARD, M. H. *et al.* Residential exposure to polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides and risk of childhood leukemia. **Environmental health perspectives**, v. 117, n. 6, p. 1007, 2009.

WHITEHEAD, T. P. *et al.* Childhood leukemia and primary prevention. **Current problems in pediatric and adolescent health care**, v. 46, n. 10, p. 317-352, 2016.

WIEMELS, J. L. *et al.* A functional polymorphism in the CEBPE gene promoter influences acute lymphoblastic leukemia risk through interaction with the hematopoietic transcription factor Ikaros. **Leukemia**, v. 30, n. 5, p. 1194, 2016.

WILLIAMS, L. A. *et al.* The association between sex and most childhood cancers is not mediated by birthweight. **Cancer epidemiology**, v. 57, p. 7-12, 2018.

WILLS-KARP, M. *et al.* Christopher L. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 1, p. 69, 2001.

XU, H. *et al.* Novel susceptibility variants at 10p12. 31-12.2 for childhood acute lymphoblastic leukemia in ethnically diverse populations. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 10, p. 733-742, 2013.

YAMADA, K. *et al.* Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 14853-14858, 2001.

YANG, L. Polymorphisms in folate-related genes: impact on risk of adult acute lymphoblastic leukemia rather than pediatric in Han Chinese. **Leukemia & Lymphoma**. v. 52. p. 1770–1776. 2011.

YEOH, A. E. J. *et al.* Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia shows protection in Malay boys: Results from the Malaysia-Singapore ALL Study Group. **Leukemia Research**. v. 34. p. 276–283. 2010.

YUAN, J. M. *et al.* 2-Phenethyl isothiocyanate, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and detoxification of volatile organic carcinogens and toxicants in tobacco smoke. **Cancer Prevention Research**, canprevres. 0032.2016, 2016.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacol Ther**, Jan 16 2013.

ZANROSSO, Crisiane Wais *et al.* Genetic variability in N-acetyltransferase 2 gene determines susceptibility to childhood lymphoid or myeloid leukemia in Brazil. **Leukemia & Lymphoma**, v. 53, n. 2, p. 323-327, 2012.

ZANROSSO, C. W. *et al.* N-acetyltransferase 2 polymorphisms and susceptibility to infant leukemia with maternal exposure to dipyrone during pregnancy. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, p. cebp. 0508.2010, 2010.

ZANROSSO, C. W. *et al.* The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. **Leukemia research**, v. 30, n. 4, p. 477-481, 2006.

ZHANG, L. *et al.* Vitamin D and lung cancer risk: a comprehensive review and meta-analysis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 299-305, 2015.

ZHANG, Y. *et al.* The association between VDR gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: A systematic review and meta-analysis. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

ZHANG, L. *et al.* Associations between VDR gene polymorphisms and osteoporosis risk and bone mineral density in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 981, 2018.

ZHAO, D. *et al.* Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to childhood asthma: A meta-analysis. **Pediatric pulmonology**, v. 52, n. 4, p. 423-429, 2017.

ZHAO, T.; MA, F.; YIN, F. Role of polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val in childhood acute lymphoblastic leukemia risk: an updated meta-analysis. **Minerva pediatrica**, v. 70, n. 2, p. 185, 2018.

ZHOU, Y. *et al.* Maternal benzene exposure during pregnancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis of epidemiologic studies. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110466, 2014.

ZOU, Z. Q. *et al.* Association between CYP1A1* 2A polymorphism and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: a Meta analysis. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi**, v.17, n.10, p 1112-1118, 2015.

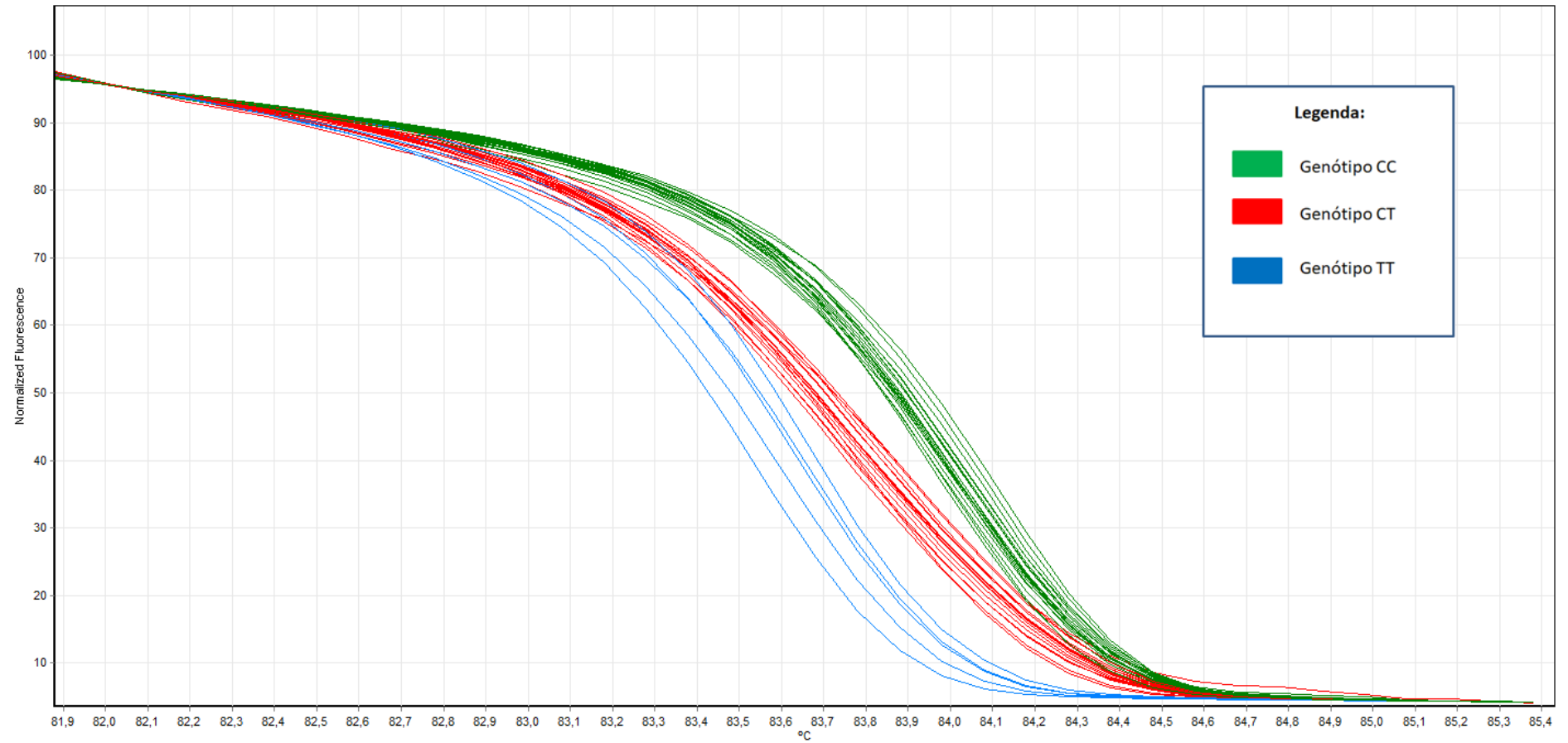
8. ANEXOS

8.1. ANEXO I – Lista de centros colaboradores

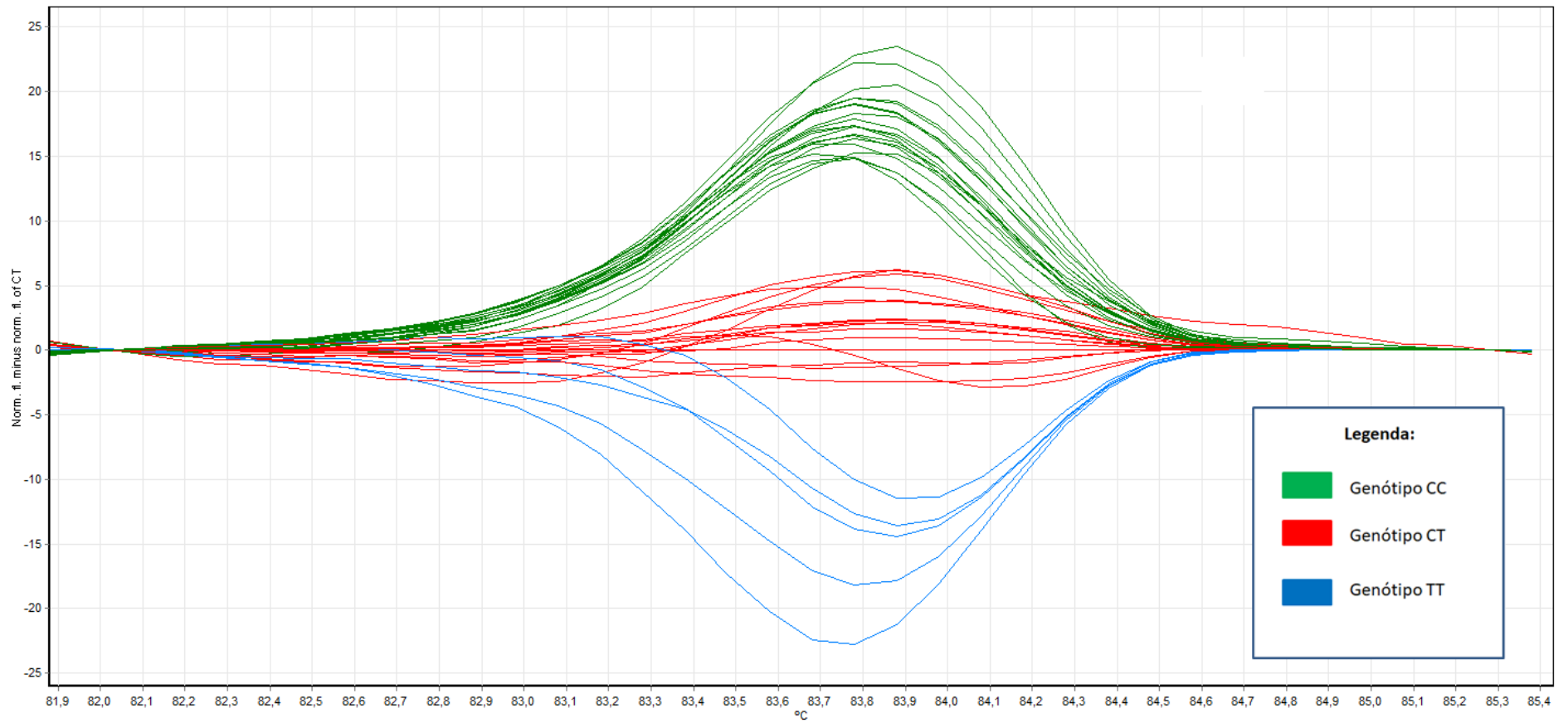
Centro	Estado	Região	Número de crianças incluídas no estudo
Hospital Amaral Carvalho	São Paulo	Sudeste	40
Hospital Santa Marcelina	São Paulo		11
Hospital Sarina Rolin	São Paulo		44
Hospital Araújo Jorge	Goiás	Centro-Oeste	57
Hospital da Criança de Brasília José Alencar	Distrito Federal		82
Hospital das Clínicas de Porto Alegre	Rio Grande do Sul	Sul	25
Hospital Martagão Gesteira	Bahia	Nordeste	76
Hospital Manoel Novaes	Bahia		9

8.2. ANEXO II – Padrões de curva dos polimorfismos genotipados através de PCR-HRM.

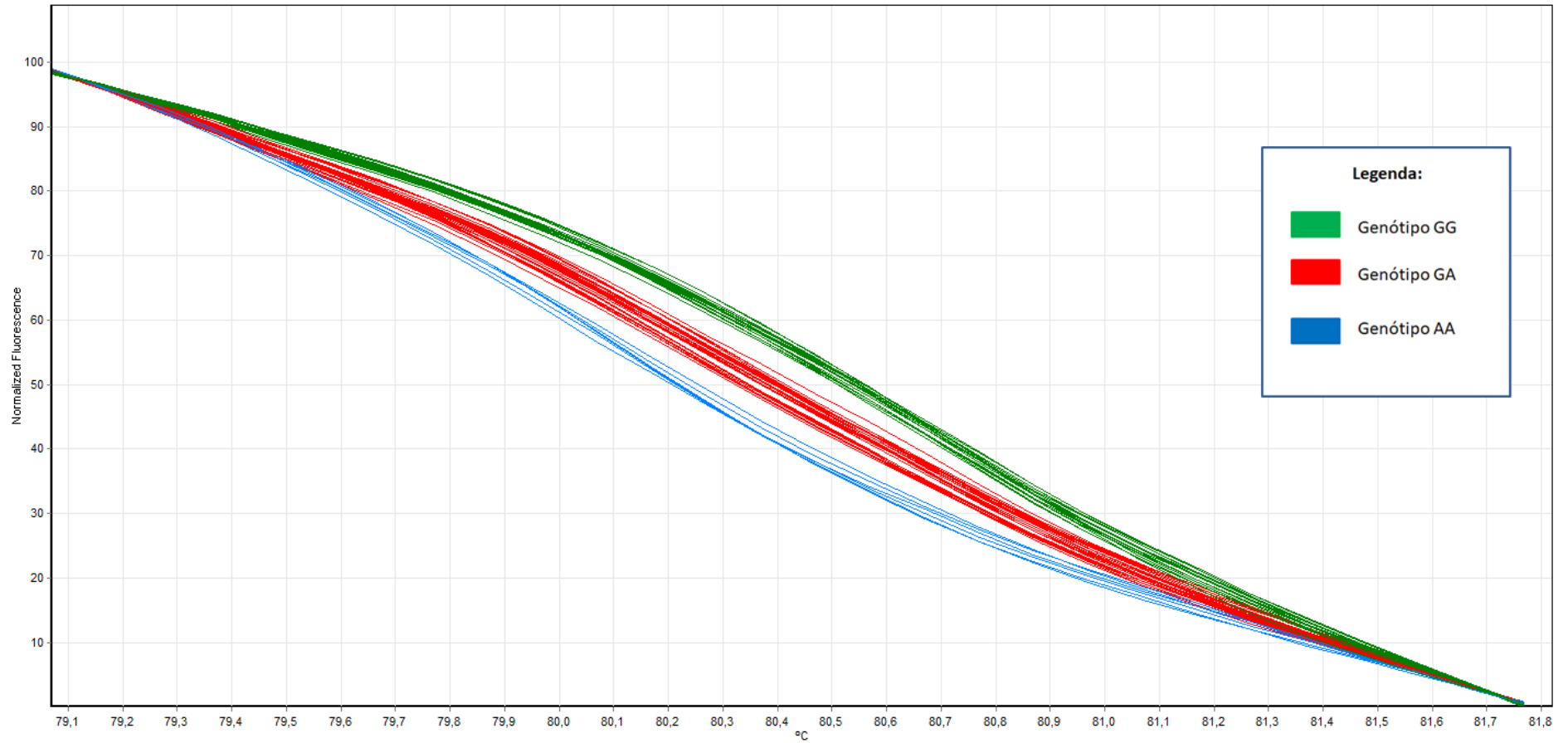
Curvas normalizadas do polimorfismo *MTHFR* rs1801133



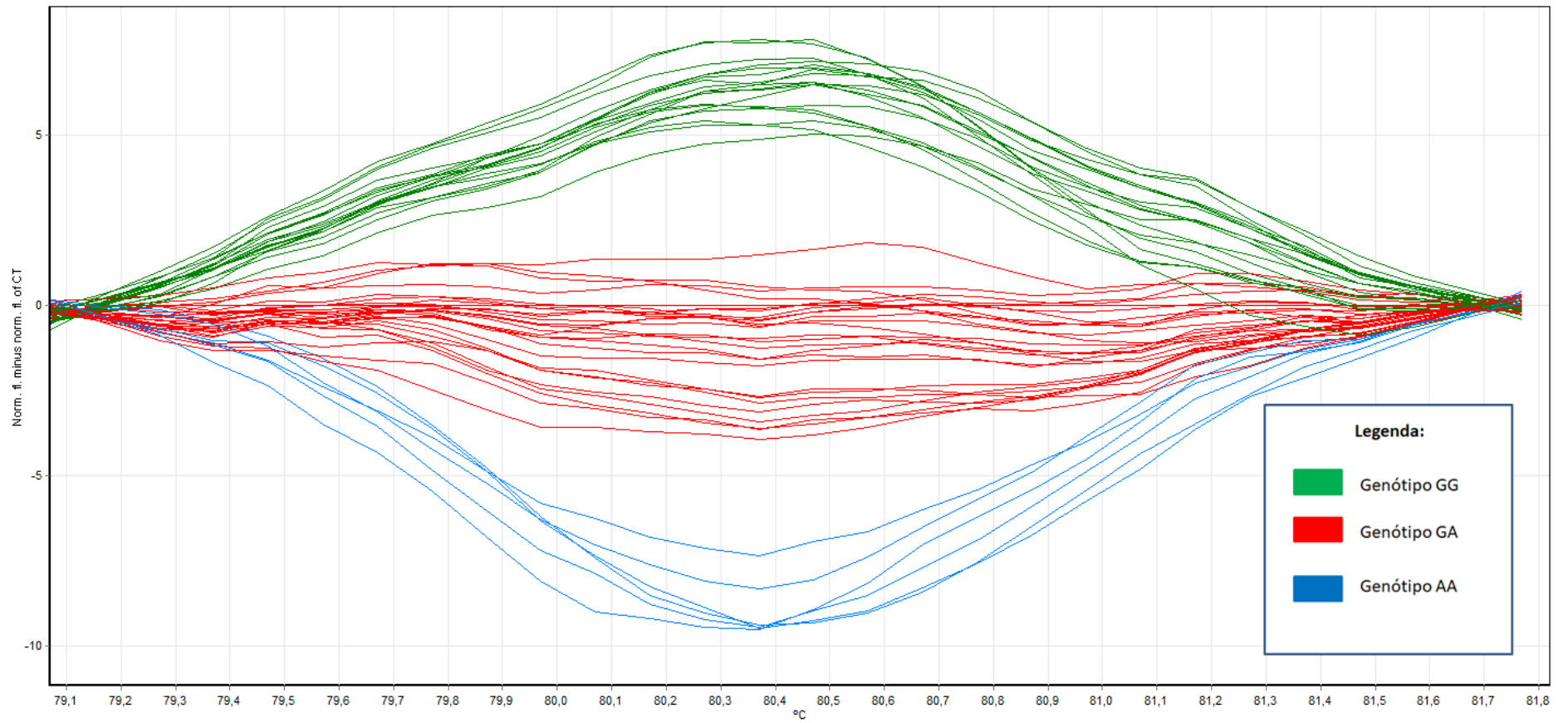
Curvas de diferença do polimorfismo *MTHFR* rs1801133 (normalizadas para o genótipo CT)



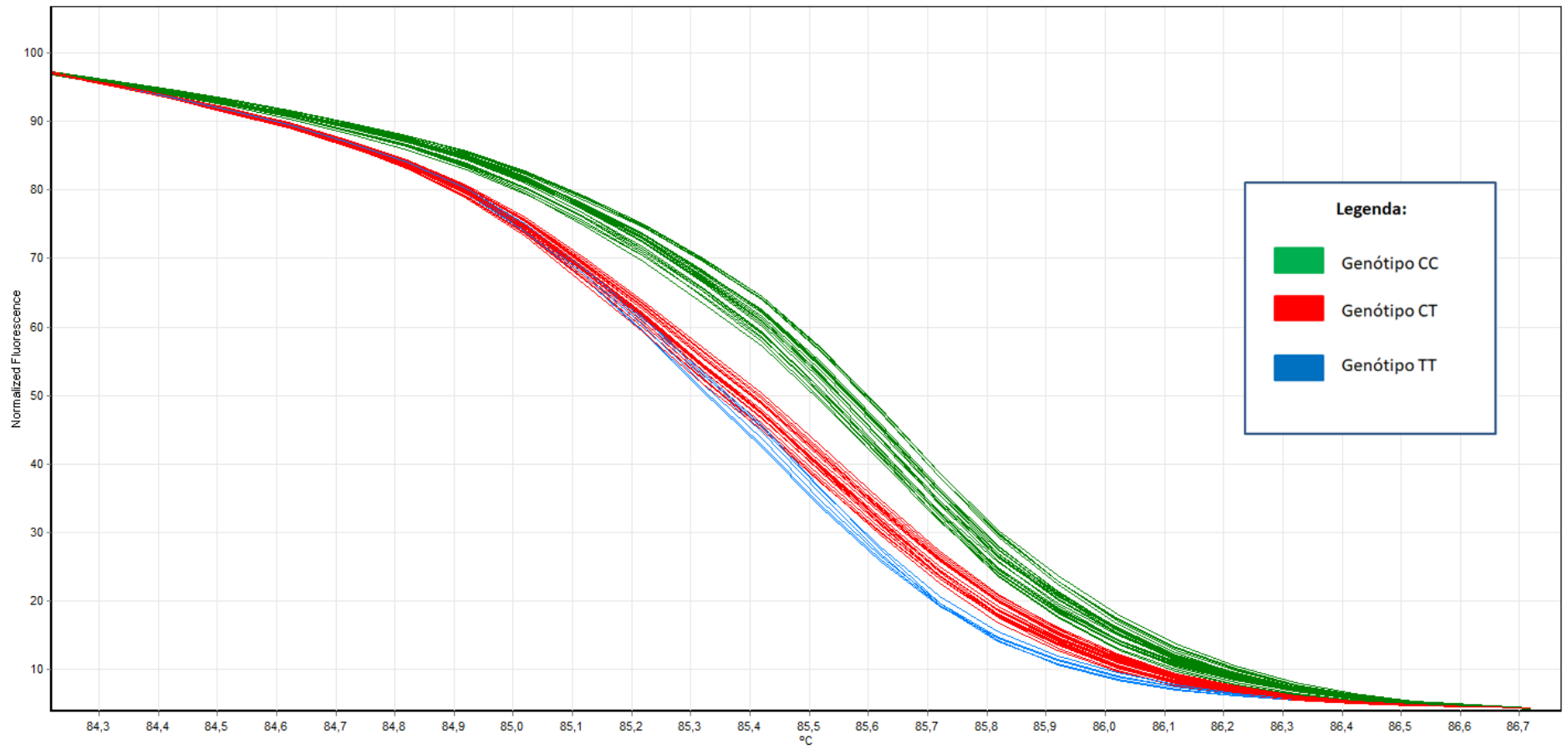
Curvas normalizadas do polimorfismo VDR rs1544410



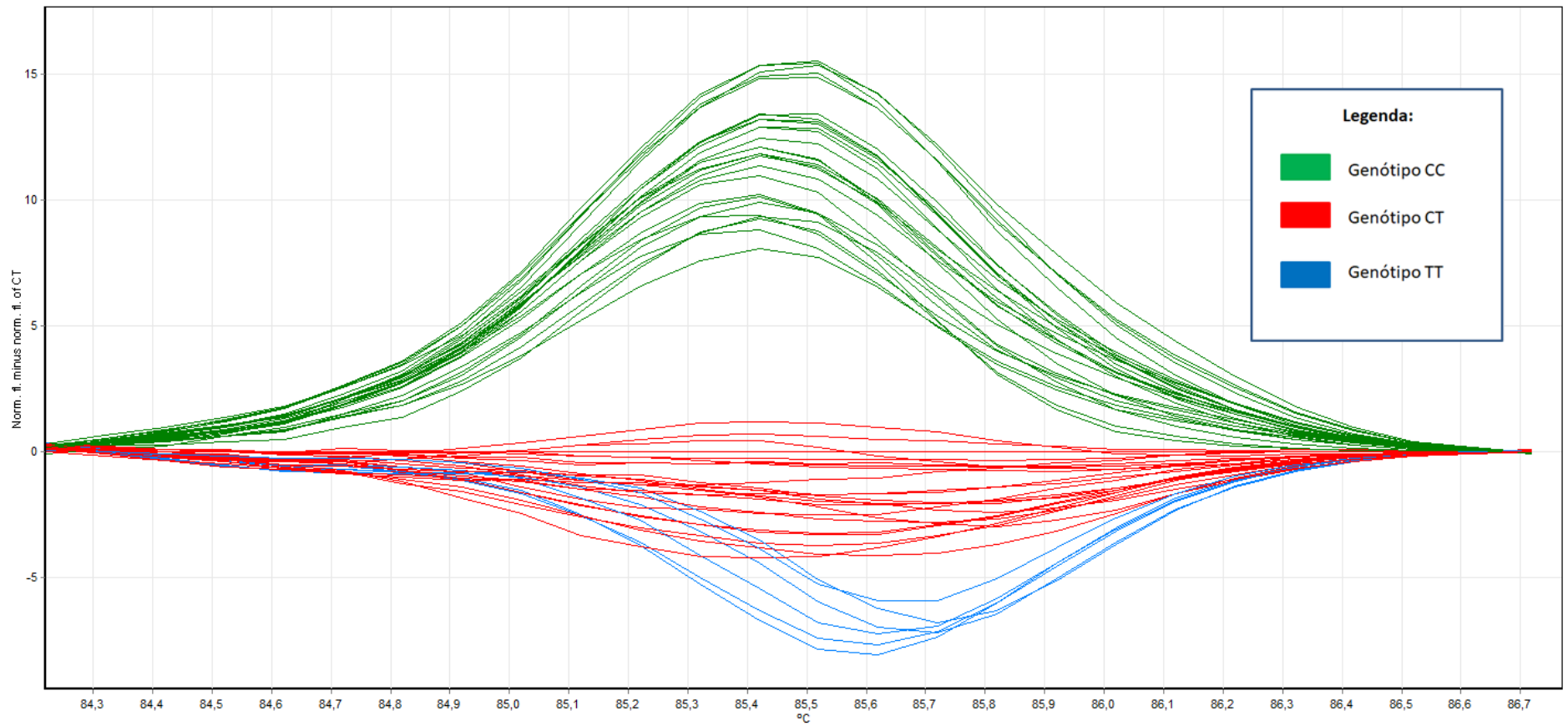
Curvas de diferença do polimorfismo *VDR* rs1544410 (normalizadas para o genótipo GA)



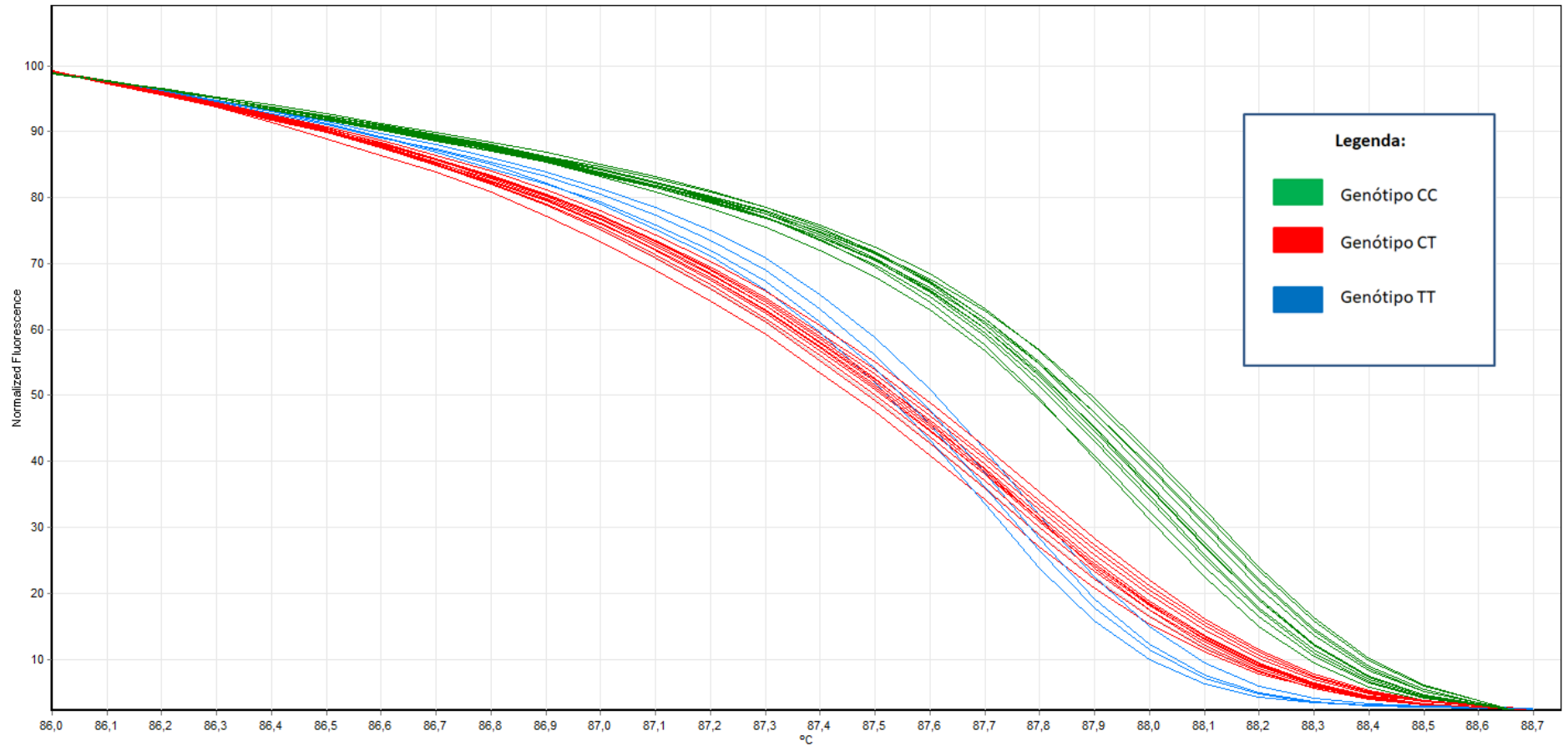
Curvas normalizadas do polimorfismo VDR rs2228570



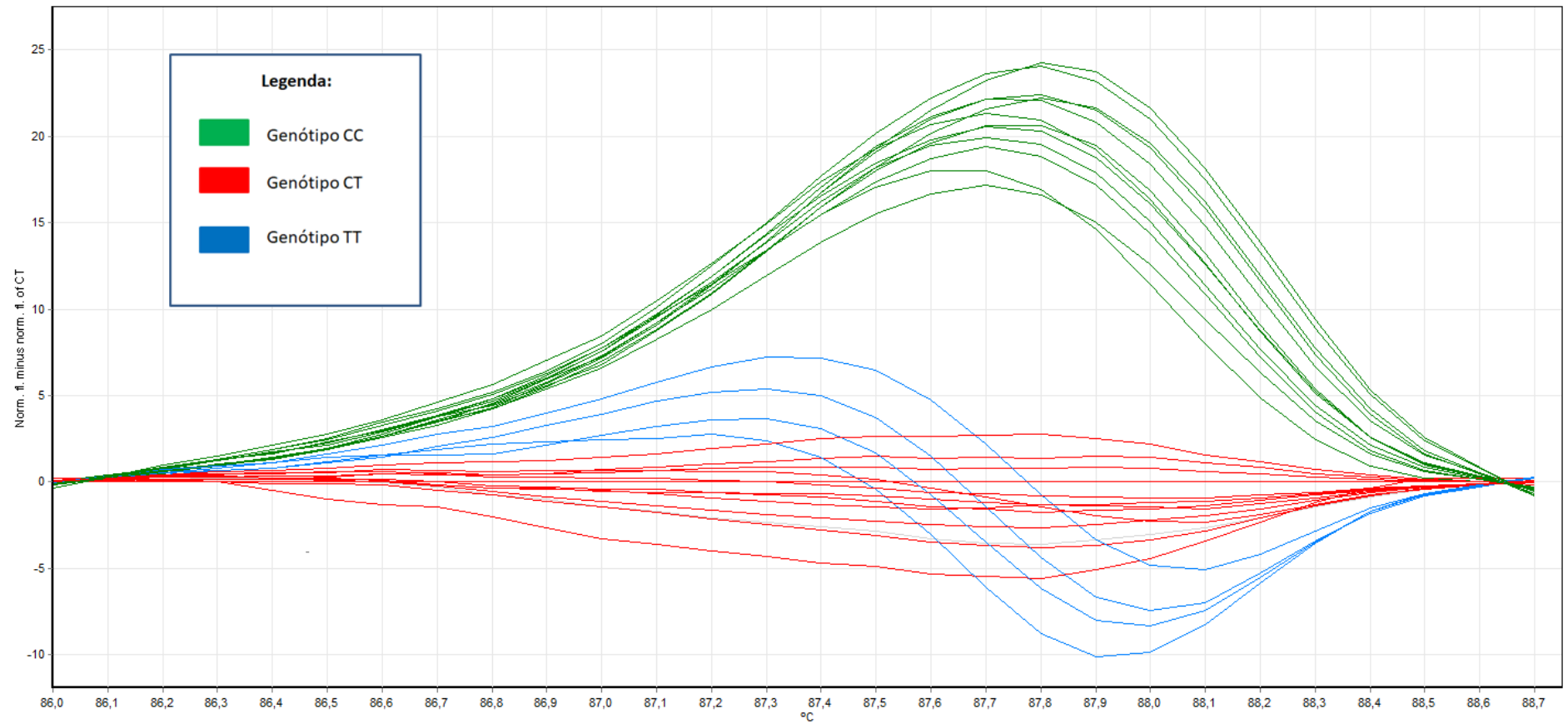
Curvas de diferença do polimorfismo *VDR* rs2228570 (normalizadas para o genótipo CT)



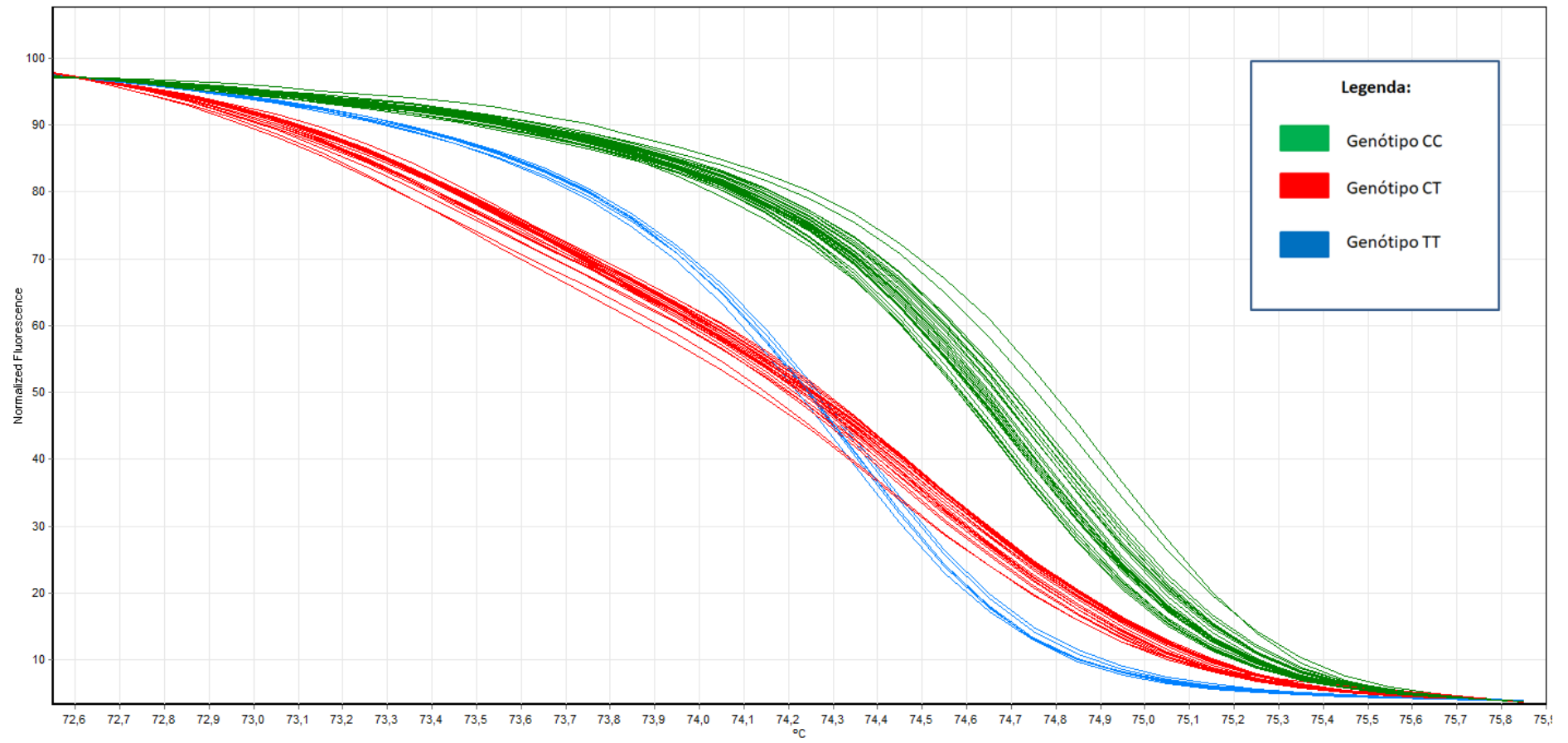
Curvas normalizadas do polimorfismo *CRHR1* rs242941



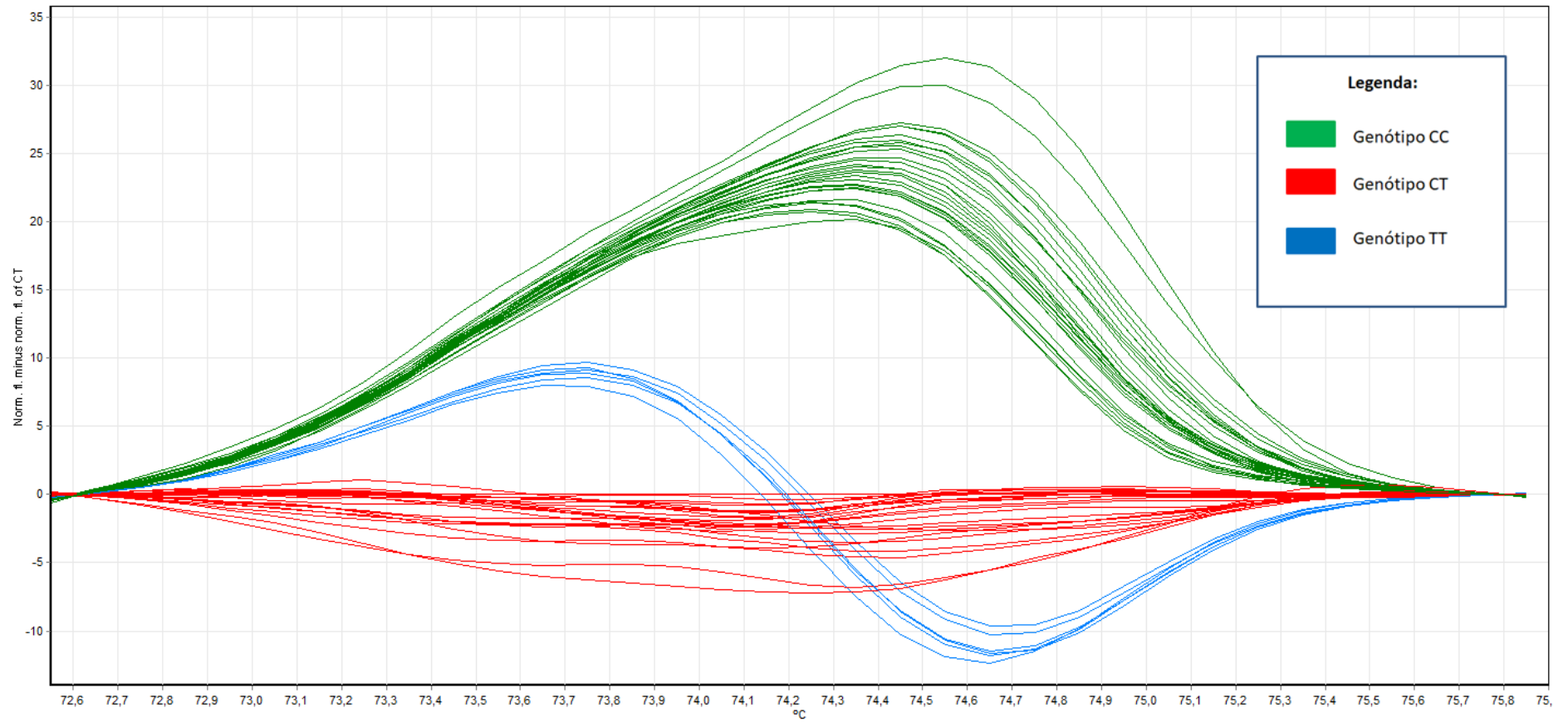
Curvas de diferença do polimorfismo *CRHR1* rs242941 (normalizadas para o genótipo CT)



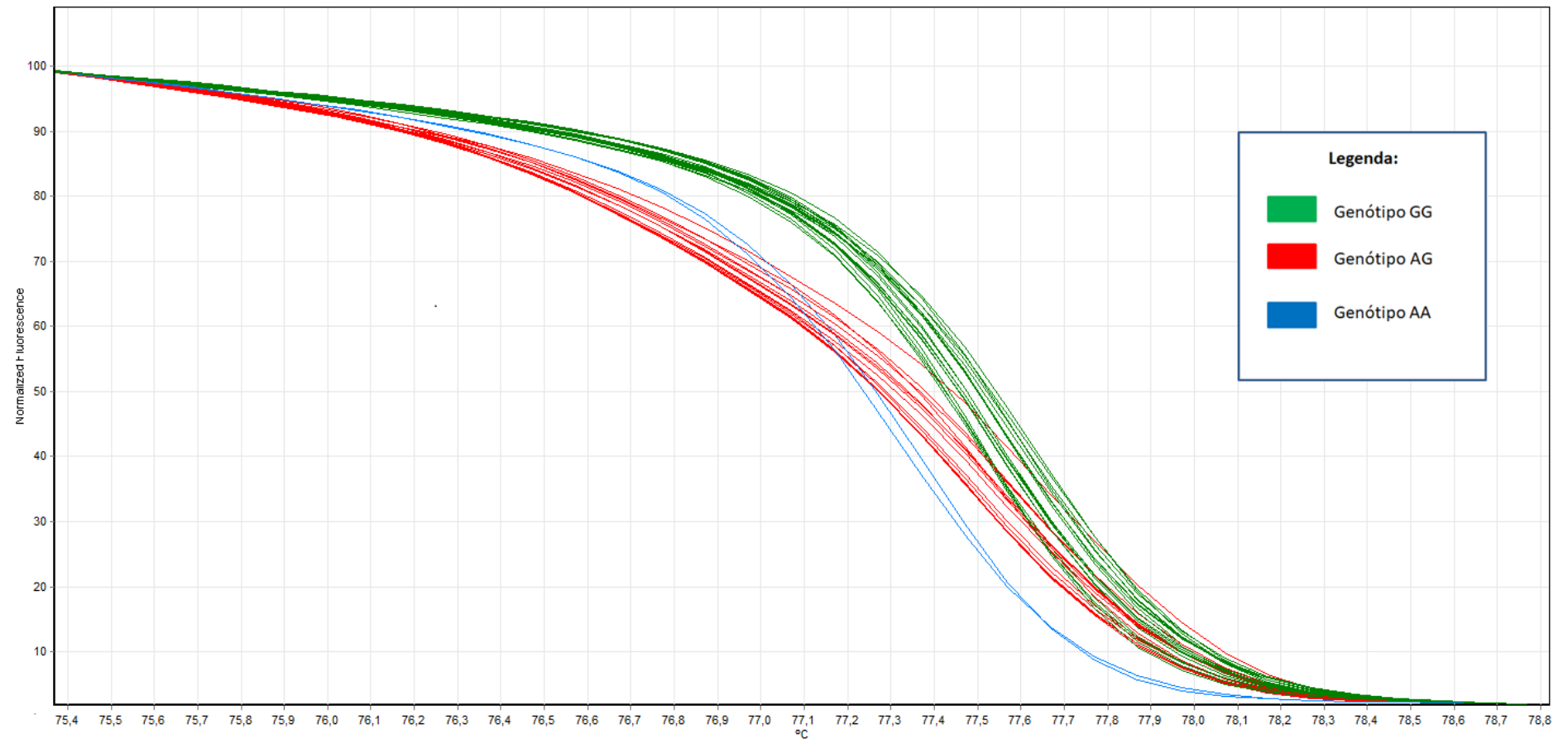
Curvas normalizadas do polimorfismo *GLCC11* rs37972



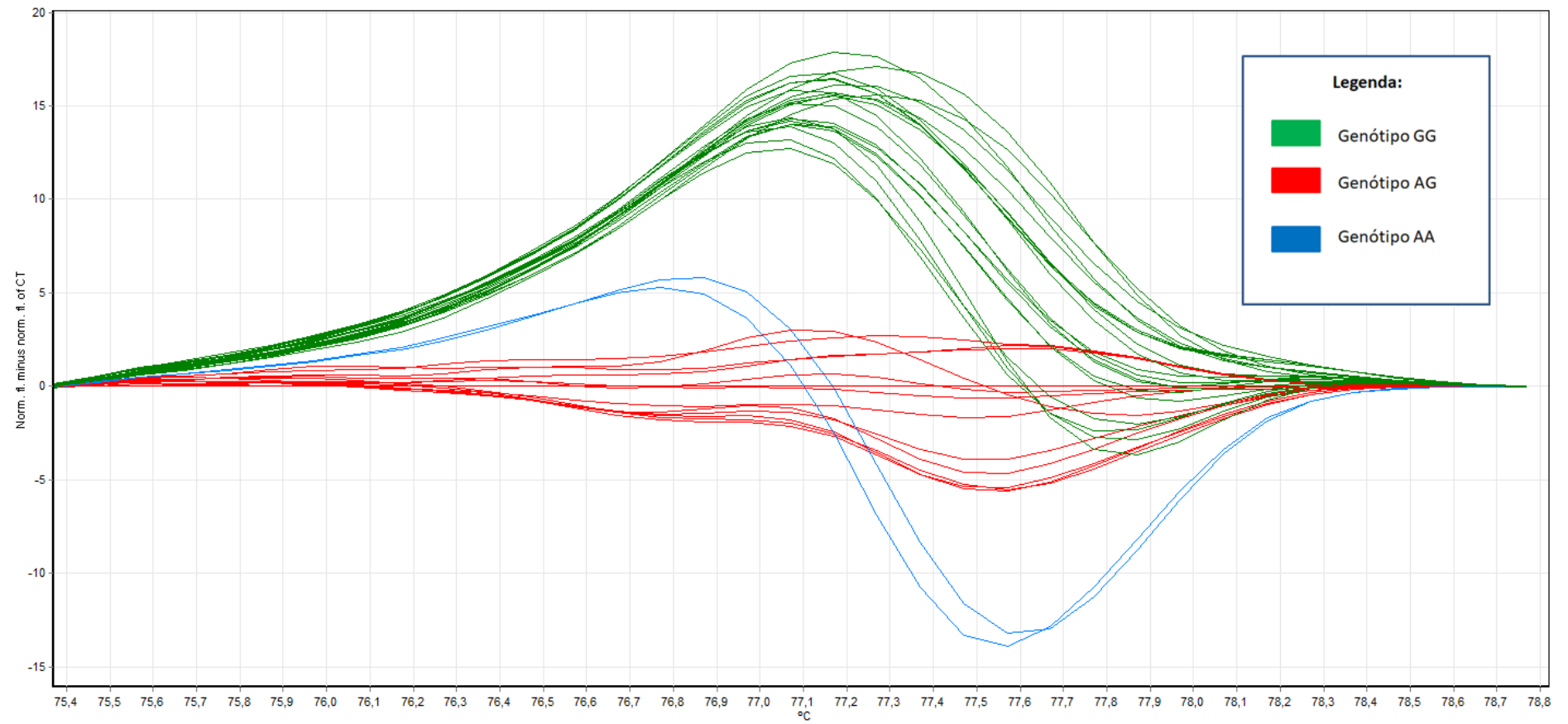
Curvas de diferença do polimorfismo *GLCCI1* rs37972 (normalizadas para o genótipo CT)



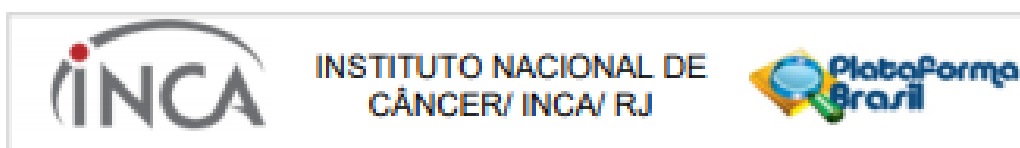
Curvas normalizadas do polimorfismo *CYP3A5* rs776746



Curvas de diferença do polimorfismo *CYP3A5* rs776746 (normalizadas para o genótipo AG)



8.3. ANEXO III – CARTAS DE APROVAÇÃO DOS PROJETOS PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E PELA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS DE POLIMORFISMOS DE GENES DO METABOLISMO DE FOLATO E METILAÇÃO GLOBAL EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS

Pesquisador: Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 12255913.6.0000.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 626.268

Data da Relatoria: 28/04/2014

Apresentação do Projeto:

Conforme apresentada nos Pareceres Consubstanciados do CEP-INCA de número 476.188, datado de 02 de Dezembro de 2013 e de número 625.460, datado de 25 de abril de 2014.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme apresentado nos Pareceres Consubstanciados do CEP-INCA de número 476.188, datado de 02 de Dezembro de 2013 e de número 625.460, datado de 25 de abril de 2014.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme apresentados nos Pareceres Consubstanciados do CEP-INCA de número 476.188, datado de 02 de Dezembro de 2013 e de número 625.460, datado de 25 de abril de 2014.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme apresentados nos Pareceres Consubstanciados do CEP-INCA de número 476.188, datado de 02 de Dezembro de 2013 e de número 625.460, datado de 25 de abril de 2014.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme apresentados nos Pareceres Consubstanciados do CEP-INCA de número 476.188,

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 303
Bairro: CENTRO **CEP:** 20.231-062
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21) 3207-4550 **Fax:** (21) 3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER/ INCA/ RJ



Continuação do Parecer: 626.268

datado de 02 de Dezembro de 2013 e de número 625.460, datado de 25 de abril de 2014.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de análise das pendências apresentadas nos Pareceres Consubstanciados do CEP-INCA de número 476.188, datado de 02 de Dezembro de 2013 e número 625.460, datado de 25 de abril de 2014:

1) Apresentar um TCLE para responsáveis de todos os participantes da pesquisa, ou, se for necessário para a coleta de amostras diferencial das mães, dois TCLEs para responsáveis de participantes da pesquisa de acordo com faixa etária descrita.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2) Apresentar é um TERMO de ASSENTIMENTO para participantes da pesquisa adolescentes (12-18 anos).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3) Modificar o TCLE no item Riscos.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Resalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

Endereço: RUA DO RESENDE, 126 - SALA 303
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br

Página 02 de 02



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER/ INCA/ RJ



Continuação do Parecer: 626.268

RIO DE JANEIRO, 25 de Abril de 2014

Assinador por:

**Carlos Henrique Debenedito Silva
(Coordenador)**

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203

Bairro: CENTRO

CEP: 20.231-082

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3207-4550

Fax: (21)3207-4550

E-mail: cep@inca.gov.br

Página 03 de 03

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS MULTI-INSTITUCIONAL DAS LEUCEMIAS INFANTIS: CONTRIBUIÇÃO DOS MARCADORES IMUNO-MOLECULARES NA DISTINÇÃO DE SEUS SUBTIPOS E DE FATORES DE RISCOS ETIOPATOGENICOS.

Pesquisador: Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa na qual esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos participantes da pesquisa;)

Versão: 5

CAAE: 33243214.7.0000.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.394.043

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

Importância da identificação de biomarcadores em leucemias da criança e do adolescente. Nas últimas quatro décadas, o progresso no tratamento do câncer na infância e na adolescência foi extremamente significativo. Hoje, em torno de 70% das crianças e adolescentes acometidos de leucemias podem ser curados, e tratados em centros especializados. A maioria deles terá boa qualidade de vida após o tratamento adequado. As incidências de câncer infantil no Brasil apresentam taxas variáveis, dependendo da área geográfica sugerindo fatores ambientais ou de estilo de vida. Atualmente redes de atendimentos à criança com câncer estão bem estabelecidas fortalecendo o tratamento clínico e as interações para execução de investigações científicas. Desta forma, apesar do câncer infantil ser raro, as pesquisas realizadas neste grupo de neoplasias, tem impacto na saúde pública, particularmente na qualidade de vida, pois a grande maioria câncer infantil é extremamente curável. As leucemias agudas da infância e os tumores embrionários têm em comum a origem durante as primeiras fases da embriogênese. Estas neoplasias ocorrem em maior frequência na primeira infância e têm aspectos morfológicos semelhantes a estruturas de

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde	
Bairro: Asa Norte	CEP: 70.750-521
UF: DF	Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878	E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.394.043

Outros	Carta de Anuência_Hospital Sarina Rolim.pdf	03/07/2014 15:37:03		Aceito
Outros	Carta de Anuência_Hospital Osvaldo Cruz-CEON Dra Terezinha.pdf	03/07/2014 15:36:41		Aceito
Outros	Carta de Anuência_Hospital Martagão Gesteira_Bahia.pdf	03/07/2014 15:36:28		Aceito
Outros	Carta de Anuência_Hospital Infantil Darcy Vargas.pdf	03/07/2014 15:36:11		Aceito
Outros	Carta de Anuência_Hospital Domingos Boldrini_Andres Yunes.pdf	03/07/2014 15:35:58		Aceito
Outros	Carta de Anuência_Hospital da Criança de Brasília.pdf	03/07/2014 15:35:34		Aceito
Outros	Carta de Anuência_Hospital Amaral Carvalho-Dr. Alejandro.pdf	03/07/2014 15:35:20		Aceito
Outros	Carta de Anuência_CETCHI_Marcelo e Rosania.pdf	03/07/2014 15:34:58		Aceito
Outros	Carta de Anuência_Associação de Combate ao Câncer de Golas.pdf	03/07/2014 15:34:09		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Pesquisa com Biorrepositorio_CEP2014.doc	03/07/2014 15:33:08		Aceito
Parecer Anterior	Aprovação do Projeto 05_2006.pdf	03/07/2014 14:40:35		Aceito
Parecer Anterior	Aprovação de Relatório_Projeto 05-2006.pdf	03/07/2014 14:40:10		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

BRASILIA, 25 de Janeiro de 2016

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

8.4. ANEXO IV – ANÁLISES DETALHADAS DAS ASSOCIAÇÕES ENTRE OS GENÓTIPOS E O RISCO PARA LLA PEDIÁTRICA.

Tabela 8.1. Distribuições das freqüências genotípicas e associações de riscos em em casos de leucemias linfoblásticas e controles, Brasil, 2012-2015.

Genótipo	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada** (IC95%)	P-valor**
MTHFR rs1801133	329 (100)	346 (100)			
CC	152 (46,2)	183 (52,9)	1,0*	1,0*	
CT	146 (44,4)	132 (38,2)	1,33 (0,97-1,83)	1,21 (0,87-1,69)	0,25
TT	31 (9,4)	31 (8,9)	1,20 (0,70-2,07)	0,94 (0,53-1,67)	0,84
MD			1,31 (0,97-1,77)	1,18 (0,86-1,61)	0,31
MR			1,06 (0,63-1,78)	0,86 (0,50-1,48)	0,60
CRHR1 rs242941	326 (100)	345 (100)			
CC	114 (35,0)	123 (35,6)	1,0*	1,0*	
CA	159 (48,8)	170 (49,3)	1,01 (0,72-1,41)	1,01 (0,80-1,50)	0,64
AA	53 (16,2)	52 (15,1)	1,12 (0,70-1,74)	1,17 (0,73-1,87)	0,52
MD			1,03 (0,75-1,41)	1,10 (0,79-1,53)	0,55
MR			1,10 (0,72-1,66)	1,12 (0,73-1,73)	0,59
GLCCI1 rs37972	337 (100)	343 (100)			
CC	137 (40,7)	158 (46,1)	1,0*	1,0*	
CT	154 (45,7)	154 (44,9)	1,15 (0,84-1,59)	1,15 (0,83-1,60)	0,39
TT	46 (13,6)	31 (9,0)	1,71 (1,03-2,85)	1,64 (0,98-2,76)	0,06
MD			1,25 (0,92-1,69)	1,24 (0,91-1,69)	0,18
MR			1,59 (0,98-2,58)	1,59 (0,98-2,58)	0,09
VDR rs1544410	333 (100)	348 (100)			
GG	144 (43,2)	156 (44,8)	1,0*	1,0*	
GA	149 (44,8)	145 (41,7)	1,11 (0,81-1,54)	1,12 (0,80-1,56)	0,49
AA	40 (12,0)	47 (13,5)	0,92 (0,57-1,49)	0,94 (0,57-1,53)	0,79
MD			1,07 (0,79-1,44)	1,07 (0,79-1,47)	0,65
MR			0,87 (0,56-1,37)	0,88 (0,55-1,40)	0,59
VDR rs2228570	334 (100)	344 (100)			
CC	138 (41,3)	163 (47,4)	1,0*	1,0*	
CT	152 (45,5)	150 (43,6)	1,20 (0,87-1,65)	1,21 (0,87-1,68)	0,26
TT	44 (13,2)	31 (9,0)	1,68 (1,00-2,80)	1,85 (1,07-3,20)	0,03
MD			1,28 (0,94-1,73)	1,30 (0,96-1,78)	0,09
MR			1,53 (0,94-2,50)	1,67 (0,99-2,83)	0,05
CYP3A5 rs776746	320 (100)	349 (100)			
AA	41 (12,8)	52 (14,9)	1,0*	1,0*	
AG	134 (41,9)	151 (43,3)	1,13 (0,70-1,80)	1,07 (0,66-1,73)	0,78
GG	145 (45,3)	146 (41,8)	1,26 (0,79-2,01)	1,06 (0,65-1,73)	0,80
MD			1,19 (0,77-1,85)	1,07 (0,68-1,69)	0,77
MR			1,15 (0,85-1,56)	1,02 (0,74-1,4)	0,92

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência. **ajuste por cor de pele.

Tabela 8.1. Distribuições das freqüências genótípicas e associações de riscos em em casos de leucemias linfoblásticas e controles, Brasil, 2012-2015 (continuação).

Genótipo	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada** (IC95%)	P-valor**
<i>GSTM1</i> del	307 (100)	349 (100)			
Não nulo	160 (52,1)	204 (58,5)	1,0*	1,0*	
Nulo	147 (47,9)	145 (41,5)	1,30 (0,95-1,76)	1,21 (0,88-1,66)	0,24
<i>GSTT1</i> del	307 (100)	349 (100)			
Não nulo	204 (66,4)	277 (79,4)	1,0*	1,0*	
Nulo	103 (33,6)	72 (20,6)	1,94 (1,37-2,76)	2,04 (1,42-2,94)	<0,001

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência. **ajuste por cor de pele.

Tabela 8.2. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com o subtipo de LLA, Brasil, 2012-2015.

Genótipo	LLA-cpB					LLA-T				
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**
MTHFR										
rs1801133	269 (100)	346 (100)				60 (100)	346 (100)			
CC	122 (45,3)	183 (52,9)	1,0*	1,0*		30 (50)	183 (52,9)	1,0*	1,0*	
CT	121 (45,0)	132 (38,2)	1,38 (0,98-1,93)	1,24 (0,87-1,76)	0,23	25 (41,7)	132 (38,2)	1,15 (0,65-2,05)	1,07 (-,59-1,92)	0,83
TT	26 (9,7)	31 (8,9)	1,26 (0,71-2,22)	0,95 (0,52-1,73)	0,86	5 (8,3)	31 (8,9)	0,98 (0,35-2,72)	0,79 (0,27-2,32)	0,67
MD			1,35 (0,98-1,86)	1,20 (0,86-1,67)	0,28			1,12 (0,65-1,93)	1,04 (0,59-1,82)	0,90
MR			1,09 (0,63-1,87)	0,86 (0,49-1,51)	0,60			0,92 (0,34-2,48)	0,78 (0,28-2,16)	0,63
CRHR1										
rs242941	266(100)	345 (100)				60 (100)	345 (100)			
CC	97 (36,5)	123 (35,6)	1,0*	1,0*		17 (28,3)	123 (35,6)	1,0*	1,0*	
CA	128 (48,1)	170 (49,3)	0,95 (0,67-1,36)	1,03 (0,71-1,48)	0,88	31 (51,7)	170 (49,3)	1,3 (0,70-2,49)	1,42 (0,75-2,70)	0,28
AA	41 (15,4)	52 (15,1)	0,99 (0,61-1,63)	1,05 (0,64-1,74)	0,85	12 (20,0)	52 (15,1)	1,67 (0,75-3,74)	1,72 (0,76-3,90)	0,19
MD			0,97 (0,69-1,35)	1,03 (0,73-1,46)	0,85			1,40 (0,77-2,56)	1,48 (0,81-2,73)	0,20
MR			1,03 (0,66-1,60)	1,04 (0,66-1,64)	0,87			1,40 (0,70-2,83)	1,44 (0,71-2,92)	0,31
GLCCI1										
rs37972	277(100)	343 (100)				60 (100)	343 (100)			
CC	111 (40,1)	158 (46,1)	1,0*	1,0*		60 (100)	343 (100)	1,0*	1,0*	
CT	125 (45,1)	154 (44,9)	1,16 (0,82-1,62)	1,16 (0,82-1,65)	0,39	26 (43,3)	158 (46,1)	1,14 (0,64-2,03)	1,12 (0,63-2,00)	0,67
TT	41 (14,8)	31 (9,0)	1,88 (1,11-3,18)	1,78 (1,04-3,06)	0,03	29 (48,3)	154 (44,9)	0,98 (0,35-2,75)	0,93 (0,33-2,62)	0,89
MD			1,28 (0,93-1,76)	1,27 (0,91-1,77)	0,15	5 (8,3)	31 (9,0)	1,12 (0,64-1,94)	1,10 (0,63-1,92)	0,73
MR			1,75 (1,06-2,87)	1,64 (0,99-2,71)	0,05			0,92 (0,34-2,46)	0,90 (0,33-2,43)	0,84

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência. **ajuste por cor de pele.

Tabela 8.2. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com o subtipo de LLA, Brasil, 2012-2015 (continuação).

Genótipo	LLA-cpB					LLA-T				
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**
VDR										
rs1544410	272 (100)	348 (100)				61 (100)	348 (100)			
GG	119 (43,8)	156 (44,8)	1,0*	1,0*		25 (41,0)	156 (44,8)	1,0*	1,0*	
GA	122 (44,8)	145 (41,7)	1,10 (0,78-1,55)	1,13 (0,80-1,59)	0,50	27 (44,3)	145 (41,7)	1,16 (0,64-2,09)	1,17 (0,65-2,13)	0,59
AA	31 (11,4)	47 (13,5)	0,86 (0,52-1,44)	0,86 (0,51-1,46)	0,58	9 (14,7)	47 (13,5)	1,19 (0,52-2,74)	1,26 (0,55-2,91)	0,58
MD			1,04 (0,76-1,44)	1,06 (0,76-1,47)	0,72			1,17 (0,67-2,03)	1,19 (0,68-2,08)	0,53
MR			0,82 (0,51-1,34)	0,81 (0,49-1,34)	0,42			1,11 (0,51-2,39)	1,15 (0,53-2,50)	0,73
VDR										
rs2228570	274(100)	344 (100)				60 (100)	344 (100)			
CC	109 (39,8)	163 (47,4)	1,0*	1,0*		29 (48,3)	163 (47,4)	1,0*	1,0*	
CT	126 (46,0)	150 (43,6)	1,26 (0,89-1,76)	1,27 (0,90-1,79)	0,18	26 (43,3)	150 (43,6)	0,97 (0,55-1,73)	0,98 (0,55-1,76)	0,96
TT	39 (14,2)	31 (9,0)	1,88 (1,10-3,19)	2,02 (1,14-3,56)	0,02	5 (8,4)	31 (9,0)	0,90 (0,32-2,52)	1,06 (0,37-3,00)	0,92
MD			1,36 (0,99-1,88)	1,38 (0,99-1,92)	0,05			0,96 (0,56-1,67)	1,00 (0,57-1,73)	0,99
MR			1,68 (1,01-2,76)	1,79 (1,04-3,06)	0,03			0,92 (0,34-2,46)	1,04 (0,38-2,85)	0,94
CYP3A5										
rs776746	262(100)	349 (100)				58 (100)	349 (100)			
AA	38(14,5)	52 (14,9)	1,0*	1,0*		3 (5,2)	52 (14,9)	1,0*	1,0*	
AG	110(42,0)	151 (43,3)	1,00 (0,61-1,62)	0,94 (0,57-1,56)	0,82	24 (41,4)	151 (43,3)	2,75 (0,79-9,53)	2,69 (0,77-9,35)	0,12
GG	114 (43,5)	146 (41,8)	1,07 (0,66-1,73)	0,90 (0,54-1,50)	0,69	31 (53,4)	146 (41,8)	3,68 (1,08-12,55)	3,19 (0,92-11,07)	0,07
MD			1,03 (0,66-1,62)	0,92 (0,58-1,47)	0,74			3,21 (0,97-10,64)	2,97 (0,89-9,92)	0,08
MR			1,07 (0,77-1,48)	0,94 (0,67-1,31)	0,71			1,59 (0,91-2,79)	1,50 (0,84-2,66)	0,17

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência. **ajuste por cor de pele.

Tabela 8.2. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com o subtipo de LLA, Brasil, 2012-2015 (continuação).

Genótipo	LLA-cpB					LLA-T				
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**
GSTM1										
del	247 (100)	349 (100)				60	349 (100)			
Não nulo	122 (49,4)	204 (58,5)	1,0*	1,0*		38 (63,3)	204 (58,5)	1,0*	1,0*	
Nulo	125 (50,6)	145 (41,5)	1,44 (1,04-2,00)	1,34 (0,96-1,81)	0,08	22 (36,7)	145 (41,5)	0,80 (0,48-1,47)	0,77 (0,44-1,37)	0,39
GSTT1										
del	247 (100)	349 (100)				60 (100)	349 (100)			
Não nulo	160 (64,8)	277 (79,4)	1,0*	1,0*		44 (73,3)	277 (79,4)	1,0*	1,0*	
Nulo	87 (35,2)	72 (20,6)	2,09 (1,45-3,02)	2,20 (1,50-3,22)	<0,001	16 (26,7)	72 (20,6)	1,39 (0,75-2,62)	1,49 (0,80-2,82)	0,22

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência. **ajuste por cor de pele.

Tabela 8.3. Análise de associações de risco dos genótipos de acordo com a cor de pele, Brasil, 2012-2015.

Genótipo	Branços				Não brancos			
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR (IC95%)	P-valor	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR (IC95%)	P-valor
MTHFR								
rs1801133	160 (100)	110 (100)			169 (100)	216 (100)		
CC	67 (41,8)	41 (37,3)	1,0*		85 (50,3)	130 (60,2)	1,0*	
CT	75 (46,9)	47 (42,7)	0,98 (0,57-1,66)	0,93	71 (42,0)	78 (36,1)	1,39 (0,91-2,12)	0,12
TT	18 (11,3)	22 (20,0)	0,50 (0,24-1,04)	0,06	13 (7,7)	8 (3,7)	2,49 (0,99-6,25)	0,05
MD			0,82 (0,50-1,36)	0,45			1,49 (0,99-2,24)	0,05
MR			0,51 (0,26-0,99)	0,04			2,17 (0,88-5,36)	0,09
CRHR1								
rs242941	161 (100)	110 (100)			165 (100)	215 (100)		
CC	62 (38,5)	46 (41,9)	1,0*		52 (31,5)	71 (33,0)	1,0*	
CA	76 (47,2)	48 (43,6)	1,17 (0,69-1,99)	0,54	83 (50,3)	111 (51,6)	1,02 (0,65-1,61)	0,93
AA	23 (14,3)	16 (14,5)	1,07 (0,51-2,24)	0,86	30 (18,2)	33 (15,4)	1,24 (0,67-2,29)	0,49
MD			1,15 (0,70-1,88)	0,58			1,07 (0,69-1,65)	0,75
MR			0,98 (0,49-1,95)	0,95			1,23 (0,71-2,11)	0,46
GLCCI1								
rs37972	162 (100)	109 (100)			175 (100)	215 (100)		
CC	67 (41,4)	48 (44,0)	1,0*		70 (40,0)	101 (47,0)	1,0*	
CT	72 (44,4)	53 (48,7)	0,97 (0,58-1,63)	0,91	82 (46,9)	91 (42,3)	1,30 (0,85-1,99)	0,22
TT	23 (14,2)	8 (7,3)	2,05 (0,85-4,99)	0,11	23 (13,1)	23 (10,7)	1,44 (0,75-2,77)	0,27
MD			1,12 (0,68-1,82)	0,66			1,33 (0,89-1,99)	0,17
MR			2,08 (0,89-4,86)	0,09			1,26 (0,68-2,34)	0,46

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência.

Tabela 8.3. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com a cor de pele, Brasil, 2012-2015 (continuação).

Genótipo	Branços				Não brancos			
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR (IC95%)	P-valor	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR (IC95%)	P-valor
VDR								
rs1544410	160 (100)	110 (100)			173 (100)	218 (100)		
GG	63 (39,4)	49 (44,6)	1,0*		81 (46,8)	101 (46,4)	1,0*	
GA	75 (46,9)	46 (41,8)	1,27 (0,75 -2,14)	0,37	74 (42,8)	89 (40,8)	1,04 (0,68-1,59)	0,87
AA	22 (13,7)	15 (13,6)	1,14 (0,54-2,43)	0,73	18 (10,4)	28 (12,8)	0,80 (0,41-1,55)	0,51
MD			1,24 (0,76-2,02)	0,39			0,98 (0,66-1,46)	0,92
MR			1,01 (0,49-2,05)	0,98			0,79 (0,42-1,48)	0,79
VDR								
rs2228570	162 (100)	109 (100)			172 (100)	215 (100)		
CC	63 (38,9)	48 (44,1)	1,0*		75 (43,6)	110 (51,1)	1,0*	
CT	74 (45,7)	48 (44,0)	1,17 (0,69-1,98)	0,55	78 (45,4)	93 (43,3)	1,23 (0,81-1,87)	0,33
TT	25 (15,4)	13 (11,9)	1,47 (0,68-3,16)	0,33	19 (11,0)	12 (5,6)	2,32 (1,06-5,07)	0,03
MD			1,24 (0,76-2,02)	0,40			1,35 (0,91-2,03)	0,14
MR			1,35 (0,66-2,77)	0,41			1,14 (0,53-2,44)	0,05
CYP3A5								
rs776746	154 (100)	117 (100)			166 (100)	212 (100)		
AA	16 (10,4)	12 (10,3)	1,0*		25 (15,1)	35 (16,6)	1,0*	
AG	53 (34,4)	41 (35,0)	0,97 (0,41-2,27)	0,94	81 (48,8)	101 (47,6)	1,12 (0,62-2,02)	0,70
GG	85 (55,2)	64 (54,7)	1,00 (0,44-2,25)	0,99	60 (36,1)	76 (35,8)	1,10 (0,60-2,04)	0,75
MD			0,99 (0,45-2,17)	0,97			1,11 (0,64-1,95)	0,70
MR			1,02 (0,63-1,65)	0,93			1,01 (0,66-1,55)	0,95

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência.

Tabela 8.3. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com a cor de pele, Brasil, 2012-2015 (continuação).

Genótipo	Branços				Não brancos			
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR (IC95%)	P-valor	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR (IC95%)	P-valor
GSTM1								
Del	156 (100)	118 (100)			151 (100)	211 (100)		
Não nulo	76 (48,7)	64 (54,2)	1,0*		84 (55,6)	126 (59,7)	1,0*	
Nulo	80 (51,3)	54 (45,8)	1,25 (0,77-2,01)	0,37	67 (44,4)	85 (40,3)	1,18 (0,77-1,80)	0,44
GSTT1								
Del	156 (100)	118 (100)			151 (100)	211 (100)		
Não nulo	106 (67,9)	101 (85,6)	1,0*		98 (64,9)	160 (75,8)	1,0*	
Nulo	50 (32,1)	17 (14,4)	2,80 (1,52-5,18)	0,001	53 (35,1)	51 (24,2)	1,70 (1,07-2,69)	0,02

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência.

Tabela 8.4. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com a idade Brasil, 2012-2015.

Genótipo	≤ 5 anos					> 5 anos				
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**
MTHFR										
rs1801133	184 (100)	346 (100)				145 (100)	346 (100)			
CC	79 (42,9)	183 (52,9)	1,0*	1,0*		73 (50,3)	183 (52,9)	1,0*	1,0*	
CT	87 (47,3)	132 (38,2)	1,53 (1,05-2,23)	1,40 (0,95-2,07)	0,08	59 (40,7)	132 (38,2)	1,12 (0,74-1,69)	0,98 (0,64-1,50)	0,94
TT	18 (9,8)	31 (8,9)	1,34 (0,71-2,54)	0,98 (0,50-1,95)	0,96	13 (9,0)	31 (8,9)	1,05 (0,52-2,12)	0,81 (0,38-1,70)	0,58
MD			1,49 (1,04-2,14)	1,34 (0,92-1,95)	0,12			1,11 (0,75-1,63)	0,97 (0,65-1,45)	0,87
MR			1,10 (0,59-2,03)	0,86 (0,46-1,63)	0,65			1,00 (0,51-1,97)	0,79 (0,39-1,60)	0,52
CRHR1										
rs242941	181 (100)	345 (100)				145 (100)	345 (100)			
CC	70 (38,7)	123 (35,6)	1,0*	1,0*		44 (30,3)	123 (35,6)	1,0*	1,0*	
CA	83 (45,9)	170 (49,3)	0,86 (0,58-1,27)	0,94 (0,63-1,41)	0,77	76 (52,4)	170 (49,3)	1,25 (0,81-1,93)	1,31 (0,84-2,06)	0,23
AA	28 (15,5)	52 (15,1)	0,95 (0,55-1,63)	1,03 (0,58-1,80)	0,91	25 (17,2)	52 (15,1)	1,34 (0,75-2,42)	1,38 (0,76-2,51)	0,29
MD			0,88 (0,60-1,27)	0,96 (0,65-1,40)	0,82			1,27 (0,84-1,93)	1,34 (0,87-2,05)	0,18
MR			1,03 (0,62-1,69)	1,07 (0,64-1,78)	0,80			1,17 (0,69-1,98)	1,18 (0,69-2,02)	0,54
						149 (100)	343 (100)			
GLCCI1										
rs37972	188 (100)	343 (100)				62 (41,6)	158 (46,1)			
CC	75 (39,9)	158 (46,1)	1,0*	1,0*		62 (41,6)	158 (46,1)	1,0*	1,0*	
CT	86 (45,7)	154 (44,9)	1,17 (0,80-1,72)	1,18 (0,80-1,74)	0,40	68 (45,6)	154 (44,9)	1,12 (0,75-1,69)	1,11 (0,73-1,68)	0,63
TT	27 (14,4)	31 (9,0)	1,83 (1,02-3,29)	1,81 (1,00-3,28)	0,05	19 (12,8)	31 (9,0)	1,56 (0,82-2,97)	1,48 (0,77-2,85)	0,24
MD			1,28 (0,89-1,84)	1,28 (0,89-1,85)	0,18			1,19 (0,81-1,76)	1,17 (0,79-1,74)	0,44
MR			1,68 (0,97-2,92)	1,64 (0,94-2,85)	0,08			1,52 (0,83-2,79)	1,40 (0,76-2,60)	0,28

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência. ** ajustado por cor de pele.

Tabela 8.4. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com a idade Brasil, 2012-2015 (continuação).

Genótipo	≤ 5 anos					> 5 anos				
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**
VDR										
rs1544410	184 (100)	348 (100)				149 (100)	348 (100)			
GG	76 (41,3)	156 (44,8)	1,0*	1,0*		68 (45,6)	156 (44,8)	1,0*	1,0*	
GA	85 (46,2)	145 (41,7)	1,20 (0,82-1,76)	1,24 (0,84-1,83)	0,27	64 (43,0)	145 (41,7)	1,01 (0,67-1,52)	0,99 (0,65-1,51)	0,98
AA	23 (12,5)	47 (13,5)	1,00 (0,57-1,77)	1,02 (0,57-1,83)	0,94	17 (11,4)	47 (13,5)	0,83 (0,44-1,55)	0,85 (0,45-1,61)	0,62
MD			1,15 (0,80-1,66)	1,19 (0,82-1,72)	0,35			0,97 (0,66-1,42)	0,96 (0,65-1,42)	0,83
MR			0,91 (0,54-1,56)	0,92 (0,53-1,59)	0,77			0,82 (0,46-1,49)	0,84 (0,46-1,54)	0,58
VDR										
rs2228570	187 (100)	344 (100)				147 (100)	344 (100)			
CC	78 (41,7)	163 (47,4)	1,0*	1,0*		60 (40,8)	163 (47,4)	1,0*	1,0*	
CT	87 (46,5)	150 (43,6)	1,21 (0,83-1,77)	1,20 (0,82-1,77)	0,34	65 (44,2)	150 (43,6)	1,17 (0,77-1,78)	1,21 (0,79-1,85)	0,38
TT	22 (11,8)	31 (9,0)	1,48 (0,80-2,73)	1,61 (0,85-3,09)	0,14	22 (15,0)	31 (9,0)	1,93 (1,03-3,58)	2,13 (1,10-4,12)	0,02
MD			1,26 (0,88-1,80)	1,26 (0,87-1,82)	0,21			1,30 (0,88-1,93)	1,36 (0,91-2,02)	0,13
MR			1,34 (0,75-2,39)	1,43 (0,77-2,64)	0,25			1,78 (0,99-3,19)	1,96 (1,05-3,63)	0,03
CYP3A5										
rs776746	179 (100)	349 (100)				141(100)	349 (100)			
AA	26 (14,5)	52 (14,9)	1,0*	1,0*		15 (10,6)	52 (14,9)	1,0*	1,0*	
AG	78 (43,6)	151 (43,3)	1,03 (0,60-1,78)	0,98 (0,56-1,71)	0,95	56 (39,7)	151 (43,3)	1,29 (0,67-2,46)	1,21 (0,63-2,36)	0,56
GG	75 (41,9)	146 (41,8)	1,03 (0,59-1,77)	0,86 (0,49-1,53)	0,62	70 (49,6)	146 (41,8)	1,66 (0,87-3,16)	1,40 (0,72-2,71)	0,31
MD			1,03 (0,62-1,71)	0,93 (0,55-1,57)	0,78			1,47 (0,80-2,71)	1,30 (0,70-2,44)	0,40
MR			1,00 (0,69-1,44)	0,89 (0,61-1,29)	0,53			1,37 (0,93-2,03)	1,20 (0,80-1,81)	0,37

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência. ** ajustado por cor de pele.

Tabela 8.4. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com a idade, Brasil, 2012-2015 (continuação).

Genótipo	≤ 5 anos					> 5 anos				
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**
GSTM1										
del	166 (100)	349 (100)				141 (100)	349 (100)			
Não nulo	87 (52,4)	204 (58,5)	1,0*	1,0*		73 (51,8)	204 (58,5)	1,0	1,0*	
Nulo	79 (47,6)	145 (41,5)	1,28 (0,88-1,85)	1,19 (0,82-1,75)	0,36	68 (48,2)	145 (41,5)	1,31 (0,88-1,94)	1,23 (0,83-1,84)	0,30
GSTT1										
del	166 (100)	349 (100)				141 (100)	349 (100)			
Não nulo	108 (65,1)	277 (79,4)	1,0	1,0*		96 (68,1)	277 (79,4)	1,0	1,0*	
Nulo	58 (34,9)	72 (20,6)	2,06 (1,37-3,11)	2,23 (1,46-3,42)	<0,001	45 (31,9)	72 (20,6)	1,80 (1,16-2,80)	1,89 (1,20-2,97)	0,006

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência. ** ajustado por cor de pele.

Tabela 8.5. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com sexo, Brasil, 2012-2015.

Genótipo	Masculino					Feminino				
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**
MTHFR										
rs1801133	203 (100)	191 (100)				126 (100)	155 (100)			
CC	93 (45,8)	98 (51,3)	1,0*	1,0*		59 (46,8)	85 (54,9)	1,0*	1,0*	
CT	92 (45,3)	75 (39,3)	1,29 (0,85-1,96)	1,13 (0,73-1,76)	0,57	54 (42,9)	57 (36,8)	1,36 (0,83-2,25)	1,28 (0,77-2,13)	0,34
TT	18 (8,9)	18 (9,4)	1,05 (0,52-2,15)	0,73 (0,33-1,56)	0,64	13 (10,3)	13 (8,3)	1,44 (0,62-3,33)	1,25 (0,53-2,97)	0,60
MD			1,25 (0,84-1,85)	1,08 (0,71-1,64)	0,71			1,38 (0,86-2,21)	1,27 (0,78-2,07)	0,32
MR			0,94 (0,47-1,85)	0,74 (0,36-1,52)	0,41			1,26 (0,56-2,82)	1,06 (0,47-2,42)	0,88
CRHR1										
rs242941	199 (100)	191 (100)				127 (100)	154 (100)			
CC	73 (36,7)	66 (34,5)	1,0*	1,0*		41 (32,3)	57 (37,0)	1,0*	1,0*	
CA	91 (45,7)	100 (52,4)	0,82 (0,53-1,27)	0,86 (0,55-1,36)	0,53	68 (53,6)	70 (45,5)	1,35 (0,80-2,28)	1,50 (0,88-2,56)	0,13
AA	35 (17,6)	25 (13,1)	1,27 (0,69-2,33)	1,29 (0,69-2,43)	0,42	18 (14,1)	27 (17,5)	0,93 (0,45-1,90)	1,03 (0,49-2,14)	0,95
MD			0,91 (0,60-1,38)	0,96 (0,62-1,48)	0,85			1,23 (0,75-2,02)	1,36 (0,82-2,25)	0,23
MR			1,01 (0,60-1,70)	1,45 (0,81-2,58)	0,20			0,78 (0,41-1,49)	0,80 (0,41-1,55)	0,51
GLCC11										
rs37972	205 (100)	190 (100)				132 (100)	153 (100)			
CC	81 (39,5)	89 (46,8)	1,0*	1,0*		56 (42,4)	69 (45,1)	1,0*	1,0*	
CT	91 (44,4)	84 (44,2)	1,19 (0,78-1,82)	1,16 (0,85-1,80)	0,49	63 (47,7)	70 (45,8)	1,11 (0,68-1,81)	1,13 (0,69-1,87)	0,62
TT	33 (16,1)	17 (9,0)	2,13 (1,10-4,12)	1,92 (0,97-3,79)	0,06	13 (9,9)	14 (9,1)	1,14 (0,50-2,63)	1,14 (0,49-2,65)	0,76
MD			1,35 (0,90-2,01)	1,30 (0,86-1,96)	0,21			1,11 (0,70-1,78)	1,13 (0,70-1,83)	0,60
MR			1,95 (1,05-3,64)	1,79 (0,95-3,37)	0,07			1,08 (0,49-2,40)	1,06 (0,48-2,37)	0,88

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência. ** ajustado por cor de pele.

Tabela 8.5. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com sexo, Brasil, 2012-2015 (continuação).

Genótipo	Masculino					Feminino				
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**
VDR										
rs1544410	205 (100)	191 (100)				128 (100)	157 (100)			
GG	95 (46,3)	94 (49,2)	1,0*	1,0*		49 (38,3)	62 (39,5)	1,0*	1,0*	
GA	82 (40,0)	81 (42,4)	1,00 (0,66-1,52)	0,98 (0,64-1,51)	0,92	67 (52,3)	64 (40,8)	1,32 (0,80-2,20)	1,42 (0,85-2,39)	0,18
AA	28 (13,7)	16 (8,4)	1,73 (0,88-3,41)	1,77 (0,87-3,62)	0,11	12 (9,4)	31 (19,7)	0,49 (0,23-1,05)	0,50 (0,23-1,10)	0,09
MD			1,12 (0,76-1,67)	1,10 (0,73-1,66)	0,64			1,05 (0,65-1,70)	0,11 (0,68-1,81)	0,66
MR			1,73 (0,90-3,31)	1,78 (0,89-3,55)	0,99			0,42 (0,21-0,86)	0,42 (0,20-0,86)	0,02
VDR										
rs2228570	203 (100)	188 (100)				131 (100)	156 (100)			
CC	93 (45,8)	85 (45,2)	1,0*	1,0*		45 (34,4)	78 (50,0)	1,0*	1,0*	
CT	85 (41,9)	86 (45,8)	0,90 (0,59-1,37)	0,91 (0,59-1,41)	0,69	67 (51,1)	64 (41,0)	1,81 (1,10-3,00)	1,80 (1,08-2,99)	0,02
TT	25 (12,3)	17 (9,0)	1,34 (0,68-2,66)	1,45 (0,70-3,02)	0,31	19 (14,5)	14 (9,0)	2,35 (1,08-5,14)	2,63 (1,13-6,09)	0,02
MD			0,98 (0,66-1,45)	0,99 (0,66-1,50)	0,99			1,91 (1,18-3,08)	1,93 (1,19-3,15)	0,008
MR			1,41 (0,74-2,71)	1,49 (0,74-3,02)	0,26			1,72 (0,83-3,58)	1,96 (0,89-4,32)	0,09
CYP3A5										
rs776746	195 (100)	189 (100)				125 (100)	160 (100)			
AA	26 (13,3)	23 (12,1)	1,0*	1,0*		15(12,0)	29 (18,1)	1,0*	1,0*	
AG	78 (40,0)	88 (46,6)	0,78 (0,41-1,48)	0,78 (0,40-1,52)	0,47	56 (44,8)	63 (39,4)	1,72 (0,84-3,53)	1,60 (0,76-3,35)	0,21
GG	91 (46,7)	78 (41,3)	1,03 (0,54-1,95)	0,90 (0,46-1,74)	0,75	54 (43,2)	68 (42,5)	1,53 (0,75-3,15)	1,27 (0,60-2,71)	0,53
MD			0,90 (0,49-1,64)	0,83 (0,44-1,55)	0,57			1,62 (0,83-3,18)	1,47 (0,73-2,93)	0,28
MR			1,25 (0,83-1,86)	1,06 (0,70-1,63)	0,77			1,03 (0,64-1,65)	0,94 (0,58-1,54)	0,81

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência. ** ajustado por cor de pele.

Tabela 8.5. Análise de associações de riscos dos genótipos de acordo com sexo, Brasil, 2012-2015 (continuação).

Genótipo	Masculino					Feminino				
	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada**	P-valor**
GSTM1										
del	185 (100)	189 (100)				122 (100)	160 (100)			
Não nulo	103 (55,7)	119 (62,9)	1,0*	1,0*		57 (46,7)	85 (53,1)	1,0*	1,0*	
Nulo	82 (44,3)	70 (37,1)	1,35 (0,89-2,05)	1,30 (0,85-2,00)	0,23	65 (53,3)	75 (46,9)	1,29 (0,81-2,07)	1,19 (0,74-1,93)	0,47
GSTT1										
del	185 (100)	189 (100)				122 (100)	160 (100)			
Não nulo	121 (65,4)	147 (77,8)	1,0*	1,0*		83 (68,1)	130 (81,3)	1,0*	1,0*	
Nulo	64 (34,6)	42 (22,2)	1,85 (1,17-2,93)	1,93 (1,20-3,10)	0,007	39 (31,9)	30 (18,7)	2,04 (1,17-3,53)	2,15 (1,22-3,79)	0,008

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; MD, modelo dominante; MR, modelo recessivo. *Genótipo de referência. ** ajustado por cor de pele.

Tabela 8.6. Análise de associações de combinações genóticas com o risco para LLA, Brasil, 2012-2015.

Genótipo	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada** (IC95%)	P-valor**
GLCCI1 rs37972 / CRHR1 rs242941					
	324 (100)	341 (100)			
CC / CC	51 (15,7)	56 (16,4)	1,0*	1,0*	
CC / CT	59 (18,2)	77(22,6)	0,84 (0,50-1,39)	0,93 (0,55-1,57)	0,78
CC / TT	22 (6,8)	25 (7,3)	0,97 (0,48-1,92)	1,07 (0,53-2,17)	0,85
CT / CC	48 (14,8)	54 (15,8)	0,98 (0,57-1,68)	1,11 (0,70-1,76)	0,67
CT / CT	76 (23,5)	76 (22,3)	1,09 (0,67-1,80)	1,19 (0,73-1,93)	0,48
CT / TT	23 (7,1)	22 (6,5)	1,15 (0,57-2,30)	1,18 (0,58-2,43)	0,63
TT / CC	15 (4,6)	13 (3,8)	1,27 (0,55-2,92)	1,23 (0,52-2,90)	0,64
TT / CT	22 (6,8)	15 (4,4)	1,61 (0,75-3,44)	1,76 (0,80-3,87)	0,16
TT / TT	8 (2,5)	3 (0,9)	2,93 (0,74-11,64)	2,96 (0,72-12,10)	0,13
VDR rs2228570 / VDR rs1544410					
	328 (100)	344 (100)			
CC / GG	60 (18,3)	72 (20,9)	1,0*	1,0*	
CC / GA	64(19,5)	67 (19,5)	1,15 (0,71-1,86)	1,16 (0,71-1,90)	0,54
CC / AA	14 (4,3)	24 (7,0)	0,70 (0,33 -1,47)	0,68 (0,32-1,46)	0,68
CT / GG	58 (17,7)	71 (20,6)	0,98 (0,60-1,59)	0,99 (0,60-1,63)	0,98
CT / GA	69 (21,0)	62 (18,0)	1,34 (0,82-2,17)	1,36 (0,83-2,22)	0,23
CT / AA	19 (5,8)	17 (4,9)	1,34 (0,64-2,81)	1,45 (0,67-3,12)	0,34
TT / GG	23 (7,0)	11 (3,2)	2,51 (1,13-5,56)	2,92 (1,25-6,83)	0,01
TT / GA	14 (4,3)	15 (4,4)	1,12 (0,50-2,50)	1,20 (0,50-2,86)	0,69
TT / AA	7 (2,1)	5 (1,5)	1,68 (0,51-5,57)	1,87 (0,51-6,85)	0,34

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; *Genótipo de referência. ** ajustado por cor de pele.

Tabela 8.6. Análise de associações de combinações genotípicas com o risco para LLA, Brasil, 2012-2015 (continuação).

Genótipo	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada** (IC95%)	P-valor**
CYP3A5 rs776746 / VDR rs1544410	317 (100)	341 (100)			
AA / GG	21 (6,6)	25 (7,3)	1,0*	1,0*	
AA / GA	15 (4,7)	18 (5,3)	0,99 (0,40-2,43)	1,18 (0,46-3,05)	0,73
AA / AA	5 (1,6)	7 (2,1)	0,85 (0,23-3,08)	0,81 (0,22-2,95)	0,75
AG / GG	53 (16,7)	64 (18,8)	0,99 (0,49-1,96)	0,97 (0,49-1,94)	0,94
AG / GA	67 (21,1)	64 (18,8)	1,25 (0,64-2,44)	1,24 (0,63-2,47)	0,53
AG / AA	13 (4,1)	21 (6,2)	0,74 (0,29-1,82)	0,80 (0,32-2,04)	0,65
GG / GG	65 (20,5)	64 (18,8)	1,21 (0,62-2,37)	1,12 (0,56-2,24)	0,75
GG / GA	59 (18,6)	60 (17,6)	1,17 (0,59-2,32)	1,04 (0,51-2,12)	0,91
GG / AA	19 (6,0)	18 (5,3)	1,26 (0,53-2,99)	1,13 (0,45-2,85)	0,79
CYP3A5 rs776746 / VDR rs2228570	316 (100)	337 (100)			
AA / CC	21 (6,6)	24 (7,1)	1,0*	1,0*	
AA / CT	16 (5,1)	20 (5,9)	0,91 (0,38-2,21)	1,01 (0,40-2,51)	0,98
AA / TT	3 (0,9)	6 (1,8)	0,57 (0,13-2,57)	0,95 (0,16-5,59)	0,96
AG / CC	59 (18,7)	66 (19,6)	1,02 (0,52-2,02)	1,06 (0,53-2,14)	0,86
AG / CT	52 (16,5)	68 (20,2)	0,87 (0,44-1,74)	0,90 (0,44-1,82)	0,77
AG / TT	22 (7,0)	12 (3,6)	2,09 (0,84-5,23)	2,39 (0,91-6,25)	0,07
GG / CC	52 (16,5)	68 (20,2)	0,87 (0,44-1,74)	0,77 (0,38-1,57)	0,47
GG / CT	74 (23,4)	60 (17,8)	1,41 (0,72-2,78)	1,33 (0,66-2,68)	0,42
GG / TT	17 (5,4)	13 (3,9)	1,49 (0,59-3,79)	1,18 (0,42-3,29)	0,75

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; *Genótipo de referência. ** ajustado por cor de pele.

Tabela 8.6. Análise de associações de combinações genotípicas com o risco para LLA, Brasil, 2012-2015 (continuação).

Genótipo	Caso, n (%)	Controle, n (%)	OR bruta (IC95%)	OR ajustada** (IC95%)	P-valor**
CYP3A5 rs776746 /					
GSTM1 del	290 (100)	346 (100)			
AA / Não nulo	24 (8,3)	33 (9,5)	1,0*	1,0*	
AA / Nulo	14 (4,8)	19(5,5)	1,01 (0,42-2,41)	0,92 (0,37-2,30)	0,87
AG / Não nulo	65 (22,4)	90 (26,0)	0,99 (0,54-1,84)	0,95 (0,50-1,79)	0,88
AG / Nulo	56 (19,3)	60 (17,3)	1,28 (0,68-2,43)	1,11 (0,57-2,16)	0,75
GG / Não nulo	61 (21,0)	79 (22,8)	1,06 (0,57-1,98)	0,86 (0,44-1,66)	0,65
GG / Nulo	70 (24,1)	65 (18,8)	1,48 (0,79-2,77)	1,01 (0,56-2,13)	0,80
CYP3A5 rs776746					
+ GSTT1 del	290 (100)	346 (100)			
AA / Não nulo	29 (10,0)	39 (11,3)	1,0*	1,0*	
AA / Nulo	9 (3,1)	13 (3,8)	0,93 (0,35-2,47)	1,03 (0,37-2,86)	0,95
AG / Não nulo	75 (25,9)	121 (35,0)	0,83 (0,48-1,46)	0,82 (0,46-1,45)	0,50
AG / Nulo	46 (15,9)	29 (8,4)	2,13 (1,09-4,16)	2,02 (1,01-4,03)	0,04
GG / Não nulo	88 (30,3)	114 (32,9)	1,04 (0,59-1,81)	0,84 (0,46-1,50)	0,55
GG / Nulo	43 (14,8)	30 (8,7)	1,93 (0,99-3,76)	1,76 (0,88-3,50)	0,10
GSTT1 del /					
GSTM1 del	307 (100)	349 (100)			
Não nulo / Não nulo	115 (37,4)	167 (47,9)	1,0*	1,0*	
Não nulo / Nulo	89 (29,0)	110 (31,5)	1,17 (0,81-1,69)	1,13 (0,78-1,65)	0,52
Nulo / Não nulo	45 (14,7)	37 (10,6)	1,76 (1,08 -2,89)	1,99 (1,19-3,35)	0,009
Nulo / Nulo	58 (18,9)	35 (10,0)	2,41 (1,49-3,89)	2,26 (1,39-3,68)	0,001

Abreviações: n, número; OR, razão de chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; *Genótipo de referência. ** ajustado por cor de pele.