



**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y ONDONTOLOGÍA**  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

Programa de Doctorado 662-285B: Patología de los tumores humanos

**ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES  
DEL CITOCROMO P450 (*CYP1A1*, *CYP2E1* Y *CYP3A4*),  
DE LA QUINONA OXOREDUCTASA (*NQO1*), DEL  
GLUTATION S-TRANSFERASA (*GSTM1* Y *GSTT1*) Y DEL  
FOLATO (*MTHFR*, *TS*) COMO FACTORES  
PREDISPONENTES EN LAS HEMOPATÍAS MALIGNAS.**

Doctoranda: María Collado Díaz

Directores: Eva Barragán González  
Concha López Gines  
José Antonio López Guerrero

Valencia, 2012



**Dña. EVA BARRAGÁN GONZÁLEZ, facultativo especialista en Bioquímica Clínica del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.**

**CERTIFICA:**

Que la presente Memoria, titulada:

“ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES DEL CITOCROMO P450 (*CYP1A1*, *CYP2E1* Y *CYP3A4*), DE LA QUINONA OXOREDUCTASA (*NQO1*), DEL GLUTATION S-TRANSFERASA (*GSTM1* Y *GSTT1*) Y DEL FOLATO (*MTHFR*, *TS*) COMO FACTORES PREDISONENTES EN LAS HEMOPATÍAS MALIGNAS”.

Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Biología, Dña. María Collado Díaz, para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia Septiembre de 2012.



**Fdo.: Dra. Eva Barragán González**



**Dña. CONCHA LÓPEZ GINES, Catedrática en Biología Celular del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.**

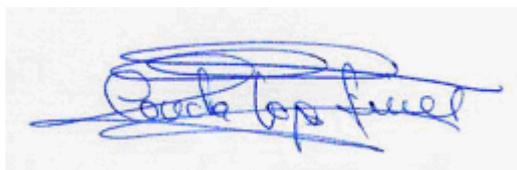
**CERTIFICA:**

Que la presente Memoria, titulada:

“ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES DEL CITOCROMO P450 (*CYP1A1*, *CYP2E1* Y *CYP3A4*), DE LA QUINONA OXOREDUCTASA (*NQO1*), DEL GLUTATION S-TRANSFERASA (*GSTM1* Y *GSTT1*) Y DEL FOLATO (*MTHFR*, *TS*) COMO FACTORES PREDISPONENTES EN LAS HEMOPATÍAS MALIGNAS”.

Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Biología, Dña. María Collado Díaz, para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia Septiembre de 2012.



**Fdo.: Dra. Concha López Gines**



**D. JOSÉ ANTONIO LÓPEZ GUERRERO, Jefe Clínico del Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.**

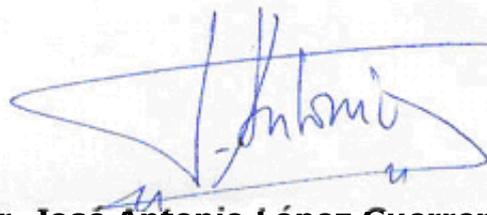
**CERTIFICA:**

Que la presente Memoria, titulada:

“ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES DEL CITOCROMO P450 (*CYP1A1*, *CYP2E1* Y *CYP3A4*), DE LA QUINONA OXOREDUCTASA (*NQO1*), DEL GLUTATION S-TRANSFERASA (*GSTM1* Y *GSTT1*) Y DEL FOLATO (*MTHFR*, *TS*) COMO FACTORES PREDISONENTES EN LAS HEMOPATÍAS MALIGNAS”.

Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Biología, Dña. María Collado Díaz, para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia Septiembre de 2012.



**Fdo.: Dr. José Antonio López Guerrero**



## **AGRADECIMIENTOS**

---

A la Dra. Eva Barragán, directora de esta tesis, por sus consejos en la confección de esta tesis y su asesoramiento científico.

A la Dra. Concha López, codirectora de esta tesis, por su gran apoyo y confianza que siempre ha depositado en mí, y con la que compartí mis inicios en la investigación.

Al Dr. José Antonio López, codirector de esta tesis por su disponibilidad y colaboración.

Al Dr. Pascual Bolufer, Jefe de Sección del Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario La Fe de Valencia, por todas sus enseñanzas durante la elaboración de esta tesis.

A todos los miembros del Laboratorio de Biología Molecular Esperanza, Silvia, Sandra, Eva, Enrique, Jorge, Rosa y Sarai por compartir conmigo algunos o todos aquellos años.

A todos los centros que han colaborado en este proyecto, por su aportación muestral.

A todas las personas que se han prestado voluntarias en la donación de sangre.

A todos vosotros, mis más sinceros agradecimientos.



La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto Carlos III (*PI 02/0180*)



***A mis padres por su apoyo y amor incondicional, a mi hermana, a Miguel y a mi hijo Miguel***



## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

---

<b>5FU</b>	5 Fluorouracilo
<b>6MP</b>	6-Mercaptopurina
<b>ABVD</b>	Doxorubicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbacina
<b>AC</b>	Doxorubicina, Carmustina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AF</b>	Doxorubicina, 5 Fluorouracilo
<b>AM</b>	Doxorubicina, Metotrexato
<b>Ara-C</b>	Citarabina
<b>AREB</b>	Anemia refractaria con exceso de blastos
<b>AREBt</b>	Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación
<b>ASPA</b>	Doxorubicina, Cisplatino, Citarabina, Adrenocorticoides
<b>ATT</b>	ESHAP, CHOP, NOPP
<b>BACOS</b>	Bleomicina, Doxorubicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Metotrexato, Ácido Fólico
<b>BEACOP-B</b>	Busulfan, Etopósido, Citarabina
<b>BLEO</b>	Bleomicina
<b>CAB</b>	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Bleomicina
<b>CBDCA</b>	Carboplatino
<b>CC</b>	Cáncer de colon
<b>CDDP</b>	Cisplatino
<b>CM</b>	Cáncer de mama
<b>CMF</b>	Ciclofosfamida, Metotrexato, 5 Fluorouracilo
<b>C-MOPP</b>	Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbacin, Prednisona
<b>CO</b>	Cáncer de ovario
<b>COP</b>	Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona
<b>COP-BLAM</b>	Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona, Bleomicina, Doxorubicina y Procarbacin
<b>COP-BLAM</b>	Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona, Bleomicina, Doxorubicina, Procarbacin
<b>CPA</b>	Ciclofosfamida
<b>CPL</b>	Cáncer de pulmón
<b>CPM</b>	Ciclofosfamida
<b>CPT-11</b>	Irinotecan
<b>CVP</b>	Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisolona
<b>CHOD</b>	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Dexametasona
<b>CHOP/VIA</b>	Etopósido, Ifosfamida, Citarabina
<b>CHOP</b>	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisona
<b>CHOP-B</b>	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisona, Bleomicina
<b>DACH-platinum</b>	Oxaliplatino
<b>DHAD</b>	Mitoxantrona
<b>DNR</b>	Daunorubicina
<b>DOX</b>	Doxorubicina
<b>EH</b>	Enfermedad de Hodgkin
<b>EPI</b>	Epirubicina

<b>ESHAP</b>	Etopósido, Cisplatino, Metilprednisolona, Citarabina
<b>FA</b>	Ácido fólico
<b>FAC</b>	5 Fluorouracilo, Doxorubicina (Adriamicina), Ciclofosfamida
<b>FCM</b>	Fludarabina, Ciclofosfamida, Mitoxantrona
<b>FEC</b>	5 Fluorouracilo, Epirubicina, Ciclofosfamida
<b>FET</b>	Test exacto de Fisher
<b>FLU</b>	Fludarabina
<b>FMD/FC</b>	Fludarabina, Mitoxantrona, Dexametasona, Fludarabina, Ciclofosfamida
<b>GST</b>	Glutathion S-metil transferasa
<b>HDAC</b>	Alta dosis de citarabina
<b>HOE766</b>	Buserelina
<b>HyperCVAD</b>	Ciclofosfamida, Vincristina, Doxorubicina, Dexametasona
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IDA</b>	Idarubicina
<b>IFF</b>	Ifosfamida
<b>IMVP-16</b>	Ifosfamida, Metotrexato, Etopósido
<b>IFMVP</b>	Ifosfamida, etopósido
<b>IFN</b>	Interferon
<b>LA</b>	Leucemia aguda
<b>L-Asa</b>	L-asparaginasa
<b>LC</b>	LightCycler
<b>LMA</b>	Leucemia mieloblástica aguda
<b>LNH</b>	Linfoma no Hodgkin
<b>LS</b>	Leucemia secundaria
<b>LLA</b>	Leucemia linfoblástica aguda
<b>M</b>	Mujer
<b>MINE</b>	Ifosfamida, Metotrexato, Cisplatino
<b>MiniBEAM</b>	Carmustina, Etopósido, Citarabina, Melfalan
<b>MLL</b>	Leucemia de linaje mixto
<b>MM</b>	Mieloma múltiple
<b>MMM</b>	Metotrexato, Mitoxantrona, Mitomicina
<b>MOPP</b>	Mecloretamina, Vincristina, Procarbacin, Prednisona
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>MTHFR</b>	Metilen-tetrahidrofolato reductasa
<b>n.c.</b>	No consta
<b>ND</b>	No disponible
<b>NLB</b>	Número de laboratorio
<b>NOPP</b>	Mitoxantrona, Vincristina, Prednisona, Procarbacin
<b>NOSTE</b>	Mitoxantrona, Prednimustina
<b>NQO1</b>	Quinona oxidoreductasa
<b>nt</b>	Nucleótido
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>PAC</b>	Cisplatino, Doxorubicina, Ciclofosfamida
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PRED</b>	Prednisona

<b>PROMACE-MOOP</b>	Prednisona, Metotrexato, Doxorubicina, Ciclofosfamida, Etopósido, Mecloretamina, Vincristina, Procarbacin
<b>RC</b>	Remisión completa
<b>SE</b>	Sarcoma de Ewing
<b>SG</b>	Supervivencia global
<b>SLE</b>	Supervivencia libre de enfermedad
<b>SLR</b>	Supervivencia libre de recaída
<b>SMD</b>	Síndrome mielodisplásico
<b>SMDS</b>	Síndrome mielodisplásico secundario
<b>TAM</b>	Tamoxifeno
<b>Tm</b>	Temperatura de melting
<b>TS</b>	Timidilato sintetasa
<b>V</b>	Varón
<b>VAM</b>	Etopósido, Adriamicina, Metotrexato
<b>VAMD</b>	Vincristina, Doxorubicina, Dexametasona
<b>BCMP</b>	Vincristina, BCNU, Ciclofosfamida, Melfalan, Prednisona
<b>VCMP/VBAP</b>	Vincristina, Ciclofosfamida, Melfalan, Prednisona
<b>VCR</b>	Vincristina
<b>VECPOB</b>	Etopósido, Epirubicina, Ciclofosfamida, Cisplatino, Vincristina, Bleomicina, Prednisona
<b>VM-26</b>	Tenipósido
<b>VP-16</b>	Etopósido
<b>wt</b>	wild type (en el sentido de nativo/referencia)



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1 LEUCEMIAS AGUDAS <i>de novo</i> .....	3
1.1 Clasificación Franco-Estadounidense-Británica (FAB).....	3
1.2 Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS).....	4
1.3 Alteraciones genéticas de las leucemias agudas.....	6
1.4 Etiología y tratamiento de las leucemias agudas.....	8
2 LEUCEMIA Y SÍNDROME MIELODISPLÁSICO SECUNDARIO A TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO.....	10
3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN ENZIMAS METABOLIZANTES COMO FACTORES DE PREDISPOSICIÓN A LAS LEUCEMIAS.....	11
3.1 Citocromos.....	14
3.1.1 Polimorfismos <i>CYP</i> y leucemia.....	18
3.1.2 Polimorfismos <i>CYP</i> y pronóstico de la enfermedad.....	19
3.2 Quinona oxidoreductasa.....	20
3.2.1 <i>NQO1</i> *2 y leucemia .....	22
3.2.2 <i>NQO1</i> *2 y pronóstico de la enfermedad.....	24
3.3 Glutathion S-transferasas.....	24
3.3.1 Polimorfismos <i>GST</i> y leucemia <i>de novo</i> y secundaria.....	26
3.3.2 Polimorfismos <i>GST</i> y pronóstico de la enfermedad.....	28
3.4 Metabolismo del folato y polimorfismos en <i>MTHFR</i> y <i>TS</i> .....	30
3.4.1 Polimorfismos en los genes del metabolismo del folato y la leucemia aguda.....	33
3.4.2 Polimorfismos en los genes del metabolismo del folato y el pronóstico.....	35
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
1 PACIENTES.....	57

1.2 Características clínico-biológicas.....	58
1.2.1 Datos Demográficos.....	58
1.2.2 Clasificación FAB.....	60
1.2.3 Clasificación Inmunofenotípica.....	60
1.2.4 Clasificación citogenética.....	61
1.3 Tratamiento.....	61
1.3.1 Leucemias agudas <i>de novo</i> .....	61
1.3.2 Tratamiento del cáncer primario de las LS/SMDS.....	62
<b>2 MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
2.1 Reactivos y soluciones.....	65
2.1.1 Reactivos para la detección de los polimorfismos.....	65
2.1.2 Reactivos empleados en la electroforesis de agarosa.....	65
2.1.3 Soluciones.....	66
2.2 Extracción de ADN.....	66
2.3 Métodos de detección de los polimorfismos genéticos.....	67
• Polimorfismo <i>CYP1A1*2A</i> .....	67
• Polimorfismo <i>CYP2E1*5B</i> .....	69
• Polimorfismo <i>CYP3A4*1B</i> .....	70
• Polimorfismo <i>NQO1*2</i> .....	71
• Polimorfismo <i>MTHFR C677T</i> .....	72
• Polimorfismo <i>delGST</i> .....	73
• Polimorfismo <i>TS 2R/3R</i> .....	75
2.4 Análisis estadístico.....	77
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
1 GRUPO CONTROL.....	81
2 LEUCEMIAS/SINDROMES MIELODISPLASICOS SECUNDARIOS.....	83

2.1 Características demográficas y clínicas y polimorfismos genéticos.....	83
2.2 Riesgo de leucemia secundaria y polimorfismos genéticos.....	88
3 LEUCEMIA AGUDA <i>de novo</i> .....	93
3.1 Polimorfismos y características demográficas.....	93
3.2 Polimorfismos y características de la leucemia mieloide aguda.....	96
3.3 Polimorfismos y riesgo de leucemia mieloide aguda.....	101
4 VARIABILIDAD INTERINDIVIDUAL EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON LMA.....	108
4.1 Características clinico-biológicas de los pacientes.....	108
4.2 Implicación de los polimorfismos en la respuesta al tratamiento.....	109
4.3 Polimorfismos y valor pronóstico.....	110
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>117</b>
1. POLIMORFISMOS EN ENZIMAS METABOLIZANTES DE DROGAS Y RIESGO DE LS/SMDS.....	120
2. POSIBLE EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN ENZIMAS METABOLIZANTES EN EL RIESGO DE DESARROLLAR UNA LEUCEMIA AGUDA.....	123
2.1 Polimorfismos y riesgo de de desarrollar LMA.....	123
2.2 Polimorfismos y riesgo de de desarrollar LLA.....	125
3. VALOR PRONÓSTICO DE LOS POLIMORFISMOS EN ENZIMAS METABOLIZANTES DE DROGAS.....	128
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO: Difusión de los resultados derivados de este estudio.....</b>	<b>157</b>



# **INTRODUCCIÓN**



## **1 LEUCEMIAS AGUDAS *de novo***

Las leucemias agudas son un grupo de enfermedades en las que proliferan células inmaduras de la médula ósea. Se clasifican en dos grandes grupos: las leucemias mieloblásticas agudas (LMA) y las linfoblásticas agudas (LLA). Ambas neoplasias comparten ciertos rasgos clínicos si bien son enfermedades marcadamente distintas tanto en su origen clonal, como en el pronóstico y tratamiento<sup>1</sup>.

Epidemiológicamente se ha descrito que en las LMAs la incidencia es de 2.3/100.000 casos nuevos por habitantes y año, y éstos aumentan con la edad, alcanzando un pico de 12.6/100.000 individuos alrededor de los 65 años, mientras que en las LLAs es de 1.3/100.000 casos por habitantes y año, constituyendo la segunda causa de muerte en los niños<sup>2-4</sup>. Las LMAs pueden ser originadas a partir de un síndrome mielodiplásico (SMD) que tiene una incidencia aproximada de 3 casos nuevos cada 100.000 individuos y año; esta incidencia tiende a aumentar con la edad, sobre todo en mujeres<sup>5</sup>.

Los dos esquemas más comunes usados para clasificar la LMA y la LLA desde 2006, son el antiguo sistema Franco-Estadounidense-Británico (FAB) y el nuevo sistema de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

### **1.1 Clasificación Franco-Estadounidense-Británica (FAB)**

La clasificación FAB divide la LMA en 8 subtipos (Tabla 1), desde el M0 al M7, que en base a criterios morfológicos y citoquímicos permiten identificar subgrupos en base a su grado de diferenciación celular.

**Tabla 1.-** Clasificación de la LMA según la FAB

<b>M0</b>	Leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación localizada.
<b>M1</b>	Leucemia mieloblástica aguda sin maduración.
<b>M2</b>	Leucemia mieloblástica aguda con maduración.
<b>M3</b>	Leucemia promielocítica aguda (con translocación t(15;17)).
<b>M4</b>	Leucemia mielomonocítica aguda
<b>M4eo</b>	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia
<b>M5</b>	Leucemia monocítica aguda
<b>M5a</b>	LMA sin diferenciación
<b>M5b</b>	LMA con diferenciación
<b>M6</b>	Eritroleucemia aguda; son precursoras de globos rojos
<b>M7</b>	Leucemia megacariocítica aguda.

El grupo FAB (Tabla 2) divide las LLA en tres subgrupos según las características morfológicas de los blastos.

**Tabla 2.-** Clasificación de la LLA según la FAB

<b>L1</b>	Blastos pequeños, homogéneos, con una relación núcleo/citoplasma alta, con nucléolos escasos o ausentes.
<b>L2</b>	Población blástica de tamaño grande, heterogéneo, con citoplasma más abundante y núcleo irregular con presencia de nucléolos.
<b>L3</b>	Células grandes, con citoplasma de marcada basofilia, con abundantes vacuolas. Núcleo regular con nucléolos prominentes.

## 1.2 Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

La clasificación de la OMS incorpora criterios morfológicos, genéticos y clínicos con el fin de definir entidades clinico-biológicas independientes. La información clínicamente significativa se encuentra categorizada en uno de los subtipos listado a continuación (Tabla 3).

**Tabla 3.-** Clasificación de la LMA según la OMS

<b>LMA con anomalías genéticas recurrentes</b>	Incluyen aquellas LMA con translocaciones entre los cromosomas 8 y 21 [t(8;21)], inversiones en el cromosoma 16 [inv(16)] o translocaciones entre los cromosomas 15 y 17 [t(15;17)], t(9;11), t(6;9), inv(3), t(3;3), t(1;22). LMA con NPM1 mutado y LMA con CEBPA mutado. Los pacientes con este tipo de LMA generalmente presentan una elevada tasa de remisión y un mejor pronóstico comparado con otros tipos de LMA.
<b>LMA con cambios asociados a SMD</b>	Las alteraciones más frecuentes son la pérdida total o parcial de un cromosoma seguida de la existencia de trisomías; en cambio las translocaciones son menos frecuentes y suelen afectar a los cromosomas 1, 3, 5, 7 y 17.
<b>LMA con displasia multilineaje</b>	Esta categoría incluye a los pacientes que han sufrido previamente un síndrome mielodisplásico (SMD) o mieloproliferativo (SMP) y este ha derivado en una LMA. Este tipo de LMA tiene una mayor incidencia en pacientes de edad avanzada y suele presentar un peor pronóstico.
<b>LMA y SMD relacionados con el tratamiento</b>	Esta categoría incluye a los pacientes que han sido sometidos a quimioterapia o radiaciones, y posteriormente desarrollaron LMA o SMD. Estas leucemias pueden ser caracterizadas por anomalías cromosómicas específicas y suelen presentar un mal pronóstico.
<b>LMA sin otra especificación</b>	Incluye subtipos de LMA que no pueden ser incluidos en ninguna de las categorías anteriores. LMA mínimamente diferenciada, LMA sin maduración, LMA con maduración, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monoblástica/monocítica aguda, leucemia eritroide aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia basofílica aguda, panmielosis aguda con mielofibrosis.
<b>Sarcoma mieloide</b>	Se observan la LMA con maduración y t(8;21)(q22;q22) y la LMA Eo con inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22) y se relaciona el sarcoma monoblástico con desplazamientos que involucran al 11q23. La presencia del sarcoma mieloide en los pacientes con LMA con t(8;21) es de alto riesgo y se relaciona con una tasa de remisión completa más baja y de menor duración.
<b>Proliferaciones mieloides relacionadas con el Síndrome de Down</b>	Mielopoyesis anormal transitoria. Leucemia mieloide relacionada con el Síndrome de Down.
<b>Neoplasia de células dendríticas blásticas plasmocitoides</b>	Representa menos de 1 % de los casos de leucemias agudas.
<b>Leucemias agudas de linaje ambiguo</b>	En este tipo de leucemia, las células leucémicas no pueden ser clasificadas como mieloides o linfoides, o bien ambos tipos de células están presentes. Aproximadamente 33% de los casos tienen el cromosoma Filadelfia y algunos casos se relacionan con t(4;11)(q21;q23) u otras anomalías del 11q23. En general, el pronóstico parece ser desfavorable, especialmente en los adultos; la presencia de la t(4;11) o del cromosoma Filadelfia es indicadora de pronóstico especialmente desfavorable.

La LLA se clasifica según el origen en la línea B o T, y dependiendo del grado de maduración del progenitor alterado (Tabla 4).

**Tabla 4.-** Clasificación de la LLA según la OMS

Línea B	Línea T
B-I (pro-B)	T-I (pro-T)
B-II (común)	T-II (pre-T)
B-III (pre-B)	T-III (cortical)
B-IV (B madura)	T-IV (madura)
	Tαβ y Tγδ

### 1.3 Alteraciones genéticas de las leucemias agudas

Las leucemias se asocian frecuentemente con inestabilidad genética caracterizada por una diversidad de cambios cromosómicos y moleculares que se dan en un 85-90% de los pacientes con LMA, y en un 80% de los pacientes con LLA. En la LMA son especialmente frecuentes las alteraciones estructurales mientras que en la LLA son más frecuentes las alteraciones numéricas<sup>3,4,6</sup> (Tabla 5 y 6). Diversos estudios demuestran que ciertas anomalías citogenéticas tienen una marcada influencia en la presentación y evolución de la leucemia. De manera que el análisis citogenético es considerado como uno de los factores pronósticos más importantes<sup>7-9</sup>.

**Tabla 5.- Alteraciones citogenéticas y pronóstico de la LMA**

<b>Grupo de riesgo</b>	<b>Anomalía</b>	<b>Genes afectados</b>	<b>Supervivencia tras 5 años</b>
Favorable	t(8;21), (15;17), inv(16)/t(16;16)/del(16q)	RUNX1T1/RUNX1,PML /RARa,CBFβ/MYH11	70%
Intermedio	Cariotipo normal, +8, +21, +22, del(7q), del(9q), alteraciones 11q23, cualquier otro cambio estructural o numérico	MLL	48%
Adverso	Del(5q)/-5, -7, alteraciones 3q,t(6;9), cariotipos complejos (5 o más alteraciones)	DEK/NUP214, RPN1/EVI1	15%

La mayoría de las LLA muestran una alteración genética en el clon proliferante (Tabla 6). La alteración estructural más frecuente es la t(12;21) que implica a los genes TEL/AML1 y se asocia a una elevada tasa de supervivencia. Entre las alteraciones de mal pronóstico se deben citar las t(9;22) y t(4;11) que conllevan la aparición de los genes de fusión *BCR/ABL* y *MLL/AF4* respectivamente.

**Tabla 6.- Alteraciones citogenéticas y pronóstico de la LLA**

<b>Grupo de riesgo</b>	<b>Anomalía</b>	<b>Genes afectados</b>	<b>Supervivencia libre de enfermedad</b>
Favorable	t(12;21)	TEL/AML1	85-90%
	t(10;14)(q24;q11)	HOX11/TCRA	75%
	9p	P16	22%
	Hiperdiploidía (> 50 cromosomas)		80-90%
Intermedio	6q	Desconocido	47%
	14q11	TCRA/TCRD	42%

**Tabla 6.-** Alteraciones citogenéticas y pronóstico de la LLA ("Continuación")

<b>Grupo de riesgo</b>	<b>Anomalía</b>	<b>Genes afectados</b>	<b>Supervivencia libre de enfermedad</b>
<i>Adverso</i>	<i>t(1;19)</i>	<i>EA2/PBX1</i>	<i>20-40%</i>
	<i>t(9;22)</i>	<i>BCR/ABL</i>	<i>5-10%</i>
	<i>t(4,11)</i>	<i>MLL/AF4</i>	<i>0-10%</i>
	<i>Hipodiploidía</i>		<i>10%</i>

#### 1.4 Etiología y tratamiento de las leucemias agudas

Etiológicamente no existe una causa responsable de todas las leucemias, sino que se postulan varios mecanismos que podrían llevar a su desarrollo. Dentro de éstos, cabe citar las alteraciones génicas (AML1/ETO, CBF $\beta$ /MYH11, PML/RAR $\alpha$ , MLL), la exposición a radiaciones, los agentes químicos y los virus<sup>10-12</sup>. Sin embargo, poco se conoce respecto a la susceptibilidad genética y factores ambientales, aunque al igual que en otros cánceres, parece que la presencia de polimorfismos, en especial en una serie de genes implicados en el metabolismo de drogas o tóxicos, podrían modificar el efecto de la exposición ambiental, concretamente en los niños, que podrían tener un riesgo mayor debido a la exposición diferencial y/o inmadurez fisiológica<sup>13,14</sup>.

El tratamiento de las leucemias agudas se basa principalmente en la quimioterapia (Tabla 7) y está dividido en dos fases: terapia de inducción y terapia post-remisión (o consolidación). El objetivo de la terapia de inducción es llevar a cabo una reducción del número de células leucémicas

hasta niveles indetectables, mientras que el de la terapia de consolidación es la completa eliminación de cualquier resto de la enfermedad y lograr la curación completa del paciente. Cabe destacar que algunas drogas empleadas en el tratamiento de las leucemias agudas (antraciclinas, inhibidores de la mitosis, alquilantes y antimetabolitos) son metabolizadas por enzimas codificadas por genes que pueden presentar algún polimorfismo que influya en su actividad, y de alguna manera influir en la respuesta al tratamiento, bien favoreciendo la absorción completa de la droga o por el contrario metabolizarla, solo parcialmente, o no metabolizarla dejando el tratamiento sin ningún efecto.

**Tabla 7.- Drogas administradas en el tratamiento de las leucemias agudas**

<b>Tratamiento de la LMA</b>	
Antibióticos antitumorales (antraciclinas)	Daunorubicina, doxorubicina, idarrubicina, mitoxantrona
Antimetabolitos	Citarabina, 6-tioguanina
Otros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quimioterapia combinada con antibiótico antitumoral, más arabinósido de citosina o antibiótico antitumoral más arabinósido de citosina más tioguanina, tiróxido de arsénico</li> <li>• Trasplante de médula ósea y progenitores hematopoyéticos</li> </ul>
<b>Tratamiento de la LLA</b>	
Antibióticos antitumorales	Daunorubicina, doxorubicina
Inhibidores de la mitosis	Vincristina
Corticoides	Prednisona
Misceláneos	L-asparaginasa
Alquilantes	Ciclofosfamida
Antimetabolitos	Metotrexato, 6-mercaptopurina, citarabina
Otros	Radioterapia craneal, metotrexato intratecal

## 2 LEUCEMIA Y SÍNDROME MIELODISPLÁSICO SECUNDARIO A TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO

La mayor eficacia de los tratamientos antitumorales ha supuesto un aumento de las neoplasias secundarias<sup>15,16</sup> siendo la leucemia la neoplasia más frecuente. El riesgo estimado de desarrollar una leucemia secundaria (LS) tras diez años de tratamiento de cáncer de ovario, linfoma no-Hodgkin, enfermedad de Hodgkin o cáncer de mama es del 8.5%, 7.9%, 3.8% y 1.5% respectivamente<sup>17-20</sup>.

Las leucemias agudas y los síndromes mielodisplásicos relacionados con los fármacos *alquilantes* y la radiación, por regla general, ocurren entre 5 y 6 años después de la exposición al fármaco, habiéndose observado desde 10 hasta 192 meses después de ésta<sup>21,22</sup>. El riesgo de su aparición depende de la dosis acumulativa total del fármaco alquilante y de la edad del paciente. Desde el punto de vista clínico, el trastorno suele presentarse inicialmente como un síndrome mielodisplásico (SMD) que culmina en una LMA normalmente de los subtipos FAB M6 y M7 con mielofibrosis acompañante. En estos procesos son frecuentes las alteraciones que involucran los cromosomas 5 y 7<sup>21,23,24</sup>. Por lo general, la LMA relacionada con la terapia suele ser refractaria al tratamiento antileucémico y la supervivencia mediana después del diagnóstico de estos trastornos es de aproximadamente 7 a 8 meses<sup>25,26</sup>.

La LMA relacionada con *inhibidores de la topoisomerasa II*, como el etopósido y tenipósido, se manifiesta en pacientes tratados con las epipodofilotoxinas, y las antraciclinas, doxorubicina y 4-epidoxorubicina<sup>21</sup>. El periodo de latencia promedio desde el momento en que

se instituye el tratamiento hasta el desarrollo de la LMA es más corto (1 a 3 años)<sup>27</sup>. Suelen tener una presentación abrupta y sin fase mielodisplásica previa, con predominio de los subtipos FAB M4-M5, siendo los hallazgos citogenéticos predominantes aquellos que involucran al cromosoma 11q23 y al gen MLL<sup>28</sup>.

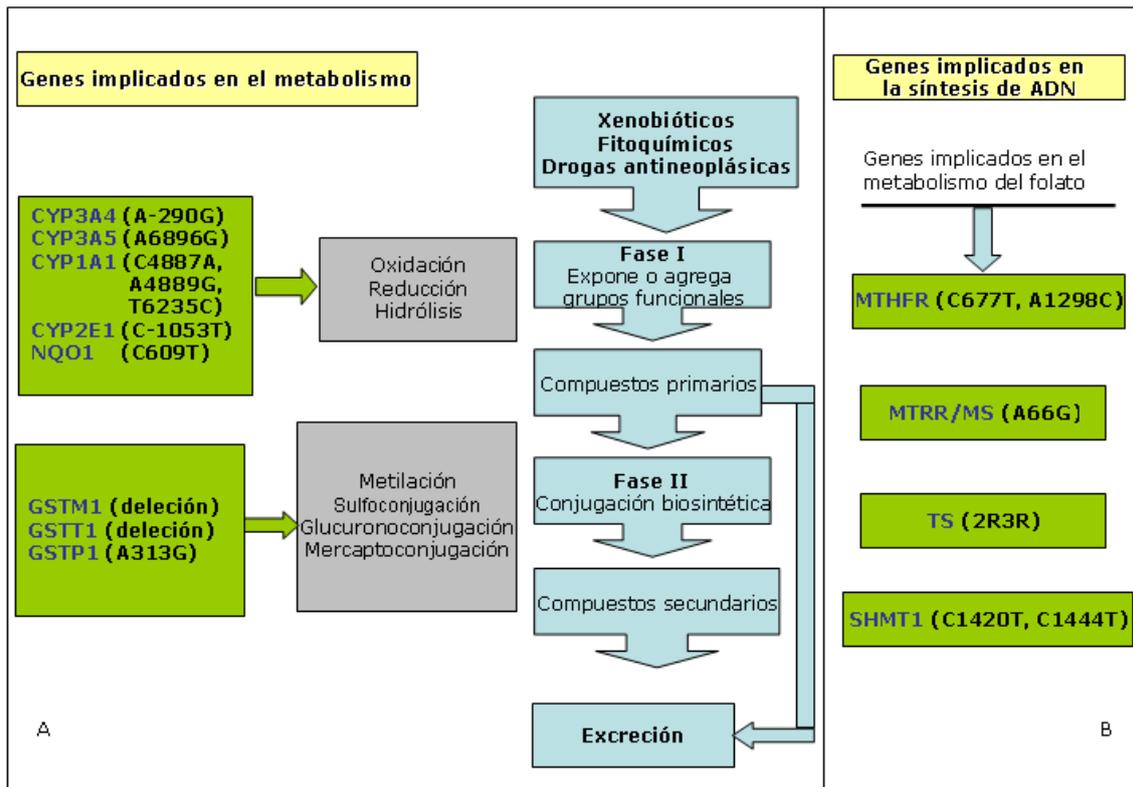
Aunque el efecto de las drogas anticancerígenas depende de muchos factores, cabe pensar que la alteración de la actividad de las enzimas responsables de la metabolización del fármaco debida a la variabilidad genética podría tener un papel relevante en la respuesta al tratamiento, resistencia y en la aparición de neoplasias secundarias en los pacientes sometidos a tratamiento quimioterápico intensivo por una neoplasia previa.

### **3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN ENZIMAS METABOLIZANTES COMO FACTORES DE PREDISPOSICIÓN A LAS LEUCEMIAS**

Aunque los aspectos clínicos y biológicos de la leucemia están bien documentados, poco se conoce sobre los factores que condicionan la susceptibilidad a la leucemia. Existen muy pocas mutaciones de alta penetrancia que puedan relacionarse directamente con el desarrollo de leucemias, pero parece bastante probable que las variantes polimórficas de varios genes, junto con los efectos de la dieta, la exposición ambiental y el sistema inmune de cada individuo puedan ser determinantes en la predisposición a la leucemia<sup>29</sup>. De hecho, la forma en que el organismo humano responde al consumo de drogas presenta una gran variación entre los individuos, debido en parte a variaciones en el propio metabolismo de las drogas. Algunas de estas variaciones son consecuencia de diferentes

polimorfismos en ciertos genes que provocan que las correspondientes proteínas sintetizadas presenten diferentes niveles de actividad<sup>13,14</sup>.

Las enzimas que metabolizan compuestos xenobióticos, tóxicos ambientales y drogas se han clasificado históricamente en dos categorías: las de fase I que cumplen una misión metabolizadora (*biotransformación*) y las de fase II, que conjugan los sustratos con otros compuestos (*detoxificación*). Se han descrito polimorfismos en los genes que codifican la superfamilia de citocromos (CYP) implicados en la fase I del metabolismo, la quinona oxidoreductasa (NQO1) que en la fase I actúa en el metabolismo de los radicales libres y la familia de enzimas glutatión S-metil transferasa (GST) que están implicadas en la fase II del metabolismo (Figura 1A) (Tabla 8). También tienen especial relevancia los polimorfismos en los genes de la metilen-tetrahidrofolato-reductasa (MTHFR) y la timidilato sintetasa (TS) implicados en el metabolismo del folato (Figura 1B).



**Figura 1:** Vía de metabolización de una sustancia. **A:** Genes implicados en el metabolismo (se indica el polimorfismo correspondiente). **B:** Genes implicados en la síntesis de ADN.

**Tabla 8.-** Polimorfismos en genes implicados en el metabolismo de drogas  
(www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)

Papel biológico	GEN (locus)	OMIN	Polimorfismo	Efecto	dbSNP ID / SNP500Cancer ID	Frecuencia polimorfismo %	Efecto biológico
Fase I del metabolismo	CYP1A1 (15q22-q24)	108330	CYP1A1*2A T6235C 3' UTR Ex 7	MspI	rs4646903	12-16	Aumenta expresión
			CYP1A1*2B A4889G	I462V	rs1048943/	8-9	Aumenta expresión
			CYP1A1*4 C4887A Ex-7	T461N	rs1799814/	10	?
	CYP2E1 (10q26.3)	124040	CYP2E1*5B C-1053T G-1293C	RsaI/PstI RFLP	rs2031920/ rs3813867	2-8	Aumenta expresión
CYP3A4 (7q22.1)	124010	CYP3A4*1B/V A-290G	Promotor	rs2740574/ CYP3A4-02 A-391G	22	¿Reduce expresión?	

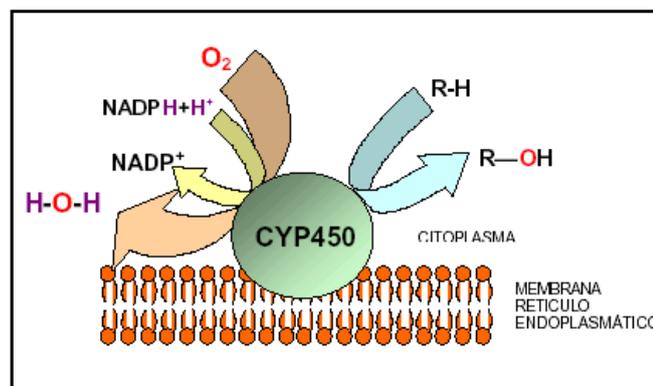
**Tabla 8.- Polimorfismos en genes implicados en el metabolismo de drogas**  
("Continuación")

	CYP3A5 (7q22.1)	605325	CYP3A5*3 6986G>A 22893G>A	Induce variantes de <i>splicing</i>	rs776746		Disminuye actividad enzimática
			CYP3A5*6 G14690A	Induce variantes de <i>splicing</i>	rs10264272	1-17	Sin efecto o reduce seriamente la expresión
	MPO (17q23.1)	606989	MPO*2 G-642A	Promotor	rs2333227/ MPO-02	44	Aumenta expresión
Fase II del metabolismo	GSTM1 (1p13.3)	138350	delGSTM1	Delección	----/ GSTM1-02	50	Suprime expresión
	GSTT1 (22q11.2)	600436	delGSTT1	Delección	----/ GSTT1-02	41	Suprime expresión
	GSTP1 (11q13)	134660	GSTP1*B Ex5-24A>G	I105V	rs947894/ GSTP1-01	54	Disminuye actividad enzimática
Radicales libres	NQO1 (11q22.1)	125860	NQO1*2 C609T	P187S	rs1800566/ NQO1-01	48	Suprime actividad enzimática
			NQO1*3 C465T	R139W	rs4986998/ NQO1-03	4	Disminuye expresión

### 3.1 Citocromos

Una de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de drogas es el citocromo P450 (CYP). El citocromo P450 constituye una superfamilia enzimática presente en diferentes tejidos como el riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y otros, pero es particularmente activo en el hígado<sup>30</sup>. Además de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, entre muchos otros, el CYP participa en el metabolismo de sustratos endógenos de importancia biológica como el colesterol, ácidos biliares, hormonas, esteroides y ácidos grasos<sup>31,32</sup>.

Las diversas especies de enzimas CYP se caracterizan por ser fácilmente inducibles, inclusive por las mismas drogas, a ser biotransformadas, lo que tiene consecuencias clínicas puesto que aproximadamente el 50% de los fármacos que consume el hombre son metabolizados por estas enzimas. Además, su expresión y actividad son influenciadas por diversos factores como la edad, sexo, dieta, especie, tejido y estado hormonal y, presentan especificidad superpuesta para algunos sustratos<sup>33</sup>. Aunque la principal función del CYP es participar en reacciones de detoxificación transformando un compuesto farmacológicamente activo en inactivo excretado por la orina, también participa en procesos de activación metabólica, de manera que compuestos inertes y poco reactivos son convertidos en otros de gran reactividad química que son tóxicos para el organismo. La mayoría de las reacciones catalizadas por el CYP requieren un paso inicial que involucra la inserción de un grupo hidroxilo el cual puede, dependiendo de la naturaleza del sustrato y estabilidad del intermediario, sufrir posteriores reacciones<sup>34</sup> (Figura 2).



**Figura 2:** Mecanismo de acción del citocromo P450. Hidroxilación de una droga liposoluble por acción del citocromo P450. El producto R-OH aumenta la solubilidad en agua, facilitando su excreción. Adaptado de Lenhinger (1984)<sup>34</sup>.

Algunos polimorfismos en los genes *CYP* se han asociado con aumento y disminución del riesgo de padecer algunos cánceres por su mayor o menor metabolización de carcinógenos o drogas<sup>35</sup>. Más concretamente los polimorfismos de los citocromos *CYP1A1*, *CYP3A4* y *CYP3A5* se han estudiado en relación a su posible participación en el desarrollo de la leucemia (Tabla 8).

En el gen *CYP1A1* se han estudiado los polimorfismos: *CYP1A1\*2A* localizado en el nucleótido (nt) 1194 en la región 3' no traducida (UTR) del exon 7 que aumenta la expresión *CYP*<sup>36</sup>; *CYP1A1\*2B* resulta en una sustitución I462V localizada en el sitio de unión de *CYP1A1* aumentando la actividad de la enzima. Este polimorfismo está en desequilibrio de ligamiento con el alelo T6235C del mismo gen; y *CYP1A1\*4* causa una sustitución T461N cerca del polimorfismo A4889G<sup>37</sup>, aunque su efecto biológico es desconocido.

La enzima *CYP3A4* es la isoforma más abundante de la familia *CYP* en el hígado humano adulto. Metaboliza numerosos compuestos clínicos, fisiológicos, y tóxicos importantes. La expresión de *CYP3A4* en el hígado varía 40 veces entre los individuos, y el metabolismo de sustratos de *CYP3A4* varía al menos 10 veces *in vivo*. Para *CYP3A4*, existen 38 polimorfismos conocidos diferentes. El polimorfismo *CYP3A4-V*, también conocido como *CYP3A4\*1B*<sup>38</sup> (Tabla 8) consiste en un cambio A290G en la región del promotor<sup>39</sup>. El papel de este polimorfismo es controvertido; inicialmente se propuso que podía disminuir la transcripción dada la baja incidencia del polimorfismo en individuos con cáncer de próstata<sup>39</sup> y LS/Síndrome mielodisplásico secundario (SMDS)<sup>40</sup>. Sin embargo los

estudios, basados en la expresión del gen de la luciferasa de la línea celular HepG2 del hepatoblastoma transfectada con la secuencia del promotor V indican que, contrariamente a lo que se esperaba, el alelo V muestra una transcripción más elevada que el alelo normal<sup>41</sup>.

El *CYP3A5* se expresa de manera polimórfica en un 10-29% de hígados humanos<sup>42</sup>. La proteína CYP3A5 representa al menos la mitad del contenido CYP3A en el hígado. El gen *CYP3A5* tiene 22 variantes polimórficas descritas<sup>43</sup>. Las variantes *CYP3A5\*3* y *CYP3A5\*6* inducen un sitio de *splicing* que disminuye sustancialmente el contenido hepático de CYP3A (Tabla 8). El alelo *CYP3A5\*1* produce un transcrito correcto y está presente en 15% y 45% en caucásicos y afro-americanos, respectivamente; sólo los individuos con al menos un alelo *CYP3A5\*1* presentan un nivel de expresión elevado de *CYP3A5*.

CYP2E1 cataliza la activación metabólica del procarcinógeno N-nitrosodimetilamina<sup>44,45</sup> y el tetracloruro de carbono citotóxico<sup>46</sup>. Las variaciones en la actividad para metabolizar las N-nitrosodialquilaminas han sido detectadas en los microsomas del hígado de diferentes individuos<sup>47</sup>, y Wrighton y cols.<sup>48</sup> han demostrado que los niveles de proteína de de ARNm de *CYP2E1* son diferentes entre los individuos. Estos resultados sugieren que la variación interindividual en la actividad metabólica puede ser atribuida a diferencias en la regulación de la transcripción. Se han descrito dos polimorfismos *CYP2E1\*5B* que están en desequilibrio de ligamiento en la región 5' flanqueante del gen *CYP2E1*<sup>49</sup>, -1293G>C y -1053C>T.

Se han detectado los polimorfismos *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2B*, y *CYP1A1\*4* en 12-16%, 8-9% y 9.5% de individuos caucásicos, respectivamente<sup>50,51</sup>. El polimorfismo *CYP3A4\*1B/V* muestra una variación

más amplia en cuanto a frecuencia entre grupos étnicos. Las incidencias descritas son del 8% en caucásicos<sup>39,52,53</sup>, 20% en hispanos<sup>54</sup>, 53% en afro-americanos<sup>41</sup>, y no se ha detectado en asiáticos<sup>52,55</sup>. El alelo *CYP3A5\*5* está presente en 18.4% de americanos no africanos, en 75% de afro-americanos y *CYP3A5\*6* se encuentra en 1% de americanos no africanos y 17.2% de afro-americanos<sup>56</sup>.

### 3.1.1 Polimorfismos *CYP* y leucemia

Un estudio realizado en LMA y LS/SMDS tratadas con epipodofilotoxinas muestra que el alelo *CYP3A4\*1B* tiene una frecuencia más baja en pacientes con LS/SMDS que en pacientes con LMA *de novo*<sup>40</sup> (Tabla 9). La hipótesis de los autores es que el genotipo normal podría facilitar la producción de ADN dañado por los metabolitos intermedios reactivos. Sin embargo, en posteriores estudios no se ha podido confirmar esta conclusión<sup>57,58</sup>. No se ha encontrado ninguna relación entre el polimorfismo *CYP3A4\*1B* y la LS<sup>57</sup>.

Un estudio caso-control realizado en adultos con LMA da cuenta del predominio superior del alelo *CYP1A1\*4* en pacientes que en controles<sup>50</sup> (Tabla 10), lo que confiere un mayor riesgo de leucemia que es más evidente cuando el genotipo *CYP1A1\*4* está combinado con los alelos *CYP1A1\*2B* y *delGSTT1* (OR = 10.2; IC del 95 %, 1.2-83.9; *P* = 0.01; y OR = 7.0; IC del 95 %, 2.0-24.8; *P* = 0.001, respectivamente). Sin embargo, estos resultados no se confirman en una serie de LLA pediátrica<sup>51</sup> (Tabla 10).

El polimorfismo *CYP1A1\*2B/V* tiene una incidencia mayor en pacientes con LMA que presentan la mutación *NRAS* comparado con los que

no la presentan<sup>29</sup>(Tabla 12). Este polimorfismo está particularmente sobre-representado en pacientes del grupo de riesgo citogenético bajo (OR = 15.9; IC del 95 %, 3.7-68.5).

Krajinovic y cols.<sup>51</sup> da cuenta de una mayor incidencia del alelo *CYP1A1\*2A* en niños con LLA en comparación con los controles; así se produce un incremento en el riesgo de desarrollar una LLA (Tabla 10). El mayor riesgo conferido por el alelo *CYP1A1\*2A* en el desarrollo de la LLA, se confirma en un reciente metanálisis<sup>59</sup>. Para el alelo *CYP1A1\*2B*, Krajinovic y cols.<sup>51</sup> no encuentra relación con LLA (Tabla 10).

Existen dos trabajos realizados en niños con LLA<sup>60,61</sup>, en los que se describe un aumento de riesgo de desarrollar una LLA en niños que presentan el polimorfismo *CYP2E1\*5B* (Tabla 10).

En resumen, la mayor parte de los trabajos revisados muestran que los polimorfismos *CYP* aumentan el riesgo de LMA y LLA, aunque es necesario el desarrollo de estudios adicionales para confirmar estos resultados preliminares.

### **3.1.2 Polimorfismos *CYP* y pronóstico de la enfermedad**

La mayor parte de los estudios revisados no han encontrado que los polimorfismos *CYP* ejerzan una influencia en el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, el trabajo de Krajinovic y cols<sup>62</sup>, previamente comentado, sugiere que el alelo *CYP1A1\*2* o su combinación con *NQO1\*2* podría tener un valor pronóstico.

El alelo *CYP1A1*\*2 parece conferir un riesgo mayor de recaída en LLA pediátrica. Precisamente, un estudio realizado en niños con LLA demostró que los portadores del alelo *CYP1A1*\*2 presentaban menor supervivencia<sup>62</sup> (Tabla 11). Un modelo de regresión de Cox incluyendo otros factores pronósticos (parámetros demográficos, biológicos, y recuento de leucocitos), confirma el valor pronóstico independiente de ser portador de este alelo<sup>62</sup>. Además, las combinaciones de *CYP1A1*\*2 con *NQO1*\*2 o con *hMLH1* I219 fueron más prevalentes entre 68 pacientes que recayeron a los cinco años de seguimiento que los que permanecían libres de enfermedad<sup>62</sup>. Sin embargo, para los polimorfismos *CYP3A* (*CYP3A4*\*1B, *CYP3A5*\*3 y *CYP3A5*\*6) los estudios de Aplenc y cols.<sup>56</sup> y Rocha y cols.<sup>63</sup> no han encontrado asociación entre estas variantes con el riesgo de recaída en niños con LLA (Tabla 11).

### 3.2 QUINONA OXIDOREDUCTASA

La quinona oxidoreductasa, también denominada NAD(P)H, menadiona oxidoreductasa 1 o *NQO1*, es una proteína flavina que cataliza la reducción de dos electrones. Esta enzima convierte las quinonas derivadas del benceno en hidroquinonas y ha sido asociada con hematotoxicidad por benceno<sup>64</sup> y resistencia a la mitomicina C<sup>65,66</sup>. Se han descrito dos polimorfismos en el gen *NQO1*, las sustituciones C609T y C465T, conduciendo a cambios de los aminoácidos P187S y R139W, respectivamente (Tabla 8). Ambas variantes afectan la función de la enzima; C465T causa una disminución de la actividad enzimática, mientras que el C609T causa una pérdida completa de la actividad enzimática<sup>67</sup>.

En los inicios de los años 1990, Traver y cols.<sup>65</sup> caracterizaron la actividad de NQO1 en líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón<sup>68</sup>. Los autores dieron cuenta de que células BE y H596, derivadas de cáncer de colon y pulmón, respectivamente, carecían de actividad NQO1. La secuencia del cADN del gen obtenido a partir de células BE reveló la presencia del polimorfismo C609T, también conocido como *NQO1\*2* (Tabla 8). Este polimorfismo causa una sustitución P187S, lo que conduce a una pérdida de función de la proteína. Edwards y cols. en 1980<sup>69</sup> dieron cuenta de que el 4% de la población inglesa mostraba una ausencia completa de la actividad NQO1. La homocigosis para este polimorfismo ha sido detectada en 4-5% de los caucásicos y afroamericanos, con una incidencia superior en hispanos<sup>70</sup> (Tabla 8); la homocigosis para este polimorfismo fue también detectada en un 20% de chinos<sup>68</sup>.

El polimorfismo *NQO1 C465T*, también denominado *NQO1\*3*, causa una disminución en la actividad de la enzima como resultado del splicing alternativo, que conduce a la pérdida del exon 4 en el ARNm, así como una serie de modificaciones postranscripcionales<sup>67</sup>. La frecuencia del alelo *NQO1\*3* es de 0.032 con 6.5% de heterocigosis en caucásicos y de 0.019 con una heterocigosis de 3.7% en los japoneses<sup>71</sup>.

El gen *NQO1* normalmente protege contra el envenenamiento por benceno. Así, un estudio caso-control realizado en trabajadores expuestos a benceno en China mostró un riesgo aumentado de hematotoxicidad y leucemia en personas portadoras del alelo *NQO1\*2*<sup>68,72,73</sup>. La homocigosis para *NQO1\*2* en combinación con la alta actividad enzimática del gen *CYP2E1* causa un incremento de 7.6 veces el riesgo de envenenamiento por

benceno<sup>72</sup>. Además, cuando la homocigosis para *NQO1*\*2 está combinada con el humo del tabaco o el consumo de alcohol, el riesgo de envenenamiento por benceno aumenta 8.15 veces y 21.5 veces en portadores heterocigotos y homocigotos respectivamente<sup>74</sup>.

Curiosamente, la médula ósea normal carece de actividad *NQO1*. Sin embargo, la presencia de concentraciones altas del metabolito del benceno, la hidroquinona, lo induce<sup>75</sup>. Asimismo, las células de la médula con el genotipo normal (C/C) muestran un aumento de la actividad *NQO1* en respuesta a la hidroquinona; los homocigotos para el polimorfismo (T/T) no presentan esta respuesta, y las células heterocigotas (C/T) presentan una respuesta intermedia. Por otra parte, la menadiona produce mayor toxicidad en ratones con el genotipo nulo que los portadores del alelo normal<sup>76</sup>.

### **3.2.1 *NQO1*\*2 y leucemia**

Varios estudios realizados en adultos en diversos grupos étnicos muestran una asociación del polimorfismo *NQO1*\*2 con LS/SMDS (Tabla 9). Es más, ser homocigoto para *NQO1*\*2 confería un riesgo de LS aumentado 2.6 veces comparado con los que presentaban el alelo normal<sup>55</sup>. También, este polimorfismo se ha visto fuertemente asociado con LS que presentan anomalías en los cromosomas 5 y/o 7<sup>70</sup>. Contrariamente a los resultados obtenidos en adultos, un estudio en niños con LLA publicado por Blanco y cols.<sup>57</sup> no encuentra diferencias en la incidencia de *NQO1*\*2 entre pacientes con LS (53 pacientes con LLA que desarrollan una LS) y controles (215 pacientes con LLA que no desarrollan una LS).

Las discrepancias observadas entre adultos y niños pueden ser atribuibles a muchos factores, particularmente a la terapia empleada para

tratar el primer tumor, aunque serían necesarios estudios complementarios para resolver esta controversia.

En la LLA, el alelo *NQO1*\*2 es más prevalente en niños que presentan translocaciones del gen de leucemia de linaje mixto (*MLL*)<sup>77,78</sup>(Tabla 10). La presencia de al menos un alelo *NQO1*\*2 incrementa 2.7 veces el riesgo de LLA/*MLL*-positivo. Además, los niños menores de un año con leucemia *de novo MLL*-positivo tienen mayor probabilidad de ser heterocigotos u homocigotos para *NQO1*\*2 (OR > 10.8; IC del 95 %, 1.58; *P* = 0.013)<sup>77</sup>. Contrariamente a estos resultados, en dos estudios caso-control (uno que implica a 108 niños japoneses con LLA<sup>71</sup>, y el otro, 138 niños caucásicos con LLA<sup>79</sup>, no se encontró correlación entre el alelo *NQO1*\*2 y la leucemia asociada con reordenamientos del gen (Tabla 10). Sin embargo, Eguchi-Ishimae y cols.<sup>71</sup> encontró una fuerte asociación entre la variante C465T y los niños LLA/*MLL* positivo, particularmente en los pacientes con el reordenamiento *MLL-AF4* (Tabla 10). Los estudios realizados en adultos con leucemia aguda muestran, principalmente, una incidencia significativamente superior del alelo *NQO1*\*2 en los pacientes con leucemia que en controles<sup>80</sup> (Tabla 12). Así, la presencia del alelo *NQO1*\*2 confiere un incremento del riesgo tanto de LMA como LLA (OR= 1.5 y 1.9, respectivamente). Además, tener el alelo *NQO1*\*2 se ha asociado con una incidencia particularmente alta en aquellos pacientes con LMA que presentan inv(16) (OR = 8.1; IC del 95 %, 1.4-46.4).

En resumen, la mayoría de los trabajos muestran que los polimorfismos *NQO1*\*2 y \*3 se relacionan con un riesgo aumentado de LLA. Sin embargo, queda todavía por esclarecer la asociación con los reordenamientos del gen *MLL*.

### 3.2.2 *NQO1*\*2 y pronóstico de la enfermedad

Se ha descrito que los individuos con LLA que presentan el alelo *NQO1*\*2 tienen peor resultado terapéutico<sup>51</sup> (Tabla 11). Cuando se incluyen los parámetros demográficos y biológicos en el modelo de regresión de Cox, la combinación de los alelos *NQO1*\*2 y *CYP1A1*\*2A parece predecir la recaída ( $P < 0.03$  y  $P < 0.001$ , respectivamente)<sup>51</sup> (Tabla 11).

En el trabajo de Krajinovic y cols<sup>62</sup>, los individuos *NQO1*\*2 tenían un peor pronóstico terapéutico (OR = 3.6; IC del 95%, 1.7-7.4), debido a la formación de especies reactivas de oxígeno y toxicidad asociada a drogas, causadas por la disminución de la actividad enzimática de *NQO1* que potenciaría el efecto de la droga.

### 3.3 Glutation S-transferasas

Las glutatión S-transferasas (GSTs) constituyen una familia de enzimas codificadas por cinco familias de genes,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ , y  $\sigma$ . Estas enzimas están implicadas en el metabolismo de fase II y están involucradas en la detoxificación de varios compuestos, incluyendo xenobióticos, pesticidas, agentes cancerígenos ambientales, Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y alguna droga quimioterápica (agentes alquilantes, doxorubicina y vincristina)<sup>73</sup>. Catalizan la conjugación de compuestos electrofílicos a la glutatión, una reacción que es algunas veces el primer paso en el proceso de detoxificación conduciendo a la formación de ácido mercapturico. Se han observado polimorfismos en al menos tres genes de la familia GST entre los que se encuentran *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*.

Los genes *GSTM1* y *GSTT1* presentan un polimorfismo que consiste en la supresión completa del gen que causa la pérdida de la actividad enzimática<sup>82-84</sup> (Tabla 8). El polimorfismo *GSTP1 I105V*, también denominado *GSTP1\*B*, causa la sustitución de una isoleucina por una valina en el sitio activo de unión electrofílico del péptido GST- $\pi$ <sup>85</sup> y afecta la actividad catalítica y la estabilidad térmica de la enzima<sup>86</sup>.

Los polimorfismos en los genes *GSTM1* y *GSTT1* muestran amplias diferencias en cuanto a la incidencia entre grupos étnicos. Así, la incidencia del polimorfismo nulo *GSTM1(delGSTM1)* es del 51-53% en blancos y 32% en negros, mientras que el polimorfismo en el gen *GSTT1(delGSTT1)* se encuentra en un 15-17 % de blancos y 28% de negros<sup>35,77,87</sup>.

El polimorfismo *GSTP1\*B* tiene una incidencia media de 53.5% entre los diferentes grupos étnicos y 51.6% en caucásicos (Tabla 8). Los polimorfismos en los genes *GST* se han asociado con susceptibilidad a enfermedades no malignas<sup>88</sup> y malignas incluyendo la LMA<sup>38,82,89-91</sup>. Además, los pacientes con un genotipo *delGST* podrían presentar una detoxificación deteriorada para agentes ambientales genotóxicos y drogas quimioterápicas, conduciendo a un riesgo aumentado de cánceres primarios y secundarios, así como complicaciones relacionadas con el tratamiento. Particularmente, *GSTP1* conjuga y protege de los efectos citotóxicos de algunos agentes quimioterápicos, como los agentes alquilantes, metabolitos de las antraciclinas y de la ciclofosfamida<sup>50</sup>.

Los polimorfismos *GST* pueden así contribuir a la susceptibilidad de los pacientes con LS/SMDS al tratamiento quimioterápico administrado en las malignidades primarias. Además, el papel de los genes *GSTs* en la detoxificación de agentes cancerígenos ambientales, como benzopirenos y

otros HAPs, sugiere la posible implicación de los polimorfismos *GST* en el desarrollo de la leucemia *de novo*.

### 3.3.1 Polimorfismos *GST* y leucemia de *novo* y secundaria

El polimorfismo *GSTP1\*B* está asociado con LS/SMDS, pero no con leucemia *de novo*. Un estudio caso-control demuestra que los individuos con al menos un alelo *GSTP1 V* están significativamente sobre-representados entre los pacientes con LS en relación con los controles, sugiriendo un riesgo aumentado de LS<sup>86</sup> (Tabla 9). Además, la presencia de al menos un alelo *V* genera un riesgo aumentado de LS después de la quimioterapia en relación con los homocigotos para el alelo *I* (OR = 2.7; IC del 95 %, 1.4-5.1). Además, el riesgo de LS está particularmente aumentado (OR = 4.3; IC del 95 %, 1.4-13.2) en pacientes tratados con agentes quimioterápicos que actúan como sustratos de la enzima *GSTP1*, como la isofosfamida, el busulfan o el clorambucilo<sup>86</sup>. Pero, estos resultados necesitan ser confirmados por otros estudios.

Varios estudios han investigado la influencia de *delGSTM1* y *delGSTT1* en el riesgo de LS/SMDS<sup>55,86,87,92</sup> (Tabla 9). La mayoría no han encontrado asociación de *delGSTM1* o *delGSTT1* con la LS/SMDS<sup>55,86,87,92</sup>. Sin embargo, en un estudio con un número reducido de sujetos japoneses (18 casos y 43 controles), Sasai y cols.<sup>93</sup> observan una asociación significativa entre *delGSTT1* y LS/SMDS (Tabla 9).

La mayor parte de los estudios realizados en adultos con LS/SMDS encuentran incidencias similares del genotipo *delGSTM1* en pacientes como en controles<sup>50,87,92-94</sup> (Tabla 9). Por el contrario, Rollinson y cols.<sup>89</sup>,

encuentran una débil asociación entre el genotipo *delGSTM1* y el riesgo de LMA. Seedhouse y cols.<sup>88</sup> dan cuenta de que la combinación del genotipo *delGSTM1* con los polimorfismos en los genes de reparación *RAD51-135C* y *XRCC3-241M* aumenta dramáticamente el riesgo de desarrollar una LMA (OR = 15.3; IC del 95 %, 1.8-127.8; *P* = 0.01).

Los resultados en la LLA pediátrica con *GSTM1* son controvertidos y, aunque algunos estudios muestran una asociación del polimorfismo *delGSTM1* con un riesgo aumentado para la LLA pediátrica<sup>51,82</sup> (Tabla 10), otros trabajos<sup>86,94</sup> no encuentran asociación entre *delGSTM1* y LLA (Tabla 10). En conjunto, de la literatura revisada, parece que el polimorfismo en el gen *GSTM1* (*delGSTM1*) confiera un riesgo aumentado de LLA. Por el contrario, para el genotipo *delGSTT1*, todos los estudios revisados<sup>51,86,82,95</sup> confirman la falta de asociación de este polimorfismo con el riesgo de desarrollar una LLA (Tabla 10).

En niños, Davies y cols.<sup>96</sup>, muestran que el genotipo *delGSTM1* es significativamente más prevalente en SMD o LMA que en los controles, y que el genotipo *delGSTM1* se ha asociado sobre todo con los subtipos FAB M3 y M4.

Se han obtenido resultados contradictorios en niños y adultos para el polimorfismo *delGSTT1*. Así, considerando el trabajo de Davies y cols.<sup>96</sup> en LS/SMDS pediátricos, no se ha encontrado asociación entre *delGSTT1* y el riesgo de leucemia (Tabla 12). Por su parte, los estudios realizados en adultos muestran una incidencia mayor del genotipo *delGSTT1* en los casos que en los controles<sup>50,92</sup>, sugiriendo que el genotipo *delGSTT1* aumenta el riesgo de LMA (Tabla 12). Además, se ha podido observar que la

combinación de *delGSTT1* y los polimorfismos *CYP1A1\*2B* y *CYP1A1\*4* aumentan el riesgo desarrollar una LMA<sup>97</sup> (OR = 10.2; IC del 95 %, 1.2-83.9;  $P = 0.01$ ; y OR = 7.0; IC del 95 %, 2.0-24.8;  $P = 0.001$ , respectivamente).

Un estudio caso-control realizado en 138 pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) y 280 controles sanos encuentra una incidencia similar para los genotipos *delGSTT1* y *delGSTM1* al igual que los homocigotos *GSTP1-I* en los casos como en los controles<sup>98</sup>. Sin embargo, la presencia concomitante de los tres genotipos de riesgo (*GSTT1*, *GSTM1* y *GSTP1*) aumenta el riesgo de desarrollar una LLC (OR = 2.8; IC del 95 %, 1.1-6.9). En cuanto las LLA, un estudio realizado en adultos da cuenta de una frecuencia significativamente superior del genotipo *delGSTM1* en los pacientes con LLA que en los controles (55.3 % v.s 32 %;  $P < 0.025$ )<sup>99</sup>. Dado que sólo se basan en unos cuantos estudios, estos resultados precisan confirmación por otros trabajos con un número mayor de pacientes.

### 3.3.2 Polimorfismos *GST* y pronóstico de la enfermedad

El análisis multivariado con el modelo de regresión de Cox, que incluye la citogenética, confirma las deleciones *GSTs* como factores pronósticos independientes en la respuesta a la quimioterapia y la SG ( $P = 0.01$ )<sup>100</sup>. Consecuentemente, determinar que el genotipo *delGSTs*, sería de particular interés en aquellos pacientes del grupo de riesgo citogenético intermedio que carecen de marcadores pronósticos.

Varios estudios sobre los genotipos *GSTs* y el pronóstico en la LLA en niños aportan resultados contradictorios. Así, considerando el trabajo de

Davies y cols.<sup>95</sup>, realizado en una de las series más grandes (710 niños con LLA tratados por el *Children of Cancer Group*), y el trabajo de Krajcinovic y cols.<sup>62</sup>, no encuentran diferencias en el pronóstico de la enfermedad de acuerdo con el genotipo *GSTs*, particularmente en términos de tasa de recaída. Sin embargo, estudios realizados en una serie más corta<sup>63,101</sup> (Tabla 11) dan cuenta de que los pacientes con los genotipos normales para los genes *GSTM1* o *GSTT1* tienen mayor riesgo de recaída hematológica en comparación con el genotipo nulo. Otros autores<sup>101</sup> no encuentran asociación entre polimorfismo *GSTP1\*B* con el pronóstico de LLA en niños (Tabla 11).

Los trabajos en niños<sup>102</sup> y adultos<sup>38</sup> han demostrado que las deleciones *GSTs* tienen un efecto desfavorable en el pronóstico de la LMA. Así, las investigaciones realizadas en niños con LMA muestran que los pacientes con el genotipo *delGSTT1* tienen una SG significativamente más corta que aquellos pacientes con el genotipo normal *GSTT1* después de la quimioterapia intensiva, incluyendo altas dosis de antraciclinas y citarabina<sup>95</sup> (Tabla 13). El análisis de regresión de Cox, que incluye los parámetros demográficos y biológicos, confirma el aumento de riesgo de muerte de los pacientes portadores del polimorfismo *delGSTT1*. La incidencia de muerte durante la remisión también aumenta en pacientes *delGSTT1* debido a la sensibilidad mayor de estos pacientes a la quimioterapia. Sin embargo, el genotipo *delGSTM1* no influye en la SG.

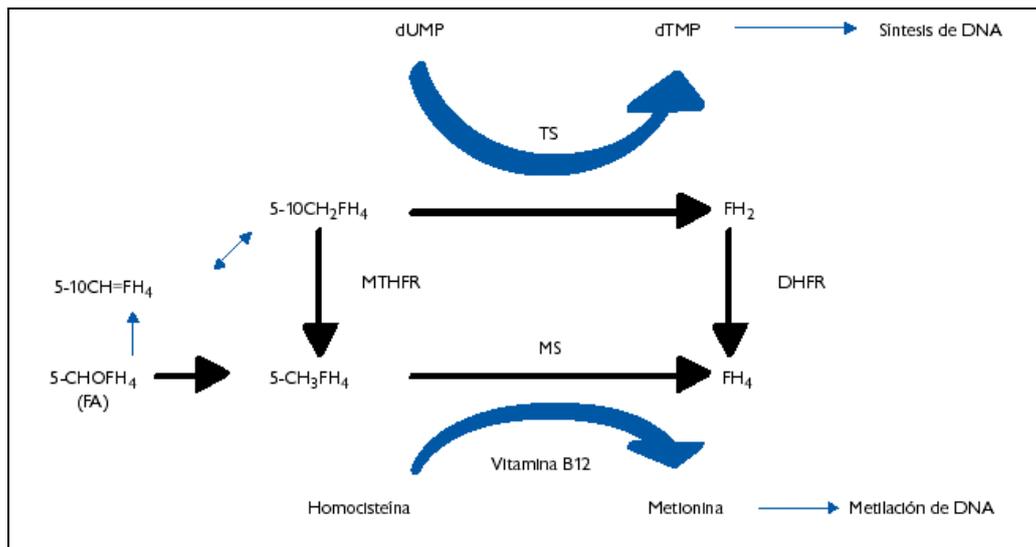
El estudio realizado en adultos con LMA también concluye que las deleciones *GSTs* (*delGSTT1* y *delGSTM1*) predicen una respuesta escasa a la quimioterapia de inducción y en consecuencia, a una más corta SG<sup>38</sup> (Tabla 13).

### 3.4 Metabolismo del folato y polimorfismos en *MTHFR* y *TS*

El folato es un nutriente esencial para el crecimiento normal de los mamíferos. Está implicado en reacciones que incluyen la síntesis de purinas y pirimidinas, como la provisión de grupos metilo por metilación de ADN, ARN y proteínas<sup>103-105</sup>. Se han propuesto dos mecanismos por los que la deficiencia de folato podría afectar la malignidad: causando hipometilación de ADN y activación de protooncogenes o bien induciendo la incorporación de uracilo durante la síntesis de ADN, resultando en una reparación del ADN alterada, rotura de doble cadena de ADN y daño cromosómico<sup>103,106-108</sup>.

El status del folato podría potencialmente estar perturbado en parte, por la existencia de polimorfismos en el gen metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) y de la timidilato sintetasa (*TS*).

La *MTHFR* regula la cantidad de folato intracelular para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y convierte al 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>) a 5-metiltetrahidrofolato (5-CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub>), un donador de grupo metilo necesario para la conversión de homocisteína a metionina durante la síntesis de proteínas<sup>109</sup> (Figura 3). Sin embargo, la 5,10-CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub> es también la principal fuente de grupos metilo necesarios para la conversión de uracilo en timina. Si los niveles de timina son escasos, el uracilo es incorporado en el ADN recién sintetizado. Los subsiguientes mecanismos de reparación del ADN para eliminar el uracilo mal incorporado podrían inducir a la rotura de la hebra<sup>107,110</sup>.



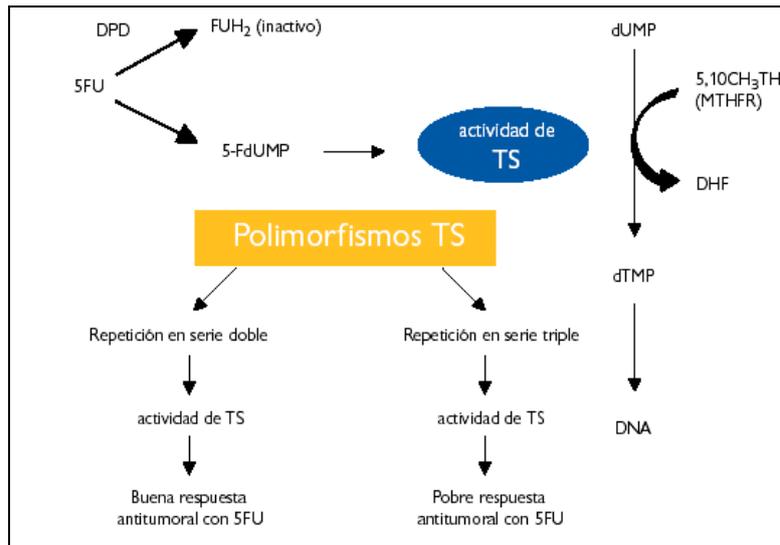
**Figura 3:** La *MTHFR* convierte al 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, un donador de grupo metilo necesario para la conversión de homocisteína a metionina durante la síntesis de proteínas. Adaptado de Candelaria M (2007)<sup>111</sup>.

En el gen *MTHFR*, el polimorfismo C677T conduce a una sustitución A222V (Tabla 8). Este polimorfismo produce una enzima termolábil que causa hiperhomocisteinemia en portadores con bajos niveles plasmáticos de ácido fólico<sup>112</sup>. Este polimorfismo se ha encontrado en un 37% de caucásicos<sup>113</sup>. Un segundo polimorfismo en A1298C conduce a una sustitución E439A. El alelo tiene una frecuencia global media de 45% y se encuentra en un 61% de caucásicos<sup>114</sup>. Los homocigotos para este polimorfismo muestran una reducción del 61% en la actividad linfocítica de la *MTHFR*<sup>115</sup>. Los dobles heterocigotos (A1298C y C677T) encontrados en un 15% de la población, se han asociado con una reducción de actividad de la enzima en un 50-61% en comparación con los encontrados en individuos con alelos normales.

Es probable que exista una conexión entre polimorfismos funcionales en el gen *MTHFR* y la leucemogénesis dado que existe una relación entre la concentración de folato y la susceptibilidad al daño genético en células en

división activa, como los implicados en la hematopoyesis<sup>107</sup>. Asimismo, el polimorfismo *MTHFR* C677T está asociado con una reducción del riesgo de desarrollar un cáncer de colon y LLA<sup>74</sup>. Este efecto protector estaría relacionado con el nivel de folato, por lo tanto el riesgo de cáncer podría aumentar en sujetos homocigotos para *MTHFR* C677T con ingestas bajas de folato<sup>116,119</sup>.

El 5-FU es una droga quimioterápica en la que se sustituye en el carbono 5 del anillo de pirimidina del uracilo el hidrógeno por flúor. La enzima timidina fosforilasa (TP) cataliza la conversión de 5-fluoruracilo a FudR y posteriormente sufre una fosforilación por la timidina quinasa (TK) a 5-fluoro-2'deoxiuridin-5'monofosfato (FdUMP) (Figura 4). Este metabolito es el que inhibe directamente a la enzima timidilato sintetasa (TS). Esta enzima es necesaria para la síntesis de piridiminas de novo y su inhibición impide la replicación del DNA y por tanto el crecimiento tumoral<sup>117,118</sup>. El gen *TS* posee un único sitio de repetición interna en tándem en 5' UTR, antes del codon de inicio ATG<sup>119,120</sup>. Este polimorfismo consta de repeticiones en tandem de 28pb en múltiplos de dos (2R) o tres (3R) (Tabla 8). El polimorfismo 3R aumenta la expresión del gen. Esta hiperexpresión puede inducir la conversión de dUMP en dTMP, disminuyendo los niveles de uracilo y, por lo tanto impidiendo la incorporación errónea de uracilo en el ADN (Figuras 4). El alelo *TS* 3R se encuentra en 38-54 % de la población caucásica.



**Figura 4:** El metabolito de 5-FU, FdUMP forma un complejo ternario estable con TS y el cofactor metilo, bloqueando la producción de d'TMP e inhibiendo la síntesis de DNA. Adaptado de Candelaria M (2007)<sup>111</sup>.

### 3.4.1 Polimorfismos en los genes del metabolismo del folato y la leucemia aguda

La relación entre los polimorfismos *MTHFR* y el riesgo de leucemia aguda en adultos (LMA o LLA) permanece poco clara. En los estudios realizados en LMA no se han visto diferencias significativas de los genotipos *MTHFR T677T*, *A1298C* y *C1298C*, entre los casos y los controles<sup>110</sup> (Tabla 12). En el caso de la LLA del adulto se observan resultados contradictorios. En un estudio caso-control realizado en LLA del adulto (71 pacientes con LLA v.s 114 controles)<sup>110</sup> (Tabla 10) se observa que el genotipo *MTHFR T677T* tiene una incidencia menor en los casos que en los controles, confiriendo una reducción en el riesgo de LLA. Además, el genotipo *MTHFR A1298C* confiere una reducción de 3 veces el riesgo de desarrollar una LLA. Además, los individuos doble heterocigotos muestran una reducción fuerte en el riesgo de LLA comparado con individuos homocigotos [OR = 0.2

(C677T/A1298C); IC del 95 %, 0.1-0.8 (C677C/A1298A)]. Sin embargo, la asociación entre *MTHFR C677T* y el riesgo de LLA en el adulto no se ha podido demostrar en otros grupos poblacionales<sup>86</sup>.

Muchos trabajos, en pacientes de edad pediátrica, muestran que el polimorfismo *MTHFR C677T* o su combinación con el polimorfismo *A1298C* confiere un papel protector contra el desarrollo de LLA<sup>116,121,122</sup>(Tabla 10), de tal manera que un estudio de caso-control confirma que tanto T677T/A1298A como los genotipos C677C/C1298C disminuyen el riesgo de LLA<sup>122</sup>, y este efecto protector también podría ser logrado por administración de folato durante el embarazo.

Además, existe una relación de los polimorfismos *MTHFR* y algunas nuevas alteraciones cromosómicas<sup>121</sup>. Así, los pacientes con leucemia que presentan el reordenamiento *MLL* tienen incidencias más bajas del polimorfismo *C677T* y una incidencia más alta de *A1298C*. Además, los genotipos C677T y T677T presentan un efecto protector en pacientes con leucemia MLL-positivo, y este efecto es más fuerte para CT (OR = 0.3; IC del 95%, 0.1-0.7) que para TT (OR = 0.5; IC del 95%, 0.2-1.5).

También se ha observado que algunos polimorfismos en otros genes implicados en el metabolismo del folato también podrían conferir protección para LLA<sup>123</sup>. Así, el polimorfismo *TS 2R3R* disminuye el riesgo de LLA 2.8 veces y *3R3R* lo reduce hasta 4 veces (Tabla 10). Además, la combinación del polimorfismo *3R3R TS* y *1420CT/TT SHMT1* confiere una reducción fuerte en el riesgo de LLA (OR = 0.1; IC del 95 %, 0.0-0.8).

### 3.4.2 Polimorfismos en los genes del metabolismo del folato y el pronóstico

Los polimorfismos de *MTHFR* pueden ser moduladores potenciales de quimioterapia del ácido fólico con metotrexato (MTX). Así, las células leucémicas de pacientes con el polimorfismo *MTHFR C677T* muestran mayor sensibilidad para MTX *in vitro*<sup>124,125</sup>. En este sentido, en un estudio realizado en 201 niños con LLA tratados con MTX, los pacientes con el haplotipo *MTHFR C677C/A1298A* o con la variante *metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1 A1958 (MTHFD1 A1958)* tiene una menor probabilidad de supervivencia libre de evento (SLEv) y el haplotipo *MTHFR T677T/A1298A* aumenta el riesgo de recaída<sup>126</sup> (Tabla 11). Además, la combinación *TS 3R* y *MTHFR T677T/A1298A* o *MTHFD1 A1958A* reduce significativamente la SLEv (HR = 9.0; IC del 95 %, 1.9-42.8; Y HR = 8.9; IC del 95 %, 1.8-44.6, respectivamente). También se ha observado que la homocigosis *MTHFR T677T* se asocia con un riesgo aumentado de los efectos secundarios del MTX a nivel oral, gastrointestinal y hepático<sup>127</sup>. Sin embargo, todos estos resultados deberían ser considerados preliminares dado que se basan solo en estos trabajos.

*TS* es una enzima esencial para la proliferación celular y un candidato importante para el MTX<sup>128</sup>. Los trabajos de Rocha y cols<sup>63</sup> y Krajinovic y cols<sup>129</sup> confirman la relevancia del polimorfismo *TS 3R* en la respuesta al MTX (Tabla 11). Así, Rocha y cols<sup>63</sup> estudian la repercusión de 16 polimorfismos genéticos comunes en la farmacodinámica de drogas antileucémicas en 246 niños con LLA tratados con dosis altas de MTX. Además los pacientes que presentan la combinación *delGSTM1/TS3R3R*

tienen un mayor riesgo de recaída hematológica y se ha demostrado por análisis multivariante que estos polimorfismos son factores pronósticos independientes. Krajinovic y cols<sup>129</sup> (Tabla 11) muestran que niños con genotipo *TS 3R* con LLA tratados con MTX tienen respuesta escasa. Sin embargo, otro estudio en este campo no relaciona el riesgo de recaída de LLA con el genotipo 3R/3R. Por lo tanto, dosis más altas de MTX podrían vencer la farmacoresistencia causada por el polimorfismo. Si bien, estas afirmaciones se deben confirmar con más estudios.

**Tabla 9.-** Polimorfismos y riesgo de desarrollar LS/SMDS

Vía metabólica	Gen	Polimorfismo	Grupos étnicos	Casos	Frecuencia polimorfismo (%)	Controles	Frecuencia polimorfismo (%)	OR	95% IC	P	Referencias
Fase I del metabolismo	<i>CYP3A4</i>	*1B/V	Blancos, Negros, Hispanos	33	3	99 LMA	19	0.07	0.0-0.7	0.05	Felix y cols. <sup>40</sup>
	<i>CYP3A4</i>	*1B/V	Blancos, Negros, Hispanos	41	9.7	167	6.6	1.53	0.3-1.5	n.s.	Blanco y cols. <sup>57</sup>
			Blancos, Negros, Hispanos	8	87.5	32	93.7	0.47	0.0-5.9	n.s.	
			Blancos, Negros, Hispanos	4	25.0	23	39.1	0.52	0.1-5.8	n.s.	
	<i>CYP3A4</i>	*1B/V	Caucásicos	23	4.5	173	8.0	n.r		n.s.	Collado y cols. <sup>58</sup>
<i>CYP3A5</i>	*3	Blancos, Negros, Hispanos	41	14.6	167	17.9	1.28	0.5-3.3	n.s.	Blanco y cols. <sup>57</sup>	
		Blancos, Negros, Hispanos	8	87.5	31	93.5	2.07	0.2-26.2	n.s.		
Fase II del metabolismo	<i>GSTM1</i>	delección	Japoneses	18	61	43	53	FET		n.s.	Sasai y cols. <sup>93</sup>
	<i>GSTM1</i>	delección	Japoneses	58	44.8	150	51.3	0.77	0.0-1.7	n.s.	Naoe y cols. <sup>55</sup>
	<i>GSTM1</i>	delección	Caucásicos	89	55	1022	49	1.31	0.8-2.0	n.s.	Allan y cols. <sup>86</sup>
	<i>GSTM1</i>	delección	Caucásicos	42	54.7	175	49.5	0.98	0.5-2.0	n.s.	Seedhouse y cols. <sup>87</sup>
	<i>GSTT1</i>	delección	Japoneses	18	67	43	30	FET		0.01	Sasai y cols. <sup>93</sup>
	<i>GSTT1</i>	delección	Japoneses	58	46.6	150	54.0	0.74	0.0-1.6	n.s.	Naoe y cols. <sup>55</sup>
	<i>GSTT1</i>	delección	Caucásicos	89	21	1022	14	1.79	1.0-3.1	n.s.	Allan y cols. <sup>86</sup>
	<i>GSTP1</i>	*B	Caucásicos	89	63	1022	51	1.58	1.0-2.5	0.05	Allan y cols. <sup>86</sup>
Radicales Libres	<i>NQO1</i>	*2	Caucásicos, Afro-americanos, Hispanos, Asiáticos Adultos	56	51.7	*Estimado	21.65*	Chi-cuadrado		0.03	Larson y cols. <sup>70</sup>
	<i>NQO1</i>	*2	Japoneses Adultos	58	24.1(hom) 72	150	10.6(hom) 58	2.62	2.2-3.1	0.002	Naoe y cols. <sup>55</sup>

**Tabla 9.-** Polimorfismos y riesgo de desarrollar LS/SMDS ("Continuación")

Vía metabólica	Gen	Polimorfismo	Grupos étnicos	Casos	Frecuencia polimorfismo (%)	Controles	Frecuencia polimorfismo (%)	OR	95% IC	P	Referencias
	<i>NQO1</i>	*2	Niños	41	44	160	35	1.45	0.7-2.9	n.s.	Blanco y cols. <sup>57</sup>
			Blancos,	8	38	32	38	1.00	0.2-4.9	n.s.	
			Negros,	4	50	23	65	0.53	0.1-4.5	n.s.	
			Hispanos								

IC: Intervalo de confianza; Grupos étnicos: descritos en los artículos de referencia; \* : estimado para los diferentes grupos étnicos; FET: test exacto de Fisher; hom: homocigoto; n.s.: no significativo; OR: odds ratio; Frecuencia polimorfismo (%): si no se indica en la tabla, la frecuencia del polimorfismo se refiere a la suma del los individuos homocigotos y heterocigotos.

**Tabla 10.-** Polimorfismos y riesgo de desarrollar una LLA o LA

Vía metabólica	Gen	Polimorfismo	Grupos étnicos	Casos	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	Controles	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	OR	95% IC	P	Referencias
Fase I del metabolismo	CYP1A1	*2A	Caucásicos (Turcos)	144 LLA y 33 LANL (niños)	16.7	185	16.9	0.99	0.6-1.6	n.s.	Balta y cols. <sup>85</sup>
	CYP1A1	*2A	Caucásicos	170 LLA (adulto)	19.4	299	11.7	1.8	1.1-3.1	0.03	Krajnovic y cols. <sup>62</sup>
	CYP1A1	*2B	Caucásicos	170 LLA (adulto)	7.3	299	8.0	0.9	0.4-1.8	n.s.	Krajnovic y cols. <sup>62</sup>
	CYP1A1	*4	Caucásicos	177 LLA (adulto)	5.6	295	9.5	0.6	0.3-1.2	n.s.	Krajnovic y cols. <sup>62</sup>
	CYP2E1	5B	Caucásicos	174 LLA (niños)	8.0	304	3.0	2.85	1.2-6.7	0.01	Krajnovic y cols. <sup>60</sup>
	CYP2E1	5B	Caucásicos (Turcos)	119 LLA (niños)	13.4	140	4.3	3.47	1.3-9.2	0.01	Sayitoglu y cols. <sup>61</sup>
Fase II del metabolismo	GSTM1	delección	Blancos y Negros	163 LLA (niños)	55.2 Blancos 41.2 Negros	416	53.5 27.6	0.68 2.6	----	n.s 0.0005	Chen y cols. <sup>92</sup>
	GSTM1	delección	Caucásicos	177 LLA (niños)	64	304	51.3	1.8	1.2-2.6	0.04	Krajnovic y cols. <sup>62</sup>
	GSTM1	delección	Caucásicos	47 LLA (niños)	68.1	102	49.0	2.2	1.1-4.5	0.035	Alves y cols. <sup>80</sup>
	GSTM1	delección	Blancos y Negros	616 LLA 35 LLA Negros (niños)	54 Blancos 40 Negros	532 201	54 32	FET	----	n.s n.s	Davies y cols. <sup>95</sup>
	GSTM1	delección	Caucásicos (Turcos)	139 LA (niños)	55.4	185	54.6	1.03	0.7-1.6	n.s.	Balta y cols. <sup>85</sup>
	GSTT1	delección	Blancos y Negros	163 LLA(niños)	14.1 Blancos 35.3 Negros	416	15.0 24.1	FET		n.s.	Chen y cols. <sup>92</sup>
	GSTT1	delección	Caucásicos	177 LLA(niños)	15.9	304	17.2	0.9	0.5-1.5	n.s.	Krajnovic y cols. <sup>62</sup>
	GSTT1	delección	Caucásicos	47LLA(adultos)	19.2	102	25.5	2.2	1.1-4.5	n.s.	Alves y cols. <sup>80</sup>

**Tabla 10.-** Polimorfismos y riesgo de desarrollar una LLA o LA ("Continuación")

Vía metabólica	Gen	Polimorfismo	Grupos étnicos	Casos	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	Controles	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	OR	95% IC	P	Referencias
	<i>GSTT1</i>	delección	Blancos y Negros	616 LLA Blancos 35 LLA Negros (niños)	16 Blancos 17 Negros	532 201	16 28	FET		n.s. n.s	Davies y cols. <sup>95</sup>
	<i>GSTT1</i>	delección	Caucásicos (Turcos)	139 LA (niños)	20.9	185	22.7	0.9	0.5-1.5	n.s.	Balta et al. <sup>85</sup>
	<i>GSTP1</i>	*B	Caucásicos (Turcos)	139 LA (niños)	44.1	185	44.3	1.16	0.7-2.0	n.s.	Balta et al. <sup>85</sup>
Radicales libres	<i>NQO1</i>	*2	Caucásicos	39 MLL(+) LA (niños)	61.5	56 MLL(-) de novo linaje B LLA	39.3	2.77	1.2-6.6	0.033	Smith y cols. <sup>77</sup>
	<i>NQO1</i>	*2	Ingleses	36 (LLA and LMA MLL[+]) (adultos)	55	100 sangre de cordón	33	2.54	1.1-6.0	0.015	Wiemels y cols. <sup>78</sup>
	<i>NQO1</i>	*2	Japoneses	64 (49 LLA+ 15 LMA, MLL +) (infantes)	(59.1)LLA (56.0)MLL- AF4 (80)AML	185 sangre de cordón	55.3	1.17 1.03 3.23	0.6-2.2 0.4-2.4 0.9-11.8	0.63 0.95 0.10	Eguchi-Ishimae y cols. <sup>71</sup>
	<i>NQO1</i>	*2	Caucásicos	50 infantes LLA(32 MLL+ y 18 MLL-)	(72)CC+CT	106 casos pediátricos s LLA 147 controles sanos	(38)CC+CT(1 47 controles sanos)	4.22 5.72	1.4-12.5 1.7-16.0	0.006 0.002	Lanciotti y cols. <sup>130</sup>

**Tabla 10.-** Polimorfismos y riesgo de desarrollar una LLA o LA ("Continuación")

Vía metabólica	Gen	Polimorfismo	Grupos étnicos	Casos	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	Controles	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	OR	95% IC	P	Referencias
	NQO1	*2	Caucásicos	138 infant LLA	(25.7)MLL/AF 4(CT) (29.2)TEL/AM L1(CT) (38.7)BCR/AB L(CT)	190	(66.3)CC (32.1)CT (1.6)TT	0.79 0.92 1.42	0.4-1.7 0.5-1.7 0.4-3.8	0.56 0.79 0.37	Kracht y cols. <sup>81</sup>
	NQO1	*3	Japoneses	64 (49 LLA+ 15 LMA, MLL +) (infantes)	(12.2)LLA (20.0)MLL- AF4 (0)LMA	185 sangre de cordon	3.7	3.55 6.36	1.1-11.1 1.8-21.9 -----	0.02 0.001 0.59	Eguchi-Ishimae y cols. <sup>71</sup>
Metabolismo del ácido fólico	MTHFR	A1298C	Caucásicos	69 LLA (adultos)	33.3 (AC) 1.5 (CC)	114	47.7 (AC) 9.6 (CC)	0.33 0.07	0.2-0.7 0.0-1.8	0.05 n.s.	Skibola y cols. <sup>110</sup>
	MTHFR	C677T	Caucásicos	71 LLA(adulto)	42 CT) 7.2 (TT)	114	34.2 (CT) 12.3 (TT)	0.58 0.23	0.3-1.3 0.1-0.8	n.s. 0.05	Skibola y cols. <sup>110</sup>
	MTHFR	C677T	Caucásicos	71 LLA (niños)	39.4 (CT) 8.4 (TT) 47.8 (CT+TT)	71	50.7 (CT) 18.3 (TT) 69.0 (CT+TT)	0.5 0.3 0.4	0.2-0.9 0.1-0.8 0.2-0.8	0.05 0.05 0.05	Franco y cols. <sup>120</sup>
	MTHFR	A1298C	Caucásicos	71 LLA (niños)	42.2 (AC) 7.0 (CC) 49.2 (AC+CC)	71	39.4 (AC) 2.8 (CC) 42.2 (AC+CC)	1.3 2.8 1.3	0.7-7.6 0.5-15.6 0.7-2.6	n.s. n.s. n.s.	Franco y cols. <sup>120</sup>
	MTHFR	C677T	Caucásicos	37 MLL(+) LLA (niños)	21.6	200 recién nacidos sanos	35.8	0.36 CT+ TT	0.2-0.9	0.017	Wiemels y cols. <sup>78</sup>
	MTHFR	A1298C	Caucásicos	37 MLL(+) LLA (niños)	40.5	200 recién nacidos sanos	32.4	1.14	0.5-2.7	n.s.	Wiemels y cols. <sup>78</sup>
	MTHFR	C677T	Turcos	142 LLA (adultos)	29	185	28	1.04	0.7-1.5	n.s.	Balta y cols. <sup>85</sup>

**Tabla 10.-** Polimorfismos y riesgo de desarrollar una LLA o LA ("Continuación")

Vía metabólica	Gen	Polimorfismo	Grupos étnicos	Casos	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	Controles	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	OR	95% IC	P	Referencias
	<i>MTHFR</i>	<i>T677T/A1298A</i>	Francés-Canadienses	270 LLA (niños)	11.5	300	15.3	0.4	0.2-0.9	0.02	Krajnovic y cols. <sup>126</sup>
	<i>MTHFR</i>	<i>C677C/C1298C</i>	Francés-Canadienses	270 LLA (niños)	4.4	300	10.3	0.3	0.1-0.6	0.001	Krajnovic y cols. <sup>126</sup>
	<i>MTHFR</i>	<i>A1298C</i>	Francés-Canadienses	270 LLA (niños)	39.6 (AC) 4.4 (CC)	300	39.7 (AC) 10.3 (CC)	0.9 0.4	0.6-1.3 0.2-0.8	n.s. n.s.	Krajnovic y cols. <sup>126</sup>
	<i>TS</i>	<i>2R3R</i>	Caucásicos	71 LLA (adultos)	52.2 (2R/3R) 11.9 (3R/3R)	114	58.8 (2R/3R) 21.1 (3R/3R)	0.36 0.25	0.2-0.8 0.1-0.8	0.01 0.01	Skibola y cols. <sup>123</sup>
	<i>SHMT1</i>	<i>C1420T</i>	Caucásicos	71 LLA (adultos)	36.6 (CT) 5.6 (TT)	114	44.7 (CT) 15.80 (TT)	0.48 0.31	0.3-0.9 0.1-0.9	0.02 0.031	Skibola y cols. <sup>123</sup>
	<i>MTRR</i> & <i>SHMT1</i>	<i>A2756G &amp; 1420CT/TT</i>	Caucásicos	71 LLA (adultos)	36.6 (CT) 5.6 (TT)	114		0.18	0.1-0.6	0.008	Skibola y cols. <sup>123</sup>

IC: Intervalo de confianza; Grupos étnicos: descritos en los artículos de referencia; \* : estimado para los diferentes grupos étnicos; FET: test exacto de Fisher; hom: homocigoto; n.s.: no significativo; OR: odds ratio.

**Tabla 11.-** Polimorfismos y pronóstico de pacientes con LLA

Vía metabólica	Gen	Polimorfismo	Grupos étnicos	Evento	Casos	Controles	OR	95% IC	P	Referencias
Fase I del metabolismo	CYP1A1	*2A	Franco-Canadienses	SLE	68 recaídas	320 niños en RC	2.3†	1.1-4.9	0.003	Krajcinovic y cols. <sup>62</sup>
	CYP3A4	*1B	Americanos no africanos, Afro-americanos	Recaída	222 recaídas	982 niños en RC	1.9	0.6-2.2	n.s.	Aplenc y cols. <sup>56</sup>
	CYP3A5	*3	Americanos no africanos, Afro-americanos	Recaída	222 recaídas	982 niños en RC	1.02	0.6-1.7	n.s.	Aplenc y cols. <sup>56</sup>
	CYP3A5	*3	Blancos, Negros, Otros	Eventos adversos: Recaídas, muerte en remisión	47 recaídas	246 niños en RC			n.s.	Rocha y cols. <sup>63</sup>
	CYP3A5	*6	Americanos no africanos, Afro-americanos	Recaída	222 recaídas	982 niños en RC	0.79	0.1-4.0	n.s.	Aplenc y cols. <sup>56</sup>
Fase II del metabolismo	GSTM1	Delección	Caucásicos	Recaída	64 recaídas	64 niños en RC	0.5	0.2-1.1	n.s	Stanulla y cols. <sup>101</sup>
	GSTM1	Delección		SLE	68 recaídas	247 niños con LLA	1.1†	0.6-2.1	n.s.	Krajcinovic y cols. <sup>51</sup>
	GSTM1	non-null	Blancos, Negros, Otros	Eventos adversos: Recaídas, muerte en remisión	47 recaídas	246 niños en RC	18.1† GSTM1 normal	3.9-84.4	0.0002	Rocha y cols. <sup>63</sup>
	GSTM1	Delección	Blancos, Negros, Hispanos, Asiáticos	SG SLE	132 recaídas	710 LLA niños (616 Blancos)	0.9& 0.9&		n.s n.s	Davies y cols. <sup>95</sup>

**Tabla 11.-** Polimorfismos y pronóstico de pacientes con LLA ("Continuación")

Vía metabólica	Gen	Polimorfismo	Grupos étnicos	Evento	Casos	Controles	OR	95% IC	P	Referencias
	<i>GSTT1</i>	Deleción	Caucásicos	Recaída	64 recaídas	64 niños en RC	0.36	0.1-1.0	0.048	Stanulla y cols. <sup>101</sup>
	<i>GSTT1</i>	Deleción	Franco-Canadienses	SLE	68 recaídas	231 niños con LLA	1.1†	0.4-3.1	n.s.	Krajinovic y cols. <sup>51</sup>
	<i>GSTT1</i>	Deleción	Blancos, Negros, Hispanos, Asiáticos	SG SLE	132 recaídas	710 LLA niños (616 Blancos)	1.2& 1.0&		n.s n.s	Davies y cols. <sup>95</sup>
	<i>GSTP1</i>	*B	Caucásicos	Recaída	64 recaídas	64 niños en RC	0.33	0.1-1.2	0.099	Stanulla y cols. <sup>101</sup>
Radicales libres	<i>NQO1</i>	*2	Franco-Canadienses	SLE	68 recaídas	252 niños en RC	3.6†	1.7-7.4	0.001	Krajinovic y cols. <sup>51</sup>
Metabolismo del ácido fólico	<i>MTHFR</i>	C677T/A1298C	Franco-Canadienses	SLE	35 recaídas	166 adultos en RC	2.2†	1.1-4.7	0.04	Krajinovic y cols. <sup>126</sup>
	<i>MTHFD1</i>	A1958	Franco-Canadienses	SLE	35 recaídas	166 adultos en RC	2.8†	1.1-7.3	0.003	Krajinovic y cols. <sup>126</sup>
	<i>TS</i>	2R3R	Franco-Canadienses	Recaída o muerte	32 recaídas	173 adultos en RC	5.2	1.6-16.9	0.005	Krajinovic y cols. <sup>129</sup>
	<i>TS</i>	3R3R vs otros	Franco-Canadienses	Recaída o muerte	40 Recaídas	40 adultos en RC	1.1	0.7-3.0	n.s	Lauten y cols. <sup>131</sup>
	<i>TS</i> 3R/3R+ <i>GSTM1</i> <i>normal</i>		Blancos, Negros, Otros	Recaída	47 eventos adversos (recaídas, segundas malignidades, muerte en remisión)	246 niños en RC	14.5†	2.5-85.2	0.0031	Rocha y cols. <sup>63</sup>

IC: Intervalo de confianza; Grupos étnicos: descritos en los artículos de referencia; \* : estimado para los diferentes grupos étnicos; n.s.: no significativo; OR: odds ratio; RC: Remisión Completa; SG: supervivencia global; SLE: Supervivencia libre de enfermedad; †: Hazard ratio; KM: Kaplan-Meier; &: Riesgo Relativo

**Tabla 12.-** Polimorfismos y riesgo de desarrollar una LMA o SMD

Vía metabólica	Gen	Polimorfismo	Grupos étnicos	Casos	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	Controles	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	OR	95% IC	P	Referencias
Fase I del metabolismo	<i>CYP1A1</i>	*2B	Caucásicos	53 LMA con mutación NRAS (adultos)	15.1	371 LMA sin mutación NRAS	7	2.36	1.0-5.5	0.05	Bowen y cols. <sup>29</sup>
	<i>CYP1A1</i>	*2B	Caucásicos	193 LMA (adultos)	7.3	273	9.2		n.r.	n.s.	D'Aló y cols. <sup>50</sup>
	<i>CYP1A1</i>	*4	Caucásicos	193 LMA (adultos)	19.1	273	9.9	2.2	1.3-3.7	0.006	D'Aló y cols. <sup>50</sup>
	<i>CYP3A4</i>	*1B/V	Caucásicos	215 LMA (adultos)	9.7	173	9.2	n.r.		n.s.	Collado y cols. <sup>58</sup>
Fase II del metabolismo	<i>GSTM1</i>	Delección	Caucásicos	92 SMD (adultos)	42	201	48	0.8	0.5-1.3	n.s.	Chen y cols. <sup>92</sup>
	<i>GSTM1</i>	Delección	Caucásicos	166 SMD (adultos)	55	112	48	0.89	0.5-1.4	n.s.	Atoyebi y cols. <sup>94</sup>
	<i>GSTM1</i>	Delección	Japoneses	116 SMD (adultos)	55	43	53	0.80	0.6-2.4	n.s.	Sasai y cols. <sup>93</sup>
	<i>GSTM1</i>	Delección	Caucásicos	232 LMA (niños)	64	153	47	2.0	1.3-3.1	0.001	Davies y cols. <sup>96</sup>
	<i>GSTM1</i>	Delección	Caucásicos	475 LMA(adultos)	54	826	49	1.24	1.0-1.6	≈ 0.05	Rollinson y cols. <sup>89</sup>
	<i>GSTM1</i>	Delección	Caucásicos	193 LMA(adultos)	43	273	47	--	----	n.s.	D'Aló y cols. <sup>50</sup>
	<i>GSTM1</i>	Delección	Caucásicos	200 LMA(adultos)	50	177	44	1.28	0.8-2.0	n.s.	Seedhouse y cols. <sup>87</sup>
	<i>GSTT1</i>	Delección	Caucásicos	92 SMD (adultos)	46	190	16	4.3	2.5-7.4	0.00001	Chen y cols. <sup>92</sup>

**Tabla 12.-** Polimorfismos y riesgo de desarrollar una LMA o SMD ("Continuación")

Vía metabólica	Gen	Polimorfismo	Grupos étnicos	Casos	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	Controles	Polimorfismo /frecuencia genotípica (%)	OR	95% IC	P	Referencias
	<i>GSTT1</i>	Delección	Caucásicos	166 SMD (adultos)	21	112	16	0.72	0.4-1.3	n.s.	Atoyebi y cols. <sup>94</sup>
	<i>GSTT1</i>	Delección	Caucásicos	174 SMD/16 t-LMA(adultos)	22	100(dona ntes de sangre)	19	$\chi^2$		n.s.	Preudhomme y cols. <sup>132</sup>
	<i>GSTT1</i>	Delección	Japoneses	116 SMD (adultos)	53	43	30	2.65	1.3-5.5	0.05	Sasai y cols. <sup>93</sup>
	<i>GSTT1</i>	Delección	Caucásicos	232 LMA (niños)	22	153	15	1.6	0.9-2.9	n.s.	Davies y cols. <sup>96</sup>
	<i>GSTT1</i>	Delección	Caucásicos	475 LMA(adultos)	19	826	15	1.32	1.0-1.8	≈ 0.05	Rollinson y cols. <sup>89</sup>
	<i>GSTT1</i>	Delección	Caucásicos	193 LMA(adultos)	29	273	19	1.7	1.1-2.7	0.02	D'Alo y cols. <sup>50</sup>
	<i>GSTP1</i>	*B	¿??	472 LMA(adultos)	13.9 (homo)	823	14 (hom)	0.94	0.7-1.3	n.s.	Rollinson y cols. <sup>89</sup>
	<i>GSTP1</i>	*B		53 LMA(adultos)	15.1	371	7	2.36	1.0-5.5	0.05	Bowden y cols. <sup>29</sup>
Radicales libres	<i>NQO1</i>	*2	Caucásicos	420 LMA y 67 LLA (adultos)	41(hom+het)	838	32(hom+het)	1.49	1.2-1.9	0.05	Smith y cols. <sup>80</sup>
Metabolismo del ácido fólico	<i>MTHFR</i>	C677T A1298C	Caucásicos	237 LMA(adultos)	29.6 (CT) 10.3 (TT) 44.5 (AC) 10.5 (CC)	377	35.2 (CT) 11.7 (TT) 43.4 (AC) 11.0 (CC)	0.73 0.84 0.99 0.95	0.5-1.1 0.4-1.6 0.7-1.5 0.5-1.8	n.s. n.s. n.s. n.s.	Skibola y cols. <sup>110</sup>

**Tabla 13.- Polimorfismos y pronóstico de la LMA**

Vía metabólica	Gen	Polimorfismo	Grupos étnicos	Evento	Casos	Controles	Comentarios	OR	95% IC	P	Referencias
Fase II del metabolismo	<i>GSTM1</i>	Delección	Blancos	SG	189 Del <i>GSTM1</i> (niños)	116 <i>GSTM1</i> normal		KM	-----	0.05	Davies y cols. <sup>96</sup>
	<i>GSTM1</i>	Delección	Caucásicos	Resistencia en inducción	51 pacientes adultos del <i>GSTM1</i> y/o del <i>GSTT1</i> con LMA	44 pacientes con <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> normales	82% de los pacientes con genotipo no deleciónado alcanzan RC vs 61 % de los que presentan las deleciones	4.7	1.2-18.1	0.02	Vosso y cols. <sup>38</sup>
	<i>GSTM1</i>	Delección	Caucásicos	SG	51 pacientes adultos del <i>GSTM1</i> y/o del <i>GSTT1</i> con LMA	pacientes con <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> normales		2.4†	1.2-4.9	0.02	Vosso y cols. <sup>38</sup>
	<i>GSTT1</i>	Delección	Blancos	SG	65 genotipo del <i>GSTT1</i> (niños)	240 <i>GSTT1</i> normal	Delección <i>GSTT1</i> reduce la supervivencia frente a <i>GSTT1</i> normal	1.6&	-----	0.02	Davies y cols. <sup>96</sup>
	<i>GSTT1</i>	Delección	Blancos	Recaída	30 genotipo del <i>GSTT1</i> (niños)	106 <i>GSTT1</i> normal	La frecuencia de recaída del final de la inducción hasta 5 años era similar tanto para <i>GSTT1</i> normal como del <i>GSTT1</i>	KM	-----	n.s.	Davies y cols. <sup>96</sup>
	<i>GSTT1</i>	Delección	Blancos	Muerte en remisión	47 genotipo del <i>GSTT1</i> (niños)	172 <i>GSTT1</i> normal	Tasa de muerte en remisión fue incrementada en pacientes del <i>GSTT1</i>	KM	-----	0.05	Davies y cols. <sup>96</sup>

IC: Intervalo de confianza; Grupos étnicos: descritos en los artículos de referencia; \*: estimado para los diferentes grupos étnicos; n.s.: no significativo; OR: odds ratio; Frecuencia polimorfismo: % (homocigoto + heterocigoto); SLE: supervivencia libre de enfermedad; SG: supervivencia global.



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Las leucemias constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias que se asocian con inestabilidad genética caracterizada por cambios cromosómicos moleculares que afectan a un 60-80% de los pacientes. Estas alteraciones adquiridas afectan a genes implicados en la diferenciación y proliferación de las células sanguíneas (*RARa*, *MLL*, *CBF*, *FLT3*) y han sido extensamente asociadas tanto con la leucemogénesis como con el pronóstico de la enfermedad<sup>133</sup>. Sin embargo, poco se conoce respecto a las alteraciones hereditarias y la susceptibilidad genética a la leucemia. Al igual que ocurre en otros cánceres, parece que el riesgo a desarrollar leucemia es una compleja interacción entre múltiples variantes genéticas de baja penetrancia, la exposición ambiental a determinados carcinógenos, la dieta y las características individuales del sistema inmune.

Estas variaciones genéticas en combinación con la exposición a tóxicos podrían conferir un mayor riesgo a desarrollar leucemia, especialmente en los niños debido a la exposición diferencial y/o inmadurez fisiológica o en pacientes con cáncer sometidos a tratamiento citotóxico intensivo.

Los cánceres secundarios se presentan en un 7% de los supervivientes de neoplasias primarias. De estos, las LS y SMD son las complicaciones más frecuentes en pacientes con enfermedades malignas tratadas con quimioterapia<sup>134</sup>. Las LS tienen una incidencia mediana acumulada a los 10 años de un 2% y los SMD de 0.8%<sup>135</sup>. Con el alargamiento de la supervivencia de los pacientes con cáncer y el incremento en el índice de curaciones se va acrecentando el interés de reducir el riesgo de padecer neoplasias secundarias al tratamiento del cáncer<sup>136</sup>.

Se ha observado que existe una desigual capacidad individual para metabolizar los carcinógenos y los sujetos con menor capacidad para desintoxicarse de químicos pueden tener un mayor riesgo de cáncer<sup>137</sup>, y por tanto una mayor susceptibilidad a las LS o SMD.

Teniendo en cuenta que alrededor de 10% de los individuos sometidos a tratamiento antineoplásico desarrollan una neoplasia secundaria, sería de gran interés identificar los posibles factores genéticos que podrían estar implicados<sup>60,138</sup>, para poder así identificar subpoblaciones de sujetos que son más susceptibles al cáncer inducido por agentes químicos.

Este conocimiento condiciona por una parte el proceso de evaluación del riesgo, y por otra el establecimiento de unos límites tolerables de exposición (que tenga en cuenta la susceptibilidad individual) y por tanto el establecimiento de unas pautas de seguimiento y diagnóstico diferenciadas en función de los genotipos de riesgo.

**La hipótesis del presente trabajo** esta basada en la posible asociación de factores genéticos y la predisposición de padecer leucemias y síndromes mielodisplásicos tras tratamiento antineoplásico. Estos factores genéticos se les suponen relacionados con los genes codificantes de los enzimas que degradan los quimioterápicos y cancerígenos.

Para ello nos planteamos el estudio de los polimorfismos genéticos en los genes del citocromo P450 (*CYP1A1\*2A*, *CYP2E1\*5B* y *CYP3A4\*1B*), de la quinona oxoreductasa (*NQO1\*2*), del glutatión s-transferasa (*delGSTM1* y *delGSTT1*) y del folato (*MTHFR C677T* y *TS 2R3R*), en tres grupos: Pacientes con LS/SMDs, con LA *de novo*, y un grupo control, analizando la incidencia de cada polimorfismo en cada grupo de estudio frente a este grupo control.

Por otra parte, se pretende investigar el valor pronóstico de los polimorfismos de estos genes en las leucemias mieloides agudas *de novo*, dado que la mayor o menor actividad de los enzimas que intervienen en la metabolización de quimioterápicos repercute sobre la eficacia del tratamiento administrado y, por tanto, en la duración de la remisión hematológica ulterior.

A través del estudio que constituye el presente trabajo de Tesis Doctoral, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

**1.** Analizar la incidencia de los polimorfismos en los genes de *Citocromo P450*, de la *quinona oxidoreductasa*, de la *glutathion S-transferasa* y de los polimorfismos más significativos del metabolismo del folato en las leucemias y síndromes mielodisplásicos secundarios al tratamiento.

**2.** Analizar estos mismos polimorfismos en las leucemias agudas *de novo*, tanto en las LMA como en las LLA.

**3.** Evaluar el riesgo conferido por los polimorfismos a desarrollar leucemia *de novo* y secundaria en pacientes sometidos a tratamiento antineoplásico.

**4.** Estudiar la asociación del polimorfismo con los parámetros clínico-biológicos.

**5.** Evaluar el significado pronóstico de los polimorfismos en la respuesta al tratamiento inicial.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1 PACIENTES

El estudio incluyó un total de 479 pacientes con LA *de novo* (317 LMA y 162 LLA) y 78 pacientes con LS a tratamiento quimioterápico (55 LMA, 20 SMD y 3 LLA,), recogidos retrospectivamente, y principalmente procedentes del Hospital Universitario La Fe y en menor cuantía en otros centros del resto de España (Tabla 14). Así mismo, se ha recogido muestra de 454 individuos sanos (grupo control de las LA *de novo*).

Los criterios de inclusión para los distintos grupos fueron los siguientes:

- Disponibilidad de ADN.
- Grupo de LA *de novo*: Diagnóstico citomorfológico e inmunofenotípico de LMA y LLA.
- Grupo de LS: Diagnóstico citomorfológico e inmunofenotípico de LMA, LLA o SMD desarrollado antes de los 15 años tras el diagnóstico del cáncer primario.
- Grupo control de LA *de novo*: Individuos sanos sin historia médica de cáncer y sin ninguna relación con los pacientes.

**Tabla 14.-** Relación de centros que participan

<b>HOSPITAL</b>	<b>CIUDAD (N)</b>
H.Universitario La Fe	Valencia (364)
H. Universitario Reina Sofia	Córdoba (74)
H.Navarra	Navarra (31)
H. Clinic i Provincial	Barcelona (29)
H.General de Alicante	Alicante (21)
H.Clínico Universitario de Salamanca	Salamanca (8)
H. Universitario Puerta del Mar	Cádiz (7)
H. General de Albacete	Albacete (7)
H. Sant Pau y Santa Creu	Barcelona (5)
H. General San Jorge INSALUD	Huesca (3)
H. General de Arrixaca	Murcia (3)
H.General	Valencia (3)
H. Dr. Peset	Valencia (2)
H. Universitario Germans Trias i Pujol	Badalona (2)
H.de Cruces	Baracaldo (1)
Hospital de Son Dureta	Son Dureta (1)
H. General de Castellón	Castellón (1)
H. General de Jerez de la Frontera	Jerez de la Frontera(1)
H. Juan Canalejo	La Coruña (1)

N: número de pacientes aportados al estudio

## 1.2 Características Clínico-Biológicas

### 1.2.1 Datos Demográficos

El grupo de 479 pacientes con LA *de novo* incluyó 317 pacientes con LMA con una mediana de edad de 47 años (rango 0.8-87), de los que 174 (54.8%) eran varones y 142 mujeres (44.7%), y 162 pacientes con LLA con una mediana de edad de 26 años (rango 1-82), de los que 102 (63.0%) eran varones y 60 (37.0%) mujeres. Por otra parte, el grupo de 78 pacientes con LS presentaba una mediana de edad de 56 años (rango 7-87), de los que 39 (50.0%) eran varones y 39 mujeres (50.0%). El grupo control incluyó 454 individuos sanos con una mediana de edad de 38 años (rango 1-85), de los que 223 (49.1%) eran varones y 231 (50.9%) mujeres (Tabla 15).

El grupo control estaba formado por voluntarios atendidos en el hospital para extracción de sangre para análisis bioquímicos y hematológicos, y que se prestaron a participar en el estudio. Los sujetos con alguna malignidad tanto hematológica como otras fueron excluidos. El consentimiento informado fue obtenido en los controles como en los pacientes según las recomendaciones de la Declaración de los Derechos Humanos, en la Conferencia de Helsinki, y también en conformidad con las regulaciones institucionales (comité ético del hospital).

Se recoge en la Tabla 15 las características clínico-biológicas de los diferentes grupos de estudio.

**Tabla 15.-** Características clínico-biológicas de los diferentes grupos de estudio

<b>Variable</b>	<b>LMA n (%)</b>	<b>LLA n (%)</b>	<b>LS n (%)</b>	<b>Control n (%)</b>
Total	317(100)	162(100)	78(100)	454(100)
Sexo				
Varón	174(54.8)	102(63.0)	39(50.0)	223 (49.1)
Mujer	142(44.7)	60(37.0)	39(50.0)	231 (50.9)
Edad				
<=18	35(11.0)	58(35.8)	2(2.6)	48(10.6)
19-40	78(24.6)	48(29.6)	9(11.5)	198(43.6)
41-50	50(15.7)	12(7.4)	11(14.1)	62(13.7)
51-60	45(14.1)	13(8.0)	18(23.1)	72(15.8)
>60	77(24.3)	20(12.3)	38(48.7)	66(14.5)
Mediana (rango)	47(0.8-87)	26(1-82)	56(7-87)	38(1-85)

### 1.2.2 Clasificación FAB

Las LMA y SMD se clasificaron según criterios FAB así en la LMA el subtipo FAB mayoritario fue M3 109/317 (34.38%) seguido de M1 y M2 con 49/317 (15.46%) cada uno y en una menor proporción el subtipo M4 con 37/317 (11.67%) (Tabla 16).

**Tabla 16.-** Clasificación FAB

FAB	LMA n (%)	LS n (%)
Indiferenciada	3(0.95)	1(1.28)
Mixta	2(0.64)	1(1.28)
Sin clasificar	3(0.95)	3(3.85)
M0	11(3.47)	6(7.69)
M1	49(15.46)	6(7.69)
M2	49(15.46)	6(7.69)
M3	109(34.38)	12(15.38)
M4	37(11.67)	6(7.69)
M5	29(9.15)	5(6.41)
M6	10(3.15)	7(8.97)
M7	4(1.26)	2(2.56)
SMD-AREB		2(2.56)
SMD-AREB-t		18(20.51)
n.c.	11(3.47)	

n.c.: no clasificado

### 1.2.3 Clasificación Inmunofenotípica

La mayoría de los pacientes tenían el inmunofenotipo LLA-B 96/162 (59.3%), seguido de LLA-T 27/162 (16.7%) (Tabla 3). En el grupo de 78 LS habían 3 LLA, 2 LLA-B (2.56%) y una Pre-B (1.28%) (Tabla 17).

**Tabla 17.-** Características inmunofenotípicas de los diferentes grupos de estudio

INMUNOFENOTIPO	LLA, n (%)	LS, n (%)
LLA-B	96(59.3)	2(2.56)
LLA-T	27(16.7)	
Pre-B	18(11.1)	1(1.28)
n.c.	12(7.4)	
LAL-Ph+	9(5.6)	

### 1.2.4 Clasificación citogenética

El grupo de LMA presentaba mayoritariamente un grupo de riesgo citogenético bajo 122/317 (39.1%) (Tabla 18). Sin embargo, el grupo de riesgo mayoritario en los grupos de LLA y LS era el grupo intermedio con 61/162 (37.7%) y 33/78 (42.3%) pacientes respectivamente (Tabla 18).

**Tabla 18.-** Características citogenéticas de los diferentes grupos de estudio

Riesgo citogenético	LMA, n (%)	LLA, n (%)	LS, n (%)
alto	17(5.4)	9(5.6)	14(17.9)
intermedio	110(35.20)	61(37.7)	33(42.3)
bajo	122(39.10)		12(15.4)
n.c.	63(20.10)	92(56.8)	19(24.4)

## 1.3 Tratamiento

### 1.3.1 Leucemias agudas *de novo*

Todos los pacientes con LMA no M3 fueron tratados con los protocolos PETHEMA ([www.aehh.org](http://www.aehh.org)) para menores de 65 años y para mayores de 65 años y los pacientes con LMA-M3 fueron tratados con los protocolos LPA-96 y LPA-99. Los pacientes con LLA fueron tratados según el grupo de riesgo: protocolo para el tratamiento de la LLA de línea B madura (Burkitt-like,

LAL3), tratamiento de la LLA de riesgo intermedio, y tratamiento de la LLA de alto riesgo en adultos.

### 1.3.2 Tratamiento del cáncer primario de las LS/SMDS

Los pacientes con LS recibieron diferentes tratamientos en el momento del diagnóstico del cáncer primario. En la Tabla 19, se recogieron los datos de estos pacientes, así como los fármacos recibidos durante el tratamiento específico.

**Tabla 19.-** Características de los pacientes con LS y tratamientos administrados según el cáncer primario

NLB	SEXO	EDAD	CÁNCER PRIMARIO	FÁRMACO	AÑOS	TIPO LS
276	M	67	cáncer de cervix	CDDP,DOX,IFF, PAC,5FU	3,36	SMD-AREBt
257	M	76	cáncer de colon	CPT-11,DACH-platinum,5FU,FA	6,97	SMD-AREBt
142	V	87	cáncer de colon	5FU	5,06	LMA no clasificada
517	V	70	cáncer de colon	5FU	1,80	SMD-AREBt
675	M	67	cáncer de colon	5FU	6,75	LMA-M0
206	V	54	EH	ABVD	8,97	LMA no clasificada
518	M	68	EH	ABVD	7,36	SMD-AREBt
573	V	68	EH	ABVD, IFMVP	6,24	LMA-M7
220	V	44	EH	C-MOPP, ABV	6,63	LLA-pre-B
575	M	37	EH	ESHAP	12,14	LMA-M6
449	V	76	cáncer de estómago	5FU	1,90	SMD-AREBt
522	V	80	cáncer intestinal	IFF, Mesna	5,73	SMD-AREBt
530	V	79	cáncer de laringe	CDDP,5FU	0,53	LMA-M2
585	M	73	cáncer de mama	AC	1,00	LLA-B
700	M	62	cáncer de mama	AC	8,00	LMA-M3
591	M	50	cáncer de mama	DOX	11,59	LMA-M1
520	M	49	cáncer de mama	EPI, PAC	1,52	LMA-M5b
570	M	62	cáncer de mama	EPI,CPM,5FU,MTX	3,83	LMA-M3
216	M	44	cáncer de mama	FAC	3,11	LMA-M2
577	M	63	cáncer de mama	FAC	6,01	LMA-M6
593	M	59	cáncer de mama	FAC	2,50	L indiferenciada
676	M	40	cáncer de mama	FAC, TAM	3,08	SMD-AREBt

**Tabla 19.-** Tipos de LS y tratamientos administrados según el cáncer primario (“Continuación”)

NLB	SEXO	EDAD	CÁNCER PRIMARIO	FÁRMACO	AÑOS	TIPO LS
218	M	40	cáncer de mama	FCM	5,36	LMA-M4
310	M	75	cáncer de mama	FCM	7,13	SMD-AREBt
437	M	57	cáncer de mama	FCM	3,42	LMA-M3
438	M	53	cáncer de mama	FCM	6,82	LMA-M3
439	M	51	cáncer de mama	FCM	2,19	LMA-M3
527	M	60	cáncer de mama	FCM	2,80	LMA-M3
581	M	64	cáncer de mama	FCM	2,80	LMA-M5
579	M	49	cáncer de mama	FEC	3,59	LMA-M5
589	M	62	cáncer de mama	FEC	3,94	LMA-M6
592	M	64	cáncer de mama	FEC	3,92	LMA-M3
141	M	62	cáncer de mama	IDA, Ara-C, VP-16	2,21	LMA-M3
583	M	39	cáncer de mama	MMM	3,74	LMA-M3
526	M	54	cáncer nasofaríngeo	CDDP,5FU,AF	13,72	SMD-AREBt
521	M	72	cáncer de ovario	CBDCA,PAC	2,83	SMD-AREBt
529	M	59	cáncer de ovario	CBDCA,PAC	1,61	LMA-M2
516	V	50	cáncer de pulmón	ABVD	1,16	SMD-AREBt
146	V	65	cáncer de pulmón	VP-16,CDDP	1,12	LMA-M4 con eosinofilia
524	V	59	cáncer de pulmón	VP-16,CDDP	3,56	SMD-AREBt
447	V	24	cáncer testicular	CDDP, VP-16	0,50	LMA-M5
217	M	69	cáncer de útero	CPM,CBDCA	2,94	LMA-M6
580	M	59	LA	DNR, Ara-C, DHAD, HDAC	7,70	LMA-M0
445	V	15	LLA-T	VCR, DNR, L-ASA, MTX, Ara-C, CPM, DHAD, VP-16; VM-26, VCR, PRED	2,86	LMA-M0
148	M	66	LMA-M2	IDA, Ara-C, VP-16	0,63	LMA-M5
586	V	73	LNH	ASHAP, BACOS, MINE	4,87	LMA-M1
578	V	41	LNH	ASHAP/BACOS, MINE-Rituximab	3,88	LMA-M6
582	V	59	LNH	ATT	4,59	LMA-M1
151	V	54	LNH	ATT, FCM	4,16	LMA-M0
673	V	49	LNH	BEACOP-B	12,56	LMA-M0
143	V	64	LNH	CAB	5,64	SMD-AREBt
139	V	65	LNH	CHOD, CHOP-B, VAMD	1,92	Bifenotípica
145	M	57	LNH	CHOP, FCM	8,84	LMA-M3
140	M	51	LNH	CHOP, MINE, ESHAP	1,42	LMA-M4
6033	M	30	LNH	CHOP	3,27	LMA-M4 con eosinofilia
701	V	76	LNH	CHOP, CVP, FMD	2,72	LMA-M0
574	M	58	LNH	CHOP,HyperCVAD, MTX, Ara-C	6,39	LMA no clasificada

**Tabla 19.-** Tipos de LS y tratamientos administrados según el cáncer primario ("Continuación")

NLB	SEXO	EDAD	CÁNCER PRIMARIO	FÁRMACO	AÑOS	TIPO LS
451	V	55	LNH	CHOP, MINE, ESHAP	6,75	SMD-AREBt
588	V	42	LNH	CHOP-B/VAMD, FMD, MINE-Rituximab	9,96	LMA-M6
144	M	63	LNH	CHOP/VIA, PRED, VP-16, IFF, Ara-C	3,83	LMA-M3
264	V	63	LNH	COP, CAB	6,26	SMD-AREBt
680	V	38	LNH	COP-BLAM/IMVP	2,33	LMA-M3
287	V	41	LNH	CPM, DHAD, VCR, PRED	3,19	LMA-M1
147	V	35	LNH	CPM, DOX, VM26, VP16, IFF, Ara-C, B CNU, L-PAM	4,25	SMD-AREB
149	V	41	LNH	CPM, VCR, PRED, CAB	7,70	LMA-M4
182	V	68	LNH	NOSTE, CHOP	6,75	LMA-M2
515	V	41	LNH	CPM, DHAD, VCR, PRED	3,43	LMA-M1
584	V	60	LNH	FMD/FC, HyperCAVAD	2,62	LMA-M6
672	V	66	LNH	MegaCHOP, ESHAP, FCM	3,17	LMA-M2
674	V	56	LNH	PROMACE-MOOP, MiniBEAM-ESHAP	7,17	SMD-AREBt
679	M	65	LNH	VECPOB, MiniBEAM-ESHAP, PM, COP	9,05	SMD-AREBt
514	V	72	MM	L-PAM	9,91	LLA-B
677	V	63	MM	VBCMP, VBAP	2,17	LMA-M1
576	V	64	MM	VCMP, VBAP, HyperCVAD/AM	4,26	LMA-M7
250	V	28	Sarcoma Ewing	CMP, DOX, VCR	6,93	LMA-M2
6038	V	7	Sarcoma Ewing	VP-16, EPI, DOX, IFF	3,10	LMA-M4
274	M	52	Sarcoma intracraneal	IDA, Ara-C	9,06	SMD-AREB
450	V	22	tumor germinal mediastínico	BLEO, VP-16, CDDP	1,10	SMD-AREBt

NLB: número de laboratorio; V: varón; M: mujer; EH: Enfermedad de Hodgkin, LNH: linfoma no Hodgkin; LA: leucemia aguda; Años: años transcurridos entre el diagnóstico del cáncer primario y el de la LS; MM: Mieloma múltiple; las siglas de los tratamientos se encuentran en el anexo.

## 2 MÉTODOS

En cada grupo, de acuerdo con los criterios antes indicados, se procedió a la obtención de una muestra de sangre o de médula ósea para extracción de ADN sobre el que se procedió a realizar los siguientes estudios de polimorfismos genéticos (Tabla 20).

**Tabla 20.-** Método de detección de cada polimorfismo estudiado

<b>Polimorfismo</b>	<b>Cambio en la secuencia de ADN</b>	<b>Método de detección</b>
<b>CYP1A1*2A</b>	T6235C (3' UTR)	PCR en tiempo real
<b>CYP3A4*1B</b>	-A290G (región promotora)	PCR en tiempo real
<b>CYP2E1</b>	-C1019T (región promotora)	PCR en tiempo real
<b>NQO1</b>	C609T	PCR en tiempo real
<b>delGSTM1</b>	delección homocigota	PCR convencional
<b>delGSTT1</b>	delección homocigota	PCR convencional
<b>MTHFR</b>	C677T	PCR en tiempo real
<b>TS</b>	dobles (2R) y/o triples repeticiones (3R) de 28 pb	PCR convencional

## 2.1 Reactivos y soluciones

### 2.1.1 Reactivos para la detección de los polimorfismos

dNTP (dCTP, dTTP, dGTP y dATP) (Pharmacia); AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), DNA Master Mix Hybridization Probes Fast Start (Roche), DNA Master Mix Hybridization Probes (Roche). Tanto los cebadores como las sondas, han sido sintetizados por TIB MOLBIOL (Berlin, Alemania).

### 2.1.2 Reactivos empleados en la electroforesis de agarosa

Agarosa MP (Boehringer Mannheim), Agarosa NuSieve 3:1 (FMC), Bromuro de etidio (Sigma), Azul de bromofenol (Merck), Tris (Panreac), cloruro sódico (Carlo Erba), hidróxido, EDTA (Prolabo), ácido bórico (Merck). Marcadores de tamaños moleculares:  $\phi$ X174 DNA- Hinf I digest (MBI Fermentas).

### 2.1.3 Soluciones

En la siguiente tabla (Tabla 21) se enumeran las soluciones empleadas en la extracción de ADN genómico leucocitario.

**Tabla 21.-** Soluciones empleadas en la extracción de ADN genómico leucocitario

Soluciones	Composición
Solución de lisis de eritrocitos	Tris-HCl mM, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, pH=7,5
Solución salina fisiológica	0,15 M
Tampón de lisis	Tiocianato de guanidio/Triton X-100
Buffer I	Guanidio HCl/Etanol
Buffer II	Etanol
Proteinasa K	

### 2.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de sangre periférica o médula ósea se realizó mediante dos técnicas, una manual a partir del Kit UltraClean DNA Blood Isolation y en otros casos de forma automatizada con el sistema MagNapore LC con el kit DNA Isolation Kit - Large Volume (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Penzberg, Alemania). En algunos casos se realizó previamente una lisis de hematíes y se recogieron los leucocitos mediante centrifugación. La preparación de muestras leucocitarias se realizó a partir de 5-10 ml de sangre anticoagulada con EDTA o bien de médula ósea, a los que se le añadió el mismo volumen de tampón de lisis y se incubó a 4°C durante 15 minutos para que se efectuara la hemólisis. A continuación se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 5 minutos a 15-16°C con el objetivo de sedimentar los leucocitos. Se resuspendió el pellet leucocitario con 7 ml de tampón de lisis y se incubó unos 7 minutos a 4°C para que se completara la hemólisis. Se centrifugó de nuevo como en el paso anterior y se resuspendió el pellet en 5 ml de solución salina fisiológica

estéril. Después de centrifugar a 2000 r.p.m. durante 5 minutos se resuspendió de nuevo el pellet con la solución salina. Se guardó una alícuota de 600 µl a -30°C para la extracción de ADN.

### 2.3 Métodos de detección de los polimorfismos genéticos

Los métodos para la detección de los polimorfismos *CYP1A1\*2A*, *CYP3A4\*1B*, *CYP2E1\*5B*, *NQO1\*2* y *MTHFR C677T* se basaron en el empleo de sondas marcadas fluorescentemente en el sistema LightCycler (LC) (Roche) con el kit LightCycler DNA Master Hybridization Probes. El volumen final del mix fue de 10 µl, de los cuales 1 µl de LC DNA Master Hybridization Mix. La detección del polimorfismo se hizo por discriminación alélica basándose en curvas de fusión (o *melting*).

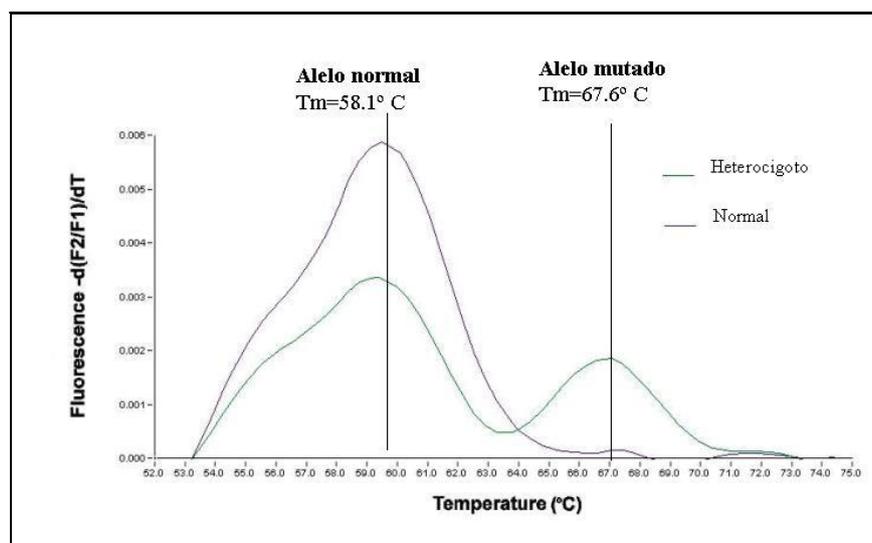
Los métodos de detección de los polimorfismos *delGSTM1*, *delGSTT1* y *TS2R3R*, se basaron en la amplificación del producto por PCR convencional y se testó la reacción en un gel de agarosa.

- **POLIMORFISMO *CYP1A1\*2A***

El polimorfismo *CYP1A1\*2A* [OMIM:108330] se detectó con el método descrito por Harth y cols<sup>139</sup>. La reacción contenía 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM de cada cebador y 0.2 µM de cada sonda de hibridación. Se desnaturalizó previamente a 95°C durante 10 minutos y a continuación se realizaron 50 ciclos de amplificación consistentes en 3 segundos a 95°C (desnaturalización), 15 segundos a 55°C (hibridación) y 18 segundos a 72°C (elongamiento). Las curvas de fusión se han obtenido a partir de una

temperatura inicial de 45°C a una temperatura final de 80°C con un incremento de temperatura de 0.1°C/s.

El cebador sentido 1A1 MSP-F (gi: 13430063; nts 4662-4683) y el cebador antisentido 1A1 MSP-R (gi: 13430063; nts 4434-4408) amplificaron un fragmento de 275 pb. La sonda sensor 1A1 MSPS (gi: 13430063; nts 4480-4502) (FL, fluoresceína) fue diseñada para unirse específicamente al alelo mutado y se unió a una distancia de 3 bases 3' de la sonda anchor 1A1 MSPA (gi: 13430063; nts 4451-4477) (LCR, LighCycler-red640) (Tabla 21). Por tanto la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) del híbrido sonda/ADN fue mayor en el caso del alelo mutado ( $67.6 \pm 0.2^\circ \text{C}$ ) que para el alelo normal ( $58.1 \pm 0.3^\circ \text{C}$ ) (Figura 5).



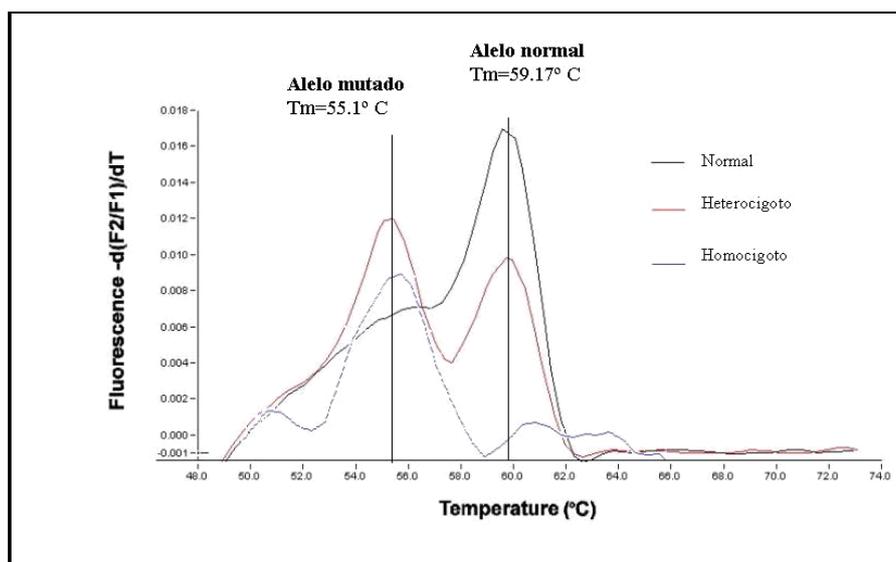
**Figura 5:** Curvas de fusión obtenidas para la detección del alelo mutado CYP1A1\*2A y el alelo normal. El análisis de la primera derivada negativa de fluorescencia  $[-d(F_2)/dT]$  en función de la temperatura muestra que el alelo mutado tiene una  $T_m$  más alta que el alelo normal y por lo tanto el individuo normal (curva morada) presenta solo un pico con la  $T_m$  del alelo normal y que el individuo heterocigoto (curva verde) presenta la  $T_m$  del alelo normal y la del alelo mutado.

#### • POLIMORFISMO CYP2E1\*5B

La detección de este polimorfismo se realizó mediante el método de PCR en tiempo real de Choi y cols.<sup>140</sup>. El protocolo de la PCR se basó en el empleo de 2.5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.4  $\mu\text{M}$  de cada cebador y 0.15  $\mu\text{M}$  de cada sonda de hibridación. Después de una desnaturalización inicial de 5 segundos a  $95^\circ\text{C}$ , fueron necesarios 45 ciclos con una etapa de desnaturalización de 5 segundos a  $95^\circ\text{C}$ , de hibridación de 20 segundos a  $55^\circ\text{C}$  y de elongamiento de 25 segundos a  $72^\circ\text{C}$ . Las curvas de fusión se han obtenido a partir de una temperatura inicial de  $45^\circ\text{C}$  a una temperatura final de  $80^\circ\text{C}$  con un incremento de temperatura de  $0.1^\circ\text{C/s}$ .

Los cebadores sentido Primer se (gi: 219567; nts: 264-285) y antisentido Primer as (gi: 219567; nts 528-507) amplificaron un fragmento de 265 pb al que se unió la sonda sensor Rsa sensor que se hibridó

específicamente con el alelo normal (gi: 219567; nts 353-388) y se situó 1 base 5' de la sonda anchor Rsa anchor (gi:219567; nts 390-424) (Tabla 21). Por tanto el análisis de las curvas de fusión generó una  $T_m$  de  $59.2 \pm 0.2^\circ \text{C}$  para el alelo normal y una de  $55.1 \pm 0.1^\circ \text{C}$  para el alelo con el polimorfismo (Figura 6).



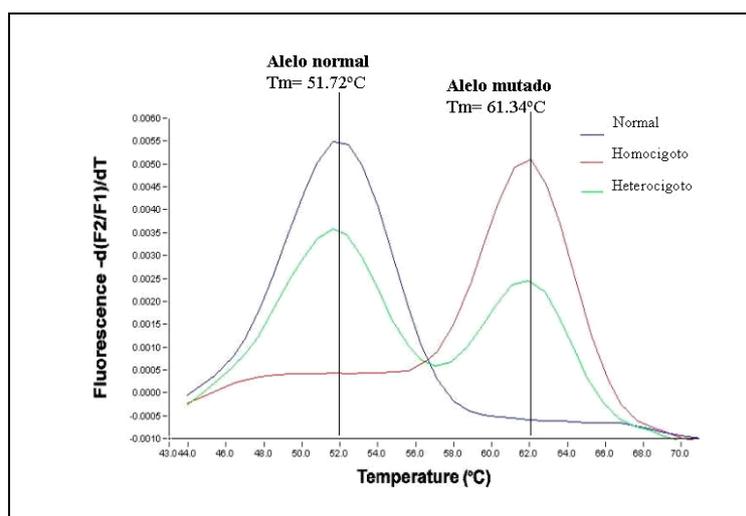
**Figura 6:** Curvas de fusión de cada genotipo correspondiente al gen *CYP2E1*.

#### • **POLIMORFISMO *CYP3A4\*1B***

Para la detección de este polimorfismo se ha empleado el método de PCR en tiempo real de Von Ahsen et al 2001<sup>141</sup>. La reacción de PCR contenía 3mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{M}$  de cada cebador y 0.225  $\mu\text{M}$  de cada sonda de hibridación. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 10 minutos a  $95^\circ\text{C}$ , 45 ciclos con una desnaturalización a  $95^\circ\text{C}$  durante 5 segundos, hibridación de 10 segundos a  $55^\circ\text{C}$ , y un elongamiento de 15 segundos a  $72^\circ\text{C}$ . Las curvas de fusión se han obtenido a partir de una temperatura inicial de  $40^\circ\text{C}$  a una temperatura final de  $75^\circ\text{C}$  con un incremento de temperatura de  $0.2^\circ\text{C/s}$ .

El cebador sentido 3A4-F (gi:219569;535-554) y el cebador antisentido 3A4-R (gi:219569;961-941) amplificaron un fragmento de 427

pb. La sonda sensor 3A4[G]mt (gi: 219569;nts 827-809) se unió específicamente al sitio polimórfico y se situó a una distancia de 3 bases en 5' de la sonda anchor 3A4 anchor (gi:219569;nts 861-831) (Tabla 21). Las curvas de melting obtenidas tras la PCR permitieron distinguir el alelo normal ( $T_m=51.72\pm 0.1^\circ\text{C}$ ) y el alelo mutado ( $T_m=61.34\pm 0.1^\circ\text{C}$ ) (Figura 7).

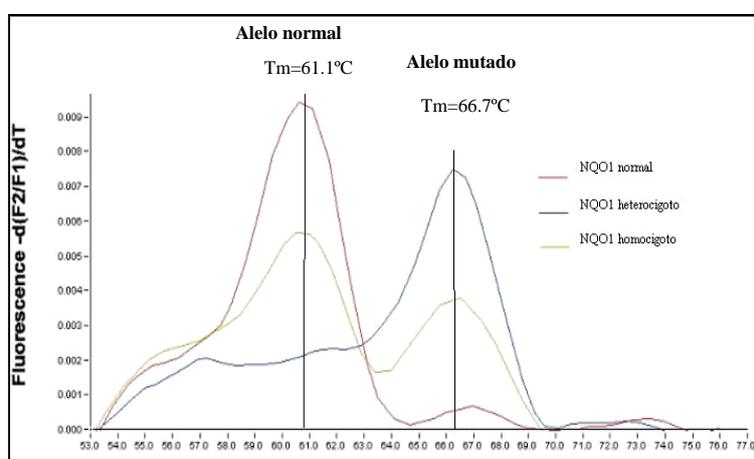


**Figura 7:** Curvas de fusión de cada genotipo correspondiente al gen CYP3A4.

#### • POLIMORFISMO *NQO1\*2*

El polimorfismo *NQO1\*2* se detectó según el método de Harth y cols.<sup>142</sup>. La concentración de  $\text{MgCl}_2$  empleada ha sido de  $4\text{mM}$ ,  $0.5\mu\text{M}$  de cada cebador y  $0.15\mu\text{M}$  de cada sonda de hibridación. El programa de PCR comenzó con una desnaturalización de 2 minutos a  $95^\circ\text{C}$  y a continuación durante los 45 ciclos de amplificación se produjo una desnaturalización de 3 segundos a  $95^\circ\text{C}$ , una hibridación de 10 segundos a  $55^\circ\text{C}$  y un elongamiento de  $25^\circ\text{C}$  a  $72^\circ\text{C}$ . Las curvas de fusión se han obtenido a partir de una temperatura inicial de  $45^\circ\text{C}$  a una temperatura final de  $80^\circ\text{C}$  con un incremento de temperatura de  $0.1^\circ\text{C/s}$

Los cebadores sentido NAD-F (gi:189290; nts 5-27) y antisentido NAD as (gi:189290; nts 304-282) amplificaron un fragmento de 128 pb en el que hibridó la sonda sensor NQO1[C]wt (gi:189290; nts 177-206) que se unió al alelo normal y a una distancia de 2 bases en 3' se situó la sonda anchor NQO1 anchor (gi:189290; nts 209-231) (Tabla 21). Las curvas de fusión generaron un  $T_m = 61.1^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$  para el alelo normal y un  $T_m = 66.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$  para el alelo con el polimorfismo. (Figura 8).

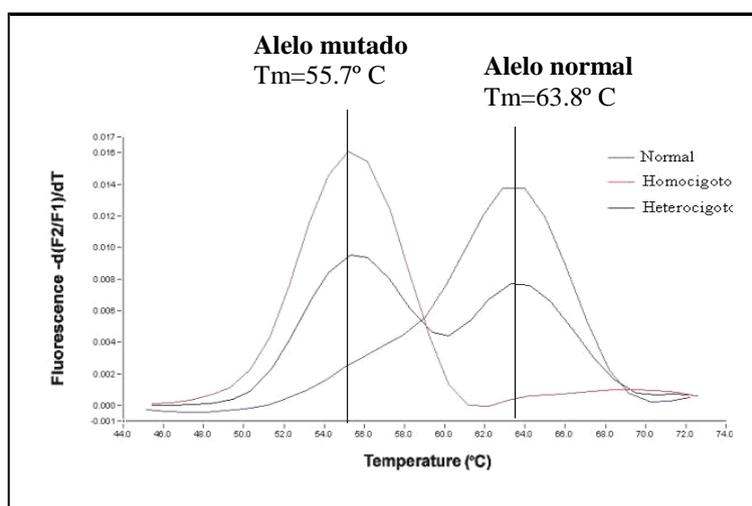


**Figura 8** Curvas de fusión de cada genotipo correspondiente al gen NQO1.

- **MTHFR C677T**

Para la detección del polimorfismo *MTHFR* C677T se ha empleado el método diseñado por Roche, basado en PCR en tiempo real, empleando las sondas MTHFR LC (gi:4336810; nts 590-619) marcada Red640 en 5' y MTHFR 3FL (gi:4336810; nts 622-640) marcada con fluoresceína en 3' y los cebadores MTHFR s (gi:4336810; nts 569-591) y MTHFR as (gi:4336810; nts 801-782) (Tabla 21). El método generó un  $T_m$  de  $55.7 \pm 0.2^\circ\text{C}$  para el alelo con el polimorfismo y de  $63.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$  para el alelo normal (Figura 9).

Los 10  $\mu\text{l}$  de PCR contenía 4mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{M}$  de cada cebador y 0.2  $\mu\text{M}$  de cada sonda de hibridación. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, 45 ciclos con una desnaturalización a 95°C durante 5 segundos, hibridación de 10 segundos a 55°C, y un elongamiento de 15 segundos a 72°C. Las curvas de fusión se han obtenido a partir de una temperatura inicial de 40°C a una temperatura final de 85°C con un incremento de temperatura de 0.2°C/s.



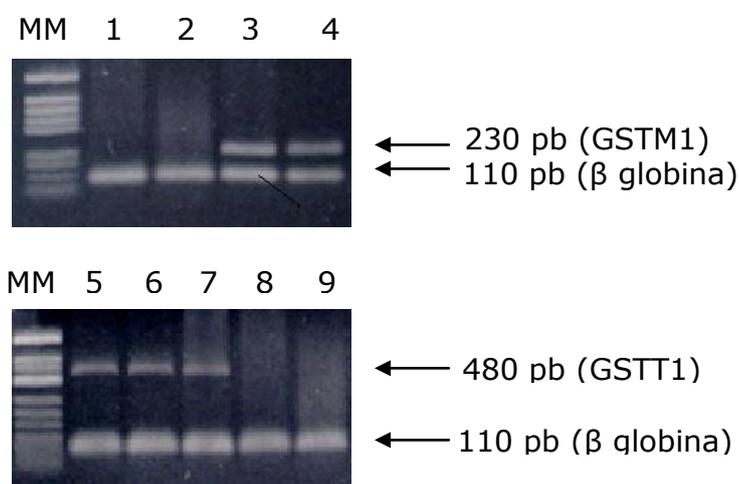
**Figura 9:** Curvas de fusión de cada genotipo correspondiente al gen MTHFR.

#### • POLIMORFISMO *delGST*

La detección de los polimorfismos en los genes *GSTT1* y *GSTM1* se ha realizado siguiendo el método descrito por Naoe y cols.<sup>55</sup>. Además del gen diana (*GSTM1* o *GSTT1*) en la PCR se coamplificó un gen control ( $\beta$  globina). La PCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  que contenía 2.5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{M}$  de cada cebador y 1.25 U de la AMpliTaq Gold (Applied Biosystems). El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, a continuación durante 40

ciclos se repitió una desnaturalización de 45 segundos a 94°C, una hibridación de 45 segundos a 55°C y un elongamiento de 45 segundos a 72°C, y un elongamiento final de 10 minutos a 72°C. Se testó la reacción en un gel de agarosa 1.5%.

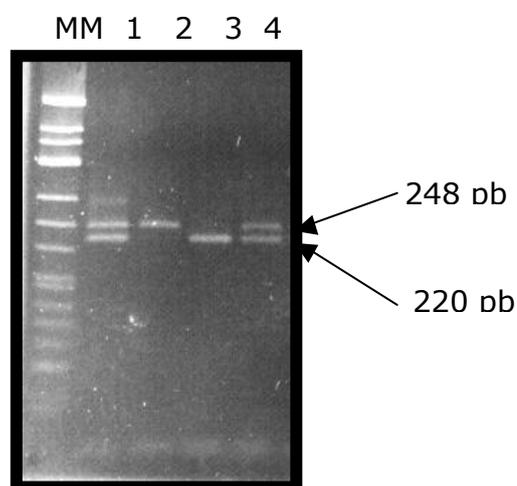
Para *GSTM1*, los cebadores sentido *GSTM1-F* (gi:4731668; nts 23663-23684) y antisentido *GSTM1-R* (gi:4731668; nts 23467-23487) amplificaron un fragmento de 230 pb, mientras que los cebadores específicos del gen *GSTT1*, *GSTT1-F* (gi:4731668; nts 23663-23684) y *GSTT1-R* (gi:4731668; nts 23467-23487) amplificaron un fragmento de 480 pb (Figura 10) (Tabla 21). En las dos reacciones de PCR, se amplificó también un fragmento de 110 pb del gen de la  $\beta$ -globina [OMIM:141900] con los cebadores sentido *BETA-F* (gi:455025; nts 62150 -62169) y antisentido *BETA-R* (gi:455025; nts 62240 -62259) (Figura 10) (Tabla 21).



**Figura 10:** Testado en agarosa MP 1,5%, 5  $\mu$ l de producto de PCR con el marcador *PHI X174 DNA/HINFI MARKER* (FERMENTAS). La delección del gen *GSTM1* o *GTT1* se interpreta por la ausencia de la banda de 230 pb o 480 pb respectivamente y la presencia del gen control interno de la  $\beta$  globina. MM: marcador de pesos moleculares; 1-2: delección del gen *GSTM1*; 3-4: presencia del gen *GSTM1*; 5-7: presencia del gen *GSTT1*; 8-9: delección del gen *GSTT1*.

- **POLIMORFISMO TS 2R/3R**

La detección de las repeticiones en tandem se realizó según el método descrito por Villafranca y cols. (2001)<sup>143</sup> que consistió en el empleo de los cebadores TS-F (gi: 21728142, nts 85209-85228) y TS-R (gi:21728142; nts 85450-85422) (Tabla 21) que amplificaron un fragmento de 220 pb en el caso del alelo 2R y 248 pb en el caso de que se trate de un 3R (Figura 11).



**Figura 11:** Testado en agarosa Nusieve 3:1 al 2,5%, 10  $\mu$ l de producto de PCR con el marcador de pesos moleculares PHI X174 DNA/HINFI MARKER (FERMENTAS) (MM). La presencia de la banda de 220 pb corresponde a un individuo homocigoto 2R2R (3), la presencia de la banda de 248 pb corresponde a un individuo homocigoto 3R3R (2) y un individuo heterocigoto 2R3R (1,4) presenta ambas bandas.

**Tabla 22.-** Cebadores empleados para la detección de cada polimorfismo

CYP1A1 (Número de acceso # AF253322)					
	Secuencias (5'→3')	Posición	Tamaño	%CG	Tm(°C)
<b>Cebadores</b>					
1A1MSPF	CCTgAACCCCATTCTgTgTTg	4662-4683	21	52.4	58.9
1A1MSPR	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAg CTgTg	4434-4408	26	15.4	57.7
<b>Sondas</b>					
1A1MSPS	CACCTCCCIggCTCACACgATT -F	4480-4502	22	59.1	64.1
1A1MSPA	LCRed640- CCACCTCAgCCTCTgAgTAGT gggg-ph	4451-4477	26	61.5	67.7
CYP2E1 (Número de acceso # D10014)					
<b>Cebadores</b>					
Primer se	AgAATggCATAACTCAAATCC	264-285	22	36.4	53.0
Primer as*	CAGACCCTCTTCCACCTTCTA T	528-507	22	50.0	55.2
<b>Sondas</b>					
Rsa Sensor wt	CATAAAgATTCATTgTTAATAT AAAAGTACAAAATT-F	353-388	36	16.7	56.9
Rsa Anchor	LCRed640- CAACCTATgAATTAgAACTTC TATATATTgCCAg-ph	390-424	35	31.4	60.5
CYP3A4 (Número de acceso # D11131)					
<b>Cebadores</b>					
3A4-F	AACAggCgTggAAACACAAT	535-554	20	45.0	57.6
3A4-R	CCACTCACTgACCTCCTTTgA	961-941	21	52.4	56.4
<b>Sondas</b>					
3A4 anchor	CTCAAgTggAgCCATTggCATA AAATCTATT-F	831-861	31	38.7	65.0
3A4 [G]mt	LCRed640- TCgCCTCTCTCCTgCCCTT-ph	809-827	19	63.2	61.3
NQO1 (Número de acceso # M81600)					
<b>Cebadores</b>					
NAD-F	GAgACgCTAgCTCTgAACTgAT T	5-27	23	47.8	55.6
NAD as	AgCAAATACAgTggTgTCTCA T	304-282	23	39.1	54.4
<b>Sondas</b>					
NQO1[C]wt	TCCAAGTCTTAgAACTgACATA TT-F	177-206	24	36.7	58.1
NQO1 anchor	LCRed640- ATTgggCACACTCCAgCAgACg C-ph	209-230	23	60.9	66.8

**Tabla 22.-** Cebadores empleados para la detección de cada polimorfismo ("Continuación")

GSTM1 (Número de acceso # AC000032)					
Cebadores					
GSTM1-F	gAACTCCCTgAAAAGCTAAAgC	23663-23684	22	45.0	69.0
GSTM1-R	gTTgggCTCAAATATACggTgg	23487-23467	22	50.0	71.0
GSTT1 (Número de acceso # Z84718)					
Cebadores					
GSTT1-F	TTCCTTACTggTCCTCACATCT C	15204-15226	23	47.0	72.0
GSTT1-R	TCACCggATCATggCCAgCA	25662-15643	20	60.0	72.0
β-GLOBINA (Número de acceso # U01317)					
Cebadores					
BETA-F	ACACAAGTgTgTTCAGTAgC	62150-62169	20	45.0	66.0
BETA-R	CAACTTCATCCACgTTCACC	62259-62240	20	50.0	68.0
MTHFR (Número de acceso # AF105980)					
Cebadores					
MTHFR s	CgAAgCAGggAgCTTTgAggCT g	569-591	23		67.0
MTHFR as	AggACggTgCggTgAgAgTg	801-782	20		63.0
Sondas					
MTHFR 3FL	TgAccTgAAgCACTTgAAggAgA AggTgTC X	590-619	30		67.6
MTHFR LC	LCred640- CgggAgCCgATTTCATCAT-ph	622-640	19		58.7
TYMS (Número de acceso # AP001178)					
Cebadores					
TS-F	gTggCTCCTgCgTTTCCCCC	85209-85228	20	70	67.0
TS-R	CCAAGCTTggCTCCgAgCCggC CACAggCATggCgCgg	85450-85422	38	73.7	90.8

## 2.4 Análisis estadístico

La asociación de los diferentes polimorfismos con el riesgo de padecer la enfermedad se ha examinado con el análisis de regresión logística para calcular los odds ratios (OR) y sus intervalos de confianza del 95% (IC). Las frecuencias esperadas de cada polimorfismo dentro del grupo control se han analizado con el test de equilibrio de Hardy-Weinberg. La presencia de los

polimorfismos y las variables dicotómicas fueron comparados con la prueba  $\chi^2$  de Pearson y el test exacto de Fisher (FET). Los análisis del tiempo transcurrido hasta el evento se realizaron por el método de Kaplan Meier<sup>144</sup> y con la prueba de rango logarítmico para las comparaciones<sup>145</sup>. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia de recaída (SLR) se calcularon desde la fecha de remisión completa (RC). En el análisis de SLE, la recaída y la muerte fueron consideradas eventos no censurados, cualquiera ocurriendo primero. Para SLR, la recaída en RC fue considerada como evento no censurado. El análisis multivariado fue realizado a partir del modelo de riesgo proporcional de Cox<sup>146</sup>. Todos los tests fueron bilaterales y los valores de P menores de 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Se ha utilizado el programa estadístico SPSS 11.0 (Chicago, IL) para los cálculos automatizados.

# **RESULTADOS**



En el caso de las leucemias agudas *de novo*, la existencia de las variaciones genéticas junto con una serie de factores condicionantes como pueden ser los efectos de la dieta, la exposición ambiental a carcinógenos y las características del sistema inmune de cada individuo, podría predisponer al desarrollo de la leucemia aguda. En el caso de las leucemias secundarias a tratamiento quimioterápico, estas variantes podrían explicar las diferencias interindividuales en la metabolización de agentes químicos y podrían ser considerados como factores de riesgo de baja penetrancia en el desarrollo de malignidades secundarias. A continuación se analiza la incidencia de los polimorfismos genéticos en enzimas metabolizantes, en un grupo de SMDS/LS, LMA y LLA, la implicación de cada uno de ellos en el riesgo de desarrollar una leucemia aguda y también su implicación en la respuesta al tratamiento en las leucemias mieloides agudas *de novo*.

## **1 GRUPO CONTROL**

En la Tabla 23 se recoge la incidencia de los polimorfismos en un grupo control formado por 454 individuos sanos. Las frecuencias genotípicas de los polimorfismos del GC cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg.

**Tabla 23.-** Incidencia de los polimorfismos en el grupo control

Polimorfismo Genotipo	N/Total (%)	P
<b>CYP1A1*2A</b>		
<b>Heterocigoto</b>	84/403 (20.8)	0.151
<b>Homocigoto</b>	2/403 (0.5)	
<b>CYP2E1*5B</b>		
<b>Heterocigoto</b>	23/390 (5.9)	0.548
<b>CYP3A4*1B</b>		
<b>Heterocigoto</b>	29/357 (8.1)	0.424
<b>delGSTM1<sup>†</sup></b>		
<b>Homocigoto</b>	232/451 (51.4)	0.981
<b>delGSTT1<sup>†</sup></b>		
<b>Homocigoto</b>	61/445 (13.7)	0.895
<b>NQO1*2</b>		
<b>Heterocigoto</b>	160/447 (35.8)	0.422
Homocigoto	19/447 (4.3)	
<b>MTHFR</b>		
<b>Heterocigoto</b>	160/331 (48.3)	0.74
Homocigoto	65/331 (19.6)	
<b>TYMS</b>		
<b>2R/3R</b>	162/347 (46.7)	0.38
3R/3R	117/347 (33.7)	

<sup>†</sup>: los individuos heterocigotos se han considerado junto con los normales.

## **2 LEUCEMIAS/SINDROMES MIELODISPLASICOS SECUNDARIOS**

### **2.1 Características demográficas y clínicas y polimorfismos genéticos**

El grupo de LS/SMDS estaba formado por 78 pacientes, con el mismo número de varones que de mujeres, con una mediana edad de 55.9 (rango 7-87) años (Tabla 24).

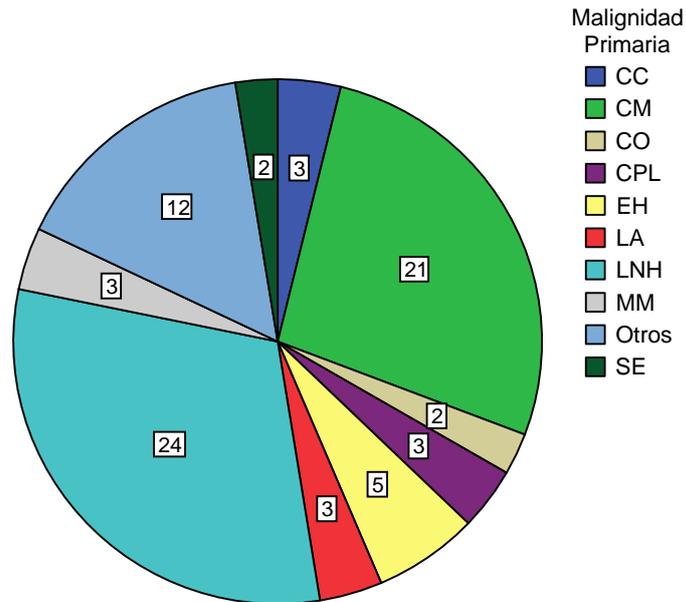
La mediana de tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento de la neoplasia maligna primaria hasta la aparición de LS fue de 3.9 años (rango 0.5-13.7) y de 5.7 años (rango 1.1-13.7) para los SMDS. Atendiendo a la neoplasia primaria, la mediana de tiempo para el LNH fue de 4.2 años (rango 1.42-12.56), para el CM de 3.6 años (rango 1-11.59), y para la enfermedad de Hodgkin (EH) de 7.4 años (rango 6.24-12.14) (Tabla 24).

La neoplasia primaria más frecuente fue el LNH (24/78; 30.7%) seguido del CM (21/78; 26.9%) (Tabla 24 y Fig.12).

**Tabla 24.- Características de los pacientes con SMDS/LS**

	<b>Pacientes N (%)</b>	<b>Tiempo de latencia en años mediana(rango)</b>
<i>Total pacientes</i>	78(100)	3.9(0.5-13.7)
<b>Edad al diagnóstico en años Mediana(rango)</b>	55.9(7-87)	
<b>Sexo</b>		
Varones	39(50.0)	
Mujeres	39(50.0)	
<b>Malignidad primaria</b>		
LNH	24(30.7)	4.2(1.4-12.6)
CM	21(26.9)	3.6(1-11.6)
EH	5(6.4)	7.4(6.2-12.1)
CC	3(3.9)	6.8(1.8-6.9)
CP	3(3.9)	1.16(1.1-3.6)
LA	3(3.9)	2.9(0.6-7.7)
SE	2(2.6)	5.0(3.1-6.9)
CO	2(2.6)	2.2(1.6-2.8)
MM	3(3.9)	4.2(2.2-9.9)
Otras malignidades	12(15.4)	4.3(0.5-13.7)

CM: cáncer de mama; CC: cáncer de colon; SE: sarcoma de Ewing; EH: enfermedad de Hodgkin; LA: leucemia aguda; CP: cáncer de pulmón; LNH: linfoma no Hodgkin; MM: mieloma múltiple; CO; cáncer de ovario.



**Figura 12:** Incidencia de los tumores primarios en los 78 pacientes con SMDS/LS.

CC: cáncer de colon; CM: cáncer de mama; CO; cáncer de ovario; CPL: cáncer de pulmón; EH: enfermedad de Hodgkin; LA: leucemia aguda; LNH: linfoma no Hodgkin; MM: mieloma múltiple; SE: sarcoma de Swing.

La mayoría de los pacientes recibieron una combinación de varios agentes antineoplásicos para tratar la neoplasia primaria. Las dos combinaciones más frecuentes fueron para el cáncer de mama: 5FU, CPM y MTX, y para el LNH: CPM, ADR, VCR y PRED. Los tratamientos de las LS y los SMDS, consistieron en agentes alquilantes, antibióticos antimetabolitos y antineoplásicos como las antraciclinas y los alcaloides de la vinca, y minoritariamente en agentes del platino e inhibidores de la topoisomerasa II.

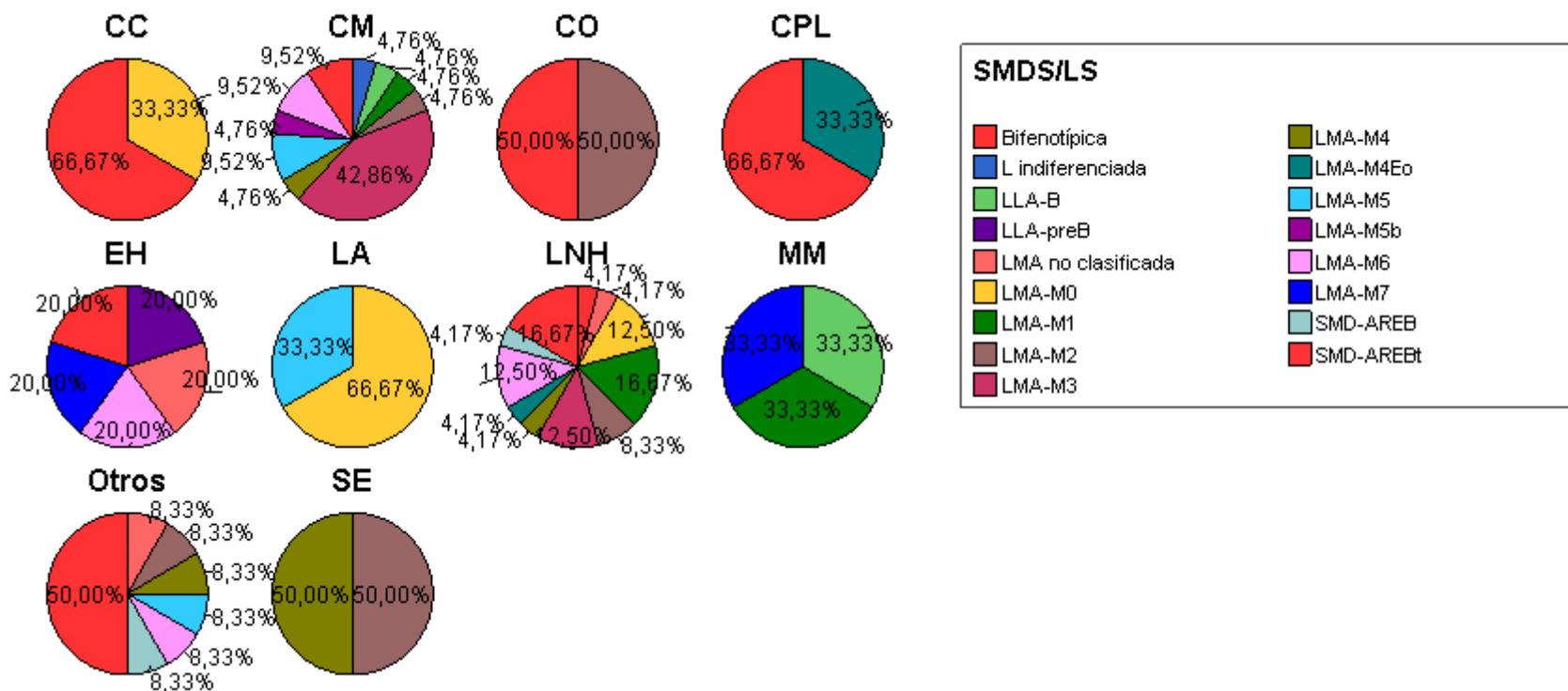
En la Tabla 25 se recoge la distribución de los casos SMDS/LS agrupados por clasificación FAB y grupo de riesgo citogenético.

**Tabla 25.-** Características de los SMDS/LS y grupos de riesgo citogenético

<b>Clasificación</b>	<b>SMDS/LS Número (%)</b>
<b>Total</b>	78(100)
<b>SMDS</b>	<b>20(25.6)</b>
SMD	2(2.6)
AREB	2(2.6)
AREB-T	16(20.5)
<b>LS /subtipos</b>	<b>58(74.4)</b>
LMA sin clasificar	3(3.8)
M0	6(7.7)
M1	6(7.7)
M2	6(7.7)
M3	12(15.38)
M4	4(5.1)
M4Eo	2(2.5)
M5	5(6.41)
M6	7(8.97)
M7	2(2.56)
LLA-B	3(3.85)
Bifenotípica	1(1.28)
LA indiferenciada	1(1.28)
<b>Grupo de riesgo citogenético</b>	
Alto	14(17.9)
Intermedio	33(42.3)
Bajo	12(15.4)
s.c.	19(24.4)

s.c.: sin clasificar

La neoplasia secundaria más frecuente fue la LMA (53%) y dentro de ésta el subtipo más común la LMA-M3 (15%) (Tabla 25 y Fig. 14). Se ha observado una mayor incidencia de LMA-M3 entre los pacientes con CM que en los pacientes con LNH [9/21(42.9%) vs. 3/24(12.5%), respectivamente;  $\chi^2=8.44$ ;  $P = 0.030$ ] (Fig. 14). Por el contrario, los SMDS mostraron una incidencia más alta entre los pacientes que tenían LNH que en los que tenían CM [5/24 (20.8%) vs. 2/21(9.5%), respectivamente;  $\chi^2=1.27$ ;  $P<0.0001$ ] (Fig. 13).



**Figura 13:** Distribución de los SMDS/LS según el tumor primario.

CC: cáncer de colon; CM: cáncer de mama; CO; cáncer de ovario; CPL: cáncer de pulmón EH: enfermedad de Hodgkin; LA: leucemia aguda; LNH: linfoma no Hodgkin; MM: mieloma múltiple; SE: sarcoma de Swing.

No se ha encontrado ninguna asociación de los polimorfismos genéticos con las características clínico-biológicas de las leucemias secundarias al diagnóstico.

## 2.2 Riesgo de LS y polimorfismos genéticos

En la Tabla 26 se recoge la incidencia de los polimorfismos genéticos en el GC y SMDS/LS. Aunque no se han observado diferencias estadísticamente significativas para ningún polimorfismo, sí que hubo una tendencia significativa para *NQO1\*2* (47.3% vs. 35.8%;  $P = 0.07$ ; Tabla 26, Fig. 14), presentando un mayor porcentaje de individuos heterocigotos *NQO1\*2* en el grupo SMDS/LS frente al GC.

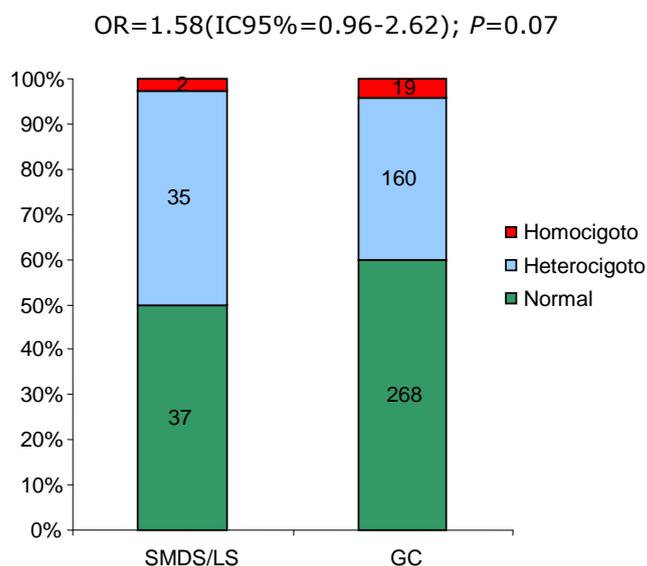
**Tabla 26.-** Polimorfismos y susceptibilidad a SMDS/LS

Polimorfismo Genotipo	SMDS/LS N./Total (%)	GC N./Total (%)	OR (95%IC)	P
<b><i>CYP1A1*2A</i></b>				
Heterocigoto	15/69 (21.7)	84/403 (20.8)	1.05 (0.5-1.95)	0.88
Homocigoto	0/69 (0.0)	2/403 (0.5)	0.00 (0.00)	0.99
<b><i>CYP2E1*5B</i></b>				
Heterocigoto	4/67 (6.0)	23/390 (5.9)	1.013 (0.34-3.03)	0.98
<b><i>CYP3A4*1B</i></b>				
Heterocigoto	6/73 (8.2)	29/357 (8.1)	1.013 (0.41-2.53)	0.98
<b><i>delGSTM1<sup>†</sup></i></b>				
Homocigoto	42/76 (55.3)	232/451 (51.4)	1.16 (0.72-1.90)	0.54
<b><i>delGSTT1<sup>†</sup></i></b>				
Homocigoto	16/78 (20.5)	61/455 (13.7)	1.62 (0.88-2.99)	0.12
<b><i>NQO1*2</i></b>				
Heterocigoto	35/74 (47.3)	160/447 (35.8)	1.58 (0.96-2.62)	<b>0.07</b>
Homocigoto	2/74 (2.7)	19/447 (4.3)	0.76 (0.17-3.41)	0.72

**Tabla 26.- Polimorfismos y susceptibilidad a SMDS/LS ("Continuación")**

<b>MTHFR C677T</b>				
Heterocigoto	25/65 (38.5)	160/331 (48.3)	0.72 (0.38-1.33)	0.29
Homocigoto	17/65 (26.2)	65/331 (19.6)	1.21 (0.59-2.42)	0.60
<b>TYMS</b>				
2R/3R	35/62 (56.5)	162/347 (46.7)	1.47 (0.69-3.13)	0.32
3R/3R	17/62 (27.4)	117/347 (33.7)	0.98 (0.43-2.28)	0.98

GC; grupo control; SMDS/LS, leucemias secundarias; OR, odds ratio  
 †: los individuos heterocigotos se han considerado junto con los normales.



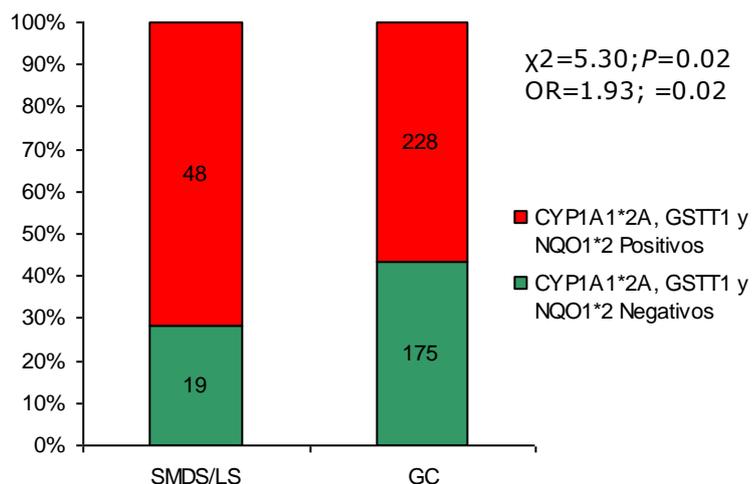
**Figura 14:** Histograma representando la incidencia del polimorfismo NQO1\*2 en SMDS/LS y el grupo control (GC).

Al analizar todas las combinaciones de los polimorfismos se observó que la presencia de uno o más de los polimorfismos *CYP1A1\*2A*, *delGSTT1* o *NQO1\*2*, tenía una incidencia significativamente más alta en SMDS/LS que en el GC (72% vs. 56%;  $\chi^2=5.38$ ;  $P = 0.02$ ; OR = 1.93; 95% IC = 1.1-3.42;  $P = 0.02$ ) (Tabla 27, Fig. 15).

**Tabla 27.-** Haplotipos *CYP1A1\*2A*, *delGSTT1* y *NQO1\*2* en SMDS/LS y el grupo control (GC).

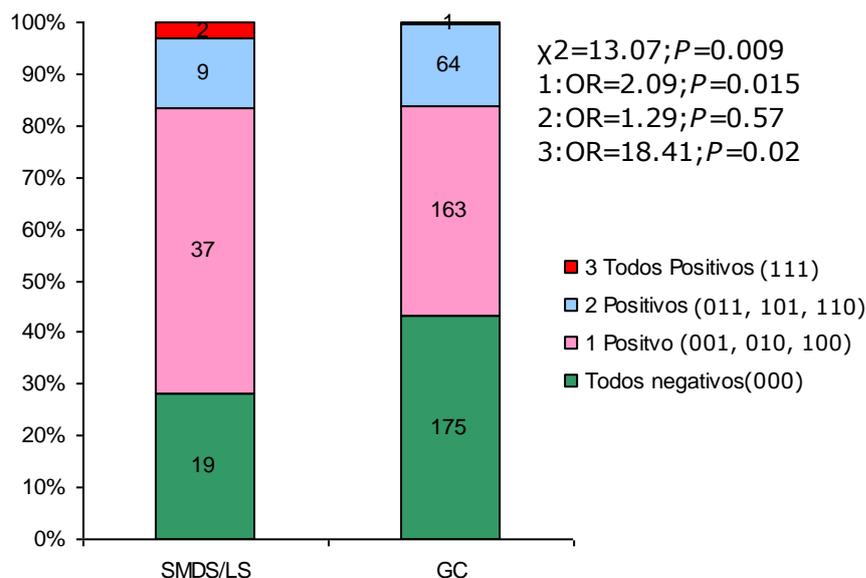
Polimorfismos	Haplotipo	SMDS/LS N./Total (%)	GC N./Total (%)	P	OR 95% IC
<b>1 o más positivos</b>	001			<b>0.02</b>	1.94 (1.1-3.42)
	010				
	100				
	011	48/67 (71.65)	228/403 (56.6%)		
	110				
	101				
	111				
<b>1 Positivo</b>	100	7/67 (10.4)	38/403 (9.4)	<b>0.015</b>	2.09 (1.16-3.78)
	001	23/67 (34.3)	101/403 (25.1)		
	010	7/67 (10.4)	24/403 (5.9)		
<b>2 Positivos</b>	110	1/67 (1.5)	9/403 (2.2)	0.57	1.29 (0.557-3.01)
	101	5/67 (7.5)	37/403 (9.2)		
	011	2/67 (3.0)	9/403 (2.2)		
<b>3 Positivos</b>	111	2/67 (3.0)	1/403 (0.25)	<b>0.02</b>	18.41 (1.6-212.77)

"100": positivo para *CYP1A1\*2A*, "001": positivo para *NQO1\*2*, "010": positivo para *delGSTT1*.



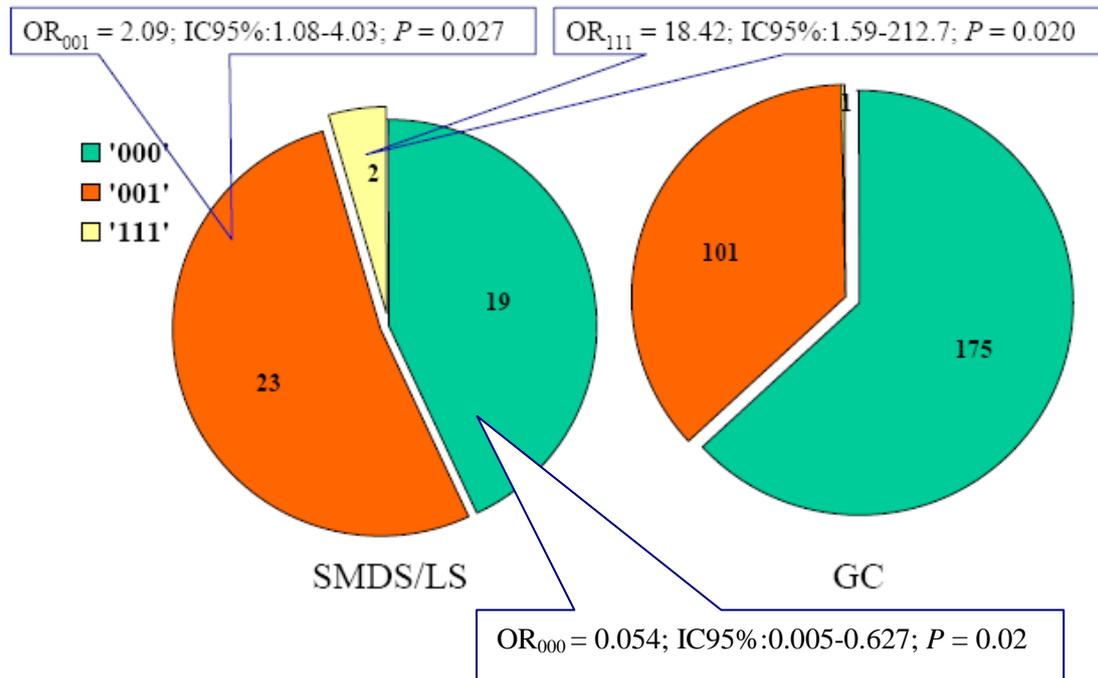
**Figura 15:** Histograma representando la incidencia de la combinación de los polimorfismos CYP1A1\*2A, del GSTT1 y NQO1\*2 en SMDS/LS y el grupo control (GC).

Por el contrario, la negatividad para los tres polimorfismos demostró una presencia significativamente más alta en el GC (28.3% en SMDS/LS vs. 43.4% en el GC; OR = 1.93; 95% IC = 1.11-3.44;  $P = 0.02$ ), mientras que la presencia de uno de los tres polimorfismos (55.2% en SMDS/LS vs. 40.4% en el GC; OR = 2.09; 95% IC = 1.16-3.78;  $P = 0.015$ ) o los tres polimorfismos fue significativamente más alta en SMDS/LS (2.98% en SMDS/LS vs. 0.25% en el GC; OR = 18.41; 95% IC = 1.6-212.77;  $P = 0.02$ ) (Fig. 16).



**Figura 16.** Histograma representando la incidencia de los polimorfismos CYP1A1\*2A, NQO1\*2 y delGSTT1 en SMDS/LS y el grupo control (GC).

Al seleccionar el haplotipo negativo para los tres polimorfismos, ("000"), solamente positivo para NQO1\*2, ("001") y positivo para los tres polimorfismos, ("111"), se demostró que el haplotipo ("000") disminuía 18 veces el riesgo de SMDS/LS (OR = 0.054; 95% IC: 0.005-0.627; P = 0.02). Por el contrario, los haplotipos "001" y "111" aumentaban 2 y 18 veces respectivamente el riesgo de SMDS/LS (OR = 2.09; 95% IC: 1.08-4.03; P = 0.027 y OR = 18.42; IC 95%: 1.59-212.76; P = 0.02) (Fig. 17). El haplotipo "111" fue observado en 2/78 (2.56%) casos del grupo SMDS/LS y 1/403 (0.25%) casos del grupo GC, mientras que el haplotipo "000" tenía una incidencia más alta en el GC que en SMDS/LS [175/277(63.2%) y 19/44 (43.2%), respectivamente;  $\chi^2=12.08$ ; P = 0.002]. Asimismo se ha demostrado una incidencia más alta del haplotipo "001" en SMDS/LS que en el GC [23/44, 52.2% y 101/277, 36.4%, respectivamente,  $\chi^2=13.07$ ; P = 0.015].



**Figura 17.** Representación de los haplotipos CYP1A1\*2A, delGSTT1 y NQO1\*2 y el riesgo de SMDS/LS. '000': negativo para los tres polimorfismos; '001': positivo para NQO1\*2; '111': positivo para los tres polimorfismos

### 3 Leucemia aguda *de novo*

#### 3.1 Polimorfismos y características clinico-biológicas

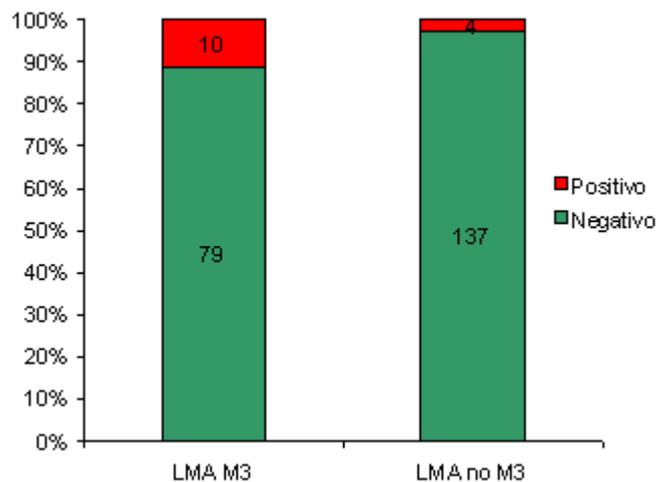
El grupo de 479 pacientes con leucemia aguda *de novo* incluyó 317 pacientes con LMA con una mediana de edad de 47 años (rango 0.8-87), de los que 174 (54.8%) eran varones y 142 mujeres (44.7%), y 162 pacientes con LLA con una mediana de edad de 26 años (rango 1-82), de los que 102 (63.0%) eran varones y 60 (37.0%) mujeres (Tabla 28).

**Tabla 28 .-** Características clínico-biológicas del grupo de LA

<b>Características</b>	<b>LMA n (%)</b>	<b>LLA n (%)</b>
<i>Total</i>	317(100)	162(100)
<b>Sexo</b>		
Varón	174(54.8)	102(63.0)
Mujer	142(44.7)	60(37.0)
<b>Edad</b>		
<=18	35(11.0)	58(35.8)
19-40	78(24.6)	48(29.6)
41-50	50(15.7)	12(7.4)
51-60	45(14.1)	13(8.0)
>60	77(24.3)	20(12.3)
Mediana (rango)	47(0.8-87)	26(1-82)
<b>FAB</b>		
Indiferenciada	3(0.95)	
Mixta	2(0.64)	
Sin clasificar	3(0.95)	
M0	11(3.47)	
M1	49(15.46)	
M2	49(15.46)	
M3	109(34.38)	
M4	37(11.67)	
M5	29(9.15)	
M6	10(3.15)	
M7	4(1.26)	
s.c.	11(3.47)	
<b>Inmunofenotipo</b>		
LAL-B		96(59.3)
LAL-T		27(16.7)
Pre-B		18(11.1)
LAL-Ph+		9(5.6)
s.c.		12(7.4)
<b>Grupo de riesgo citogenético</b>		
alto	17(5.4)	9(5.6)
intermedio	110(35.20)	61(37.7)
bajo	122(39.10)	
s.c.	63(20.10)	92(56.8)

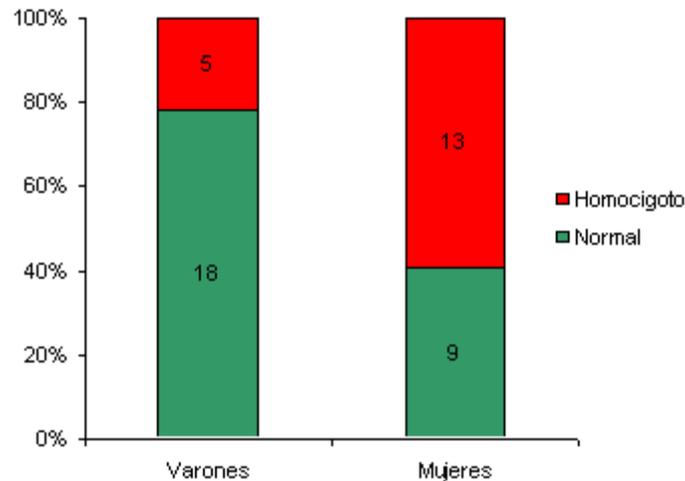
s.c.: sin clasificar

Dentro del grupo de LMA, al estratificar por el subtipo FAB, se observó que el polimorfismo *CYP2E1\*5B* mostró una incidencia significativamente mayor en pacientes con el subtipo M3 comparado con los de otros subtipos (11.2% vs. 2.8%;  $\chi^2 = 8.96$ ;  $P = 0.01$ ) (Fig.18).



**Figura 18.** Distribución del polimorfismo *CYP2E1\*5B* en pacientes LMA-M3 respecto a pacientes con otro subtipo FAB

Además, al estratificar en función del sexo, las mujeres del subtipo FAB M2 mostraron una incidencia duplicada del polimorfismo *delGSTM1* respecto a los varones con el mismo subtipo (59.1% y 21.7%, respectivamente;  $\chi^2 = 6.53$ ;  $P = 0.01$ ) (Fig. 19).



**Figura 19.** Distribución del polimorfismo delGSTM1 en pacientes LMA-M2 según el sexo

### 3.2 Polimorfismos y riesgo de LMA

En la Tabla 29 se muestra la incidencia de los polimorfismos genéticos. El polimorfismo *delGSTM1* mostró una mayor incidencia en el grupo de LMA que en el GC (25.6% vs. 13.7%; OR = 2.17; 95% IC = 1.48–3.16;  $P < 0.001$ ; Fig.20).

**Tabla 29.-** Frecuencias genotípicas de los polimorfismos y OR para las LMA

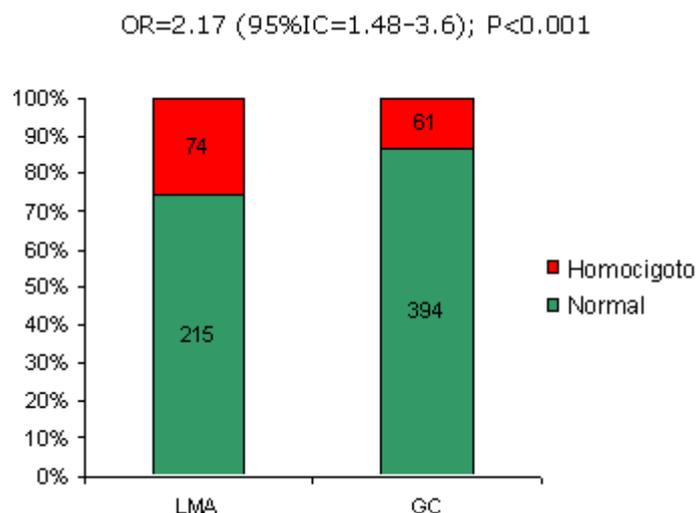
Polimorfismos Genotipos	Controles	Casos	OR (95% IC)	P
	GC n/total (%)	LMA n/total (%)		
<b>CYP1A1*2A</b>				
Heterocigoto	84/403 (20.8)	31/199 (15.6)	0.69 (0.43–1.09)	0.13
Homocigoto	2/403 (0.5)	0/199 (0.0)	----	0.3
<b>CYP2E1*5B</b>				
Heterocigoto	23/390 (5.9)	13/225 (5.8)	0.96 (0.48–1.98)	0.91
Homocigoto	0/390 (0.0)	1/225 (0.4)	----	0.19
<b>CYP3A4*1B</b>				
Heterocigoto	29/357 (8.1)	14/222 (6.3)	0.77 (0.39–1.48)	0.4
Homocigoto	0/357 (0.0)	1/222 (0.5)	----	0.08

**Tabla 29.-** Frecuencias genóticas de los polimorfismos y OR para LMA (“Continuación”)

<b>delGSTM1<sup>†</sup></b>				
Homocigoto	232/451 (51.4)	143/295 (48.5)	0.88 (0.66–1.191)	0.46
<b>delGSTT1<sup>†</sup></b>				
Homocigoto	61/455 (13.7)	74/289 (25.6)	2.17 (1.48–3.16)	<b>P&lt;0.001</b>
<b>NQO1*2</b>				
Heterocigoto	160/447 (35.8)	94/273 (34.4)	0.96 (0.71–1.33)	0.92
Homocigoto	19/447 (4.3)	16/273 (5.9)	1.38 (0.69–2.77)	0.4
<b>MTHFR C677T</b>				
Heterocigoto	160/331 (48.3)	80/163 (49.1)	0.98 (0.64–1.50)	0.98
Homocigoto	65/331 (19.6)	29/163 (17.8)	0.87 (0.51–1.51)	0.63
<b>TYMS</b>				
2R3R	162/347 (46.7)	94/169 (55.6)	1.19 (0.73–1.94)	0.42
3R3R	117/347 (33.7)	42/169 (24.9)	0.74 (0.43–1.27)	0.23

GC, grupo control; LMA, leucemia mieloblástica aguda; LLA, leucemia linfoblástica aguda; OR, odds ratio.

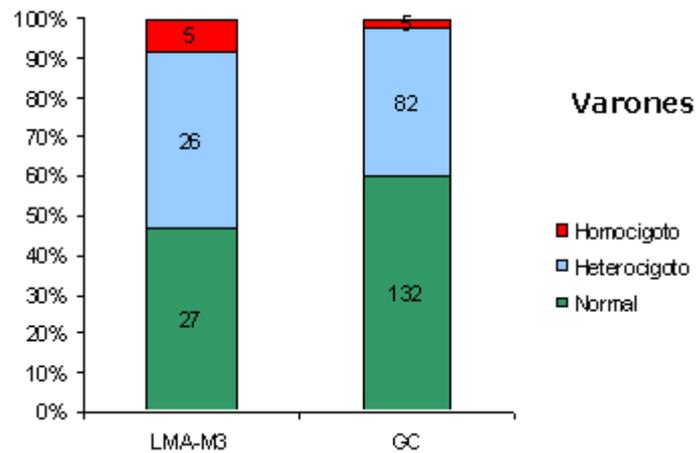
<sup>†</sup>: los individuos heterocigotos se han considerado junto con los normales.



**Figura 20.** Incidencia del polimorfismo delGSTT1 en el grupo LMA y en el grupo GC.

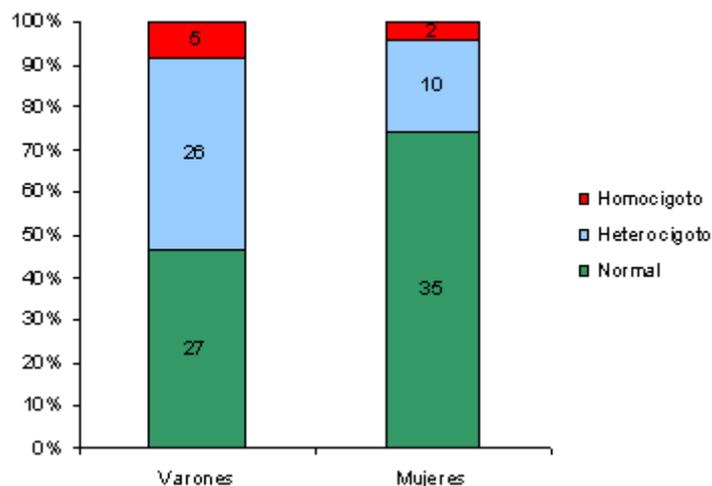
No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el resto de los polimorfismos, a excepción de *NQO1\*2*, que al separar por sexos, se observó una mayor incidencia de homocigotos en los varones del

subtipo FAB M3 con respecto al GC [8.6% (5/58) vs. 2.2% (5/219); OR (ORhom.) = 4.88; 95% IC = 1.32–18.1;  $P = 0.017$ ; Fig. 21].



**Figura 21.** Incidencia del polimorfismo NQO1\*2 en varones LMA-M3 y en el grupo control (GC).

Esta diferencia en el patrón de incidencia del polimorfismo NQO1\*2 entre ambos sexos implicó la existencia de interacciones estadísticamente significativas [ORhet.\*varón = 3.11; 95% IC = 1.18–8.19;  $P = 0.02$  y ORhom.\*varón = 8.81; 95% IC = 1.18–65.74;  $P = 0.03$ ; Fig. 22].



**Figura 22.** Incidencia del polimorfismo NQO1\*2 en varones y mujeres con LMA-M3

Al agrupar todos los parámetros estadísticamente significativos detectados por regresión logística binaria univariante (*delGSTT1*, *NQO1\*2*, sexo y *NQO1\*2\*varón*) en el modelo de regresión logística múltiple binario, las variables *delGSTT1* (OR = 1.97; 95% IC = 1.33–2.92; *P* = 0.001) y la interacción *NQO1\*2\*varón* (OR = 3.64; 95% IC = 1.22–10.86; *P* = 0.02) fueron los únicos parámetros independientes que conferían un mayor riesgo de leucemia (Tabla 30).

**Tabla 30.- Análisis multivariante**

	<b>OR</b>	<b>95% IC</b>	<b>P</b>
<i>delGSTT1</i>	1.97	1.33-2.92	0.001
<i>NQO1*2</i>	1.43	0.99-2.05	0.056
sexo	1.01	0.69-1.48	0.965
<i>NQO1*2*varón</i>	3.64	1.22-10.86	0.02

Al estratificar en función del sexo, la proporción de mujeres heterocigotas para el polimorfismo *CYP1A1\*2A* fue mayor en el GC que en el grupo de LMA (OR = 0.47; 95% IC = 0.23-0.99; *P* = 0.04) (Tabla 31). Dentro del grupo de LMA, tanto los varones como las mujeres presentaron una mayor incidencia del polimorfismo *delGSTT1* con respecto al grupo control (OR = 2.04; 95% IC = 1.2-3.4; *P* = 0.007 en los varones; OR = 2.3; 95% IC = 1.34-3.96; *P* = 0.002 en las mujeres). Además la proporción de varones homocigotos para el polimorfismo *NQO1\*2* fue mayor en el grupo de LMA que en el grupo control (OR = 3.35; 95% IC = 1.1-10.2; *P* = 0.03).

**Tabla 31.-** Frecuencias genotípicas de los polimorfismos y OR para LMA según el sexo

Polimorfismos Genotipos	Varones				Mujeres			
	GC n/total (%)	LMA n/total (%)	OR (95% IC)	P	GC n/total (%)	LMA n/total (%)	OR (95% IC)	P
<b>CYP1A1*2A</b>								
Heterocigoto	43/203 (20.7)	22/112 (19.6)	0.9 (0.5–1.6)	0.75	41/200 (20.5)	10/91 (11.0)	0.47 (0.23–0.99)	<b>0.04</b>
Homocigoto	0/203 (0.0)	0/112 (0.0)	----	----	2/200 (1.0)	0/92 (0.0)	0.987 (0.97–1.005)	0.31
<b>CYP2E1*5B</b>								
Heterocigoto	11/204 (5.4)	8/131 (6.1)	1.15 (0.45–2.9)	0.77	12/186 (6.5)	5/99 (5.1)	0.77 (0.27–2.26)	0.63
Homocigoto	0/204 (0.0)	1/131 (0.4)	1.008 (0.992–1.02)	0.21	0/186 (0.0)	0/99 (0.0)	----	----
<b>CYP3A4*1B</b>								
Heterocigoto	16/174 (9.2)	9/132 (6.8)	0.74 (0.31–1.7)	0.5	13/183 (7.1)	5/95 (5.3)	0.73 (0.25–2.1)	0.55
Homocigoto	0/174 (0.0)	2/132 (1.52)	1.017 (0.994–1.04)	0.11	0/183 (0.0)	0/95 (0.0)	----	----
<b>delGSTM1<sup>†</sup></b>								
Homocigoto	105/222 (47.2)	77/169 (45.6)	0.93 (0.6–1.4)	0.7	127/229 (55.5)	71/135 (52.6)	0.9 (0.6–1.4)	0.6
<b>delGSTT1<sup>†</sup></b>								
Homocigoto	30/218 (13.8)	41/167 (24.6)	2.04 (1.2–3.4)	<b>0.007</b>	31/227 (13.7)	35/131 (26.7)	2.3 (1.34–3.96)	<b>0.002</b>
<b>NQO1*2</b>								
Heterocigoto	82/219 (37.4)	63/154 (40.9)	1.25 (0.82–1.92)	0.31	78/228 (34.2)	35/127 (27.6)	0.71 (0.44–1.15)	0.16
Homocigoto	5/219 (4.3)	10/154 (5.9)	3.26 (1.08–9.9)	<b>0.03</b>	14/228 (4.3)	6/127 (4.7)	0.68 (0.25–1.8)	0.44
<b>MTHFR C677T</b>								
Heterocigoto	76/169 (58.5)	48/89 (63.1)	1.2 (0.68–2.2)	0.51	84/162 (51.9)	34/76 (44.7)	0.81 (0.44–1.5)	0.5
Homocigoto	39/169 (23.1)	13/89 (14.6)	0.64 (0.3–1.4)	0.26	26/162 (16.0)	16/76 (21.0)	1.2 (0.56–2.7)	0.6
<b>TYMS</b>								
2R3R	88/181 (48.6)	51/93 (54.8)	0.9 (0.5–1.8)	0.82	74/166 (44.6)	45/78 (57.6)	1.7 (0.8–3.5)	0.16
3R3R	61/181 (33.7)	22/93 (23.6)	0.58 (0.27–1.2)	0.14	56/166 (33.7)	20/78 (25.6)	0.99 (0.44–2.2)	0.98

GC, grupo control; LMA, leucemia mieloblástica aguda; OR, odds ratio.

<sup>†</sup>: los individuos heterocigotos se han considerado junto con los normales.

En la regresión logística múltiple binaria separando por sexo, *delGSTT1* (OR = 2.04; 95% IC = 1.2–3.4; *P* = 0.007) y el homocigoto para *NQO1\*2* (OR = 3.26; 95% IC = 1.08–9.9; *P* = 0.03) fueron los únicos factores de riesgo independientes para LMA en varones, mientras que

*delGSTT1* (OR = 2.3; 95% IC = 1.34–3.96; *P* = 0.002) fue el único factor de riesgo independiente para LMA en mujeres (Tabla 32).

**Tabla 32.-** Resultado del análisis multivariante según el sexo

	VARONES			MUJERES		
	OR	95% IC	<i>P</i>	OR	95% IC	<i>P</i>
<i>delGSTT1</i>	1.73	1.0-3.0	0.05	2.24	1.27-3.94	0.005
<i>NQO1</i> *2	3.35	3-1.1-10.2	0.03	0.786	0.54-1.15	0.22

### 3.3 Polimorfismos y susceptibilidad a LLA

En el grupo de LLA, no se observaron diferencias en la frecuencias genotípicas en cuanto a la edad al diagnóstico, sexo, linaje de células B o T, o riesgo citogenético.

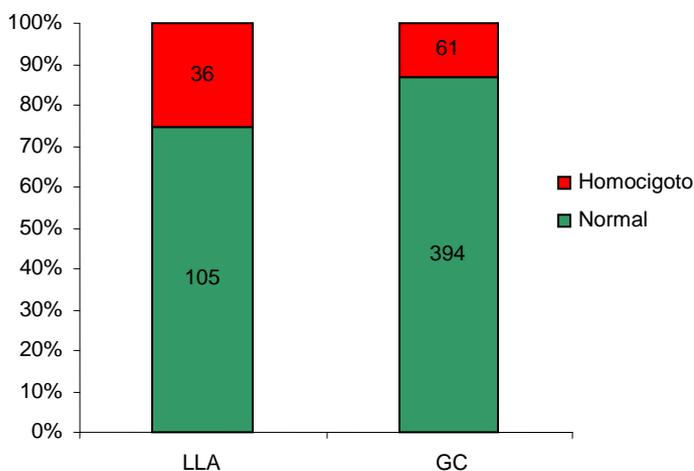
Al analizar las frecuencias genotípicas en relación con la susceptibilidad a LLA, se pudo observar una mayor incidencia del polimorfismo *delGSTT1* en pacientes con LLA comparado con el GC (25.5% vs. 13.7%; OR = 2.15; 95% IC = 1.35-3.43; *P* = 0.001; Tabla 33, Fig. 23).

**Tabla 33.-** Frecuencias genotípicas de los polimorfismos y OR para LLA

Polimorfismos Genotipos	Controles	Casos	OR (95% IC)	P
	GC n/total (%)	LLA n/total (%)		
<b>CYP1A1*2A</b>				
Heterocigoto	84/403 (20.8)	13/92 (14.1)	0.62 (0.32-1.17)	0.05
Homocigoto	2/403 (0.5)	0/92 (0.0)	----	0.38
<b>CYP2E1*5B</b>				
Heterocigoto	23/390 (5.9)	8/118 (6.8)	0.86 (0.37-1.98)	0.28
Homocigoto	0/390 (0.0)	0/118 (0.0)	----	
<b>CYP3A4*1B</b>				
Heterocigoto	29/357 (8.1)	6/128 (4.7)	0.56 (0.23-1.38)	0.41
Homocigoto	0/357 (0.0)	1/128 (0.8)	----	0.11
<b>delGSTM1<sup>†</sup></b>				
Homocigoto	232/451 (51.4)	64/140 (45.7)	0.79 (0.54-1.16)	0.28
<b>delGSTT1<sup>†</sup></b>				
Homocigoto	61/455 (13.7)	36/141 (25.5)	2.15 (1.35-3.43)	<b>0.001</b>
<b>NQO1*2</b>				
Heterocigoto	160/447 (35.8)	41/120 (34.2)	1.05 (0.68-1.63)	0.93
Homocigoto	19/447 (4.3)	14/120 (11.7)	3.03 (1.44-6.37)	<b>0.003</b>
<b>MTHFR C677T</b>				
Heterocigoto	160/331 (48.3)	53/117 (45.3)	0.72 (0.45-1.13)	0.24
Homocigoto	65/331 (19.6)	15/117 (12.8)	0.49 (0.26-0.96)	<b>0.038</b>
<b>TYMS</b>				
2R3R	162/347 (46.7)	42/108 (38.9)	0.77 (0.43-1.37)	0.58
3R3R	117/347 (33.7)	43/108 (39.8)	1.08 (0.60-1.95)	0.65

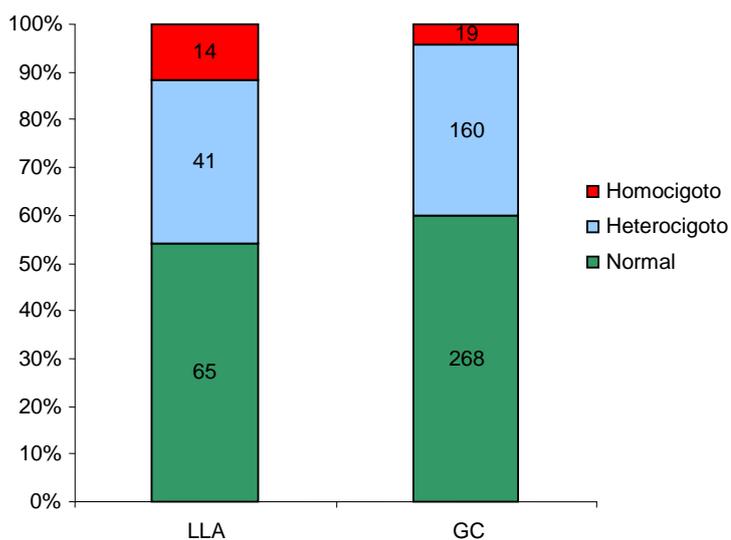
<sup>†</sup>: los individuos heterocigotos se han considerado junto con los normales.

OR=2.15(95%IC=1.35-3.43); P=0.001



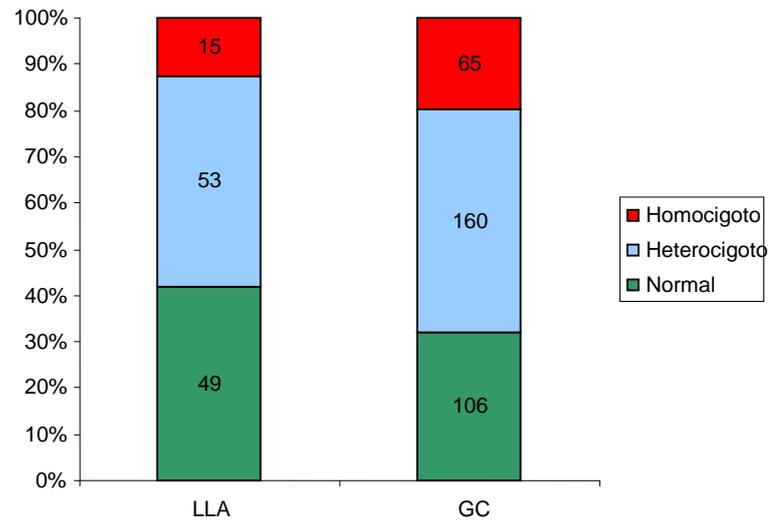
**Figura 23.** Representación del polimorfismo de *CCN1* en pacientes LLA y en el GC.

Asimismo, se observó una mayor incidencia del polimorfismo *NQO1*\*2hom en pacientes con LLA que en el GC (11.7% vs. 4.3%; ORhom = 3.03; 95% IC = 1.44-6.37; P = 0.003; Tabla 34, Fig.24).



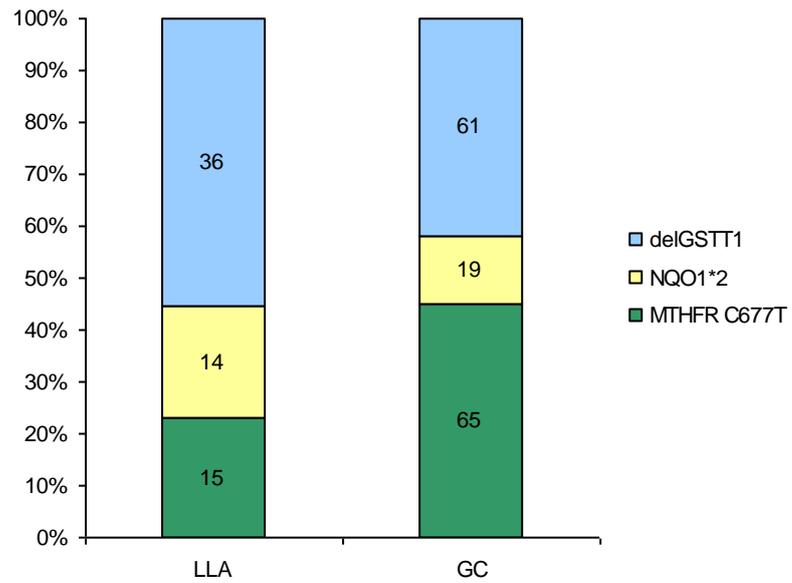
**Figura 24.** Representación del polimorfismo *NQO1*\*2 en pacientes con LLA y en el GC.

También se pudo observar una baja incidencia de homocigosis para *MTHFR C677T*, en el grupo de LLA en comparación con el GC (12.8% vs.19.6%; OR = 0.49; 95% IC = 0.26-0.96;  $P = 0.038$ ; Tabla 33; Fig.25).



**Figura 25.** Representación del polimorfismo *MTHFR C677T* en pacientes con LLA y en el GC.

Al introducir los polimorfismos *delGSTT1*, *NQO1\*2* y *MTHFR C677T* en un modelo de regresión logística multivariante binario, todos seguían presentando significación estadística (OR *delGSTT1* = 1.91; 95% IC = 1.04–3.43;  $P = 0.04$ ; OR *NQO1\*2* hom. = 3.61; 95% IC = 1.44–9.02;  $P = 0.006$  y OR *MTHFR C677T* = 0.42; 95% IC = 0.23–0.87;  $P = 0.02$ ) (Fig. 26).



**Figura 26.** Representación de la distribución de los polimorfismos *NQO1\*2*, *delGSTT1* y *MTHFR C677T* en pacientes con LLA y en el grupo control GC.

Al estratificar por sexos, se mantuvieron las diferencias estadísticamente significativas para *delGSTT1* y *NQO1\*2* en varones (Tabla 34).

**Tabla 34.-** Frecuencias genotípicas de los polimorfismos y OR para las LLA según el sexo

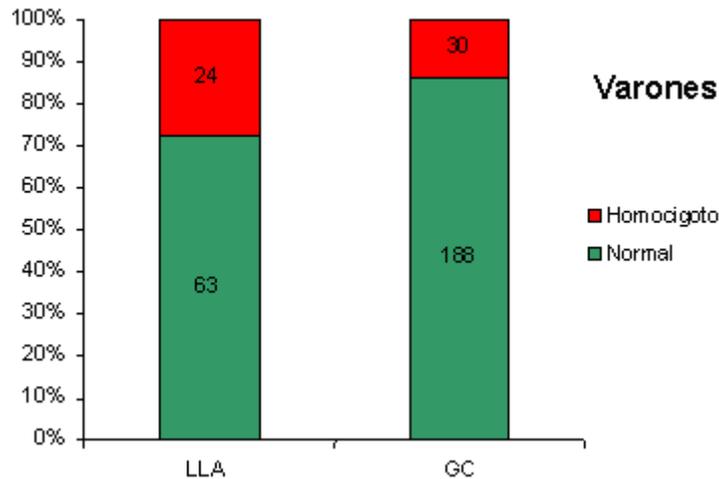
Polimorfismos Genotipos	Varones				Mujeres			
	GC n/total (%)	LLA n/total (%)	OR (95% IC)	P	GC n/total (%)	LLA n/total (%)	OR (95% IC)	P
<b>CYP1A1*2A</b>								
Heterocigoto	43/203 (21.2)	11/90 (12.2)	0.52 (0.25–1.1)	0.07	41/200 (20.5)	8/53 (15.1)	0.68 (0.3-1.6)	0.36
Homocigoto	0/203 (0.0)	0/90 (0.0)	----	----	2/200 (1.0)	0/53 (0.0)	0.987 (0.97-1.005)	0.45
<b>CYP2E1*5B</b>								
Heterocigoto	11/204 (5.4)	5/79 (6.3)	1.19 (0.4–3.5)	0.76	12/186 (6.5)	6/48 (12.5)	2.1 (0.7–5.8)	0.16
Homocigoto	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	----	----	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	----	----
<b>CYP3A4*1B</b>								
Heterocigoto	16/174 (9.2)	6/86 (7.0)	0.76 (0.3–2.0)	0.58	13/183 (7.1)	2/51 (3.9)	0.53 (0.12–2.4)	0.41
Homocigoto	0/174 (0.0)	2/86 (2.3)	1.026 (0.99-1.062)	0.052	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	----	----
<b>delGSTM1<sup>†</sup></b>								
Homocigoto	105/222 (47.3)	44/95 (46.3)	0.96 (0.6–1.6)	0.87	127/229 (55.5)	28/60 (46.7)	0.7 (0.4–1.2)	0.22
<b>delGSTT1<sup>†</sup></b>								
Homocigoto	30/218 (13.8)	24/96 (25.0)	2.1 (1.1-3.8)	<b>0.015</b>	31/227 (13.7)	12/60 (20.0)	1.6 (0.76-3.3)	0.22
<b>NQO1*2</b>								
Heterocigoto	82/219 (37.4)	26/81 (32.0)	0.95 (0.54–1.7)	0.86	78/228 (34.2)	19/54 (35.2)	1.1 (0.58-2.1)	0.76
Homocigoto	5/219 (2.3)	11/81 (13.6)	6.6 (2.17-20.04)	<b>0.001</b>	14/228 (6.1)	5/54 (9.3)	1.62 (0.54-4.8)	0.39
<b>MTHFR C677T</b>								
Heterocigoto	76/169 (45.0)	37/84 (44.0)	0.75 (0.42-1.3)	0.33	84/162 (51.9)	27/50 (54.0)	0.84 (0.4–1.6)	0.6
Homocigoto	37/169 (21.9)	12/84 (14.3)	0.48 (0.22–1.03)	0.06	27/162 (16.7)	3/50 (6.0)	0.3 (0.08–1.1)	0.06
<b>TYMS</b>								
2R3R	88/181 (48.6)	34/78 (43.6)	0.82 (0.4-1.7)	0.6	74/166 (44.6)	17/47 (36.2)	0.8 (0.3-1.99)	0.67
3R3R	61/181 (33.7)	29/78 (37.2)	1.01 (0.48-2.16)	0.97	56/166 (33.7)	20/47 (42.6)	1.29 (0.54-3.1)	0.57

GC, grupo control; LLA, leucemia linfoblástica aguda; OR, odds ratio.

<sup>†</sup>: los individuos heterocigotos se han considerado junto con los normales.

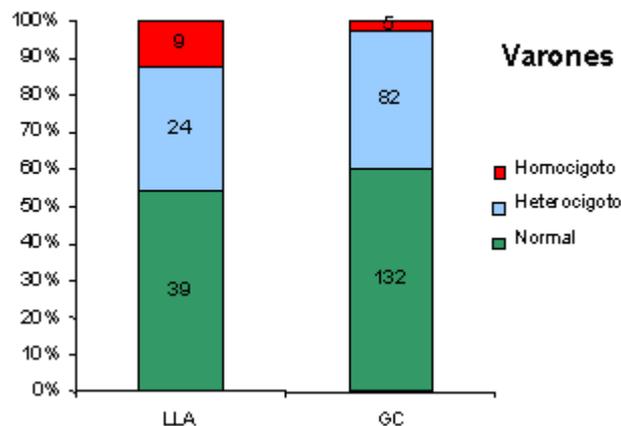
La diferencia de incidencias del polimorfismo *delGSTT1* observada entre el grupo de LLA y el GC, fue sobre todo debida a los varones con LLA, en los que el polimorfismo mostraba una incidencia del 25.0% (24/96)

frente a 13.8% (30/218) de los varones del GC (OR = 2.1; 95% IC = 1.1-3.8;  $P = 0.015$ ; Tabla 33, Fig. 27).



**Figura 27.** Representación del polimorfismo del GSTT1 en varones con LLA y del GC.

Asimismo, los varones con LLA presentaron una mayor incidencia del polimorfismo NQO1\*2, 12.5% (9/72) homocigotos frente a 2.2% (5/219) homocigotos en el GC (OR<sub>hom</sub> = 6.09; 95% IC = 1.9-19.2;  $P = 0.002$ ; Tabla 34; Fig. 28). Sin embargo, estas diferencias no se observaron en las mujeres.



**Figura 28.** Incidencia del polimorfismo NQO1\*2 en varones con LLA y en el GC.

## 4 VARIABILIDAD INTERINDIVIDUAL EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON LMA

### 4.1 Características clínico-biológicas de los pacientes

El estudio de la variabilidad interindividual en la respuesta al tratamiento se realizó en 153 pacientes con LMA no M3 *de novo*.

En la siguiente tabla se recogen las características clínico-biológicas de estos pacientes.

**Tabla 35 .-** Características clínico-biológicas del grupo de estudio

<b>Características</b>	<b>n (%)</b>
<b>Edad</b>	
≤60	98(64)
>60	55(36)
<b>Sexo</b>	
Varones	83(54)
Mujeres	70(46)
<b>Leucocitos(x10<sup>9</sup>/L)</b>	
≤50	112(45)
>50	37(25)
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	
≤10	87(61)
>10	55(39)
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>	
≤50	65(45)
>50	78(55)
<b>FAB</b>	
M0	9(6)
M1	40(26)
M2	40(26)
M4	32(21)
M5	27(18)
M6	4(3)
M7	1(1)
<b>Grupo de riesgo citogenético</b>	
Bajo	17(11)
Intermedio	91(59)
Alto	21(14)
ND	24(16)

ND: No disponible

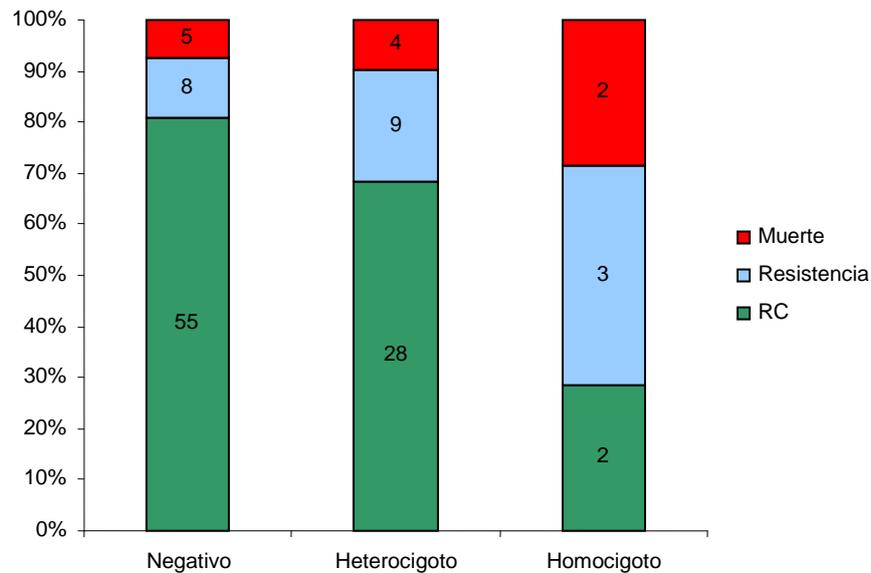
Los subtipos FAB mayoritarios fueron M1 y M2 40/153 (26%) respectivamente seguido de M4 32/153 (21%) y M5 27/153 (18%). La mayoría de los pacientes eran del grupo de riesgo citogenético intermedio con 91/153 (71%).

La presencia de los cuatro polimorfismos principales (*delGSTM1*, *delGSTT1*, *NQO1\*2*, y *CYP1A1\*2A*) fue examinada según la edad, sexo, leucocitos, plaquetas, hemoglobina, subtipo FAB, grupo de riesgo citogenético. No se encontraron diferencias en la distribución de los genotipos con respecto a las características clínicas en el diagnóstico, a excepción de *delGSTM1* y del sexo. Una frecuencia más alta de *delGSTM1* fue observada en las mujeres (62%) que en los hombres (41%) ( $P = 0.01$ ), y también el genotipo doble nulo *delGSTM1T1* tiende a estar más representado en las mujeres (71% frente a 56%;  $P = 0.06$ ).

#### **4.2 Implicación de los polimorfismos en la respuesta al tratamiento**

Ciento cuarenta y siete pacientes fueron evaluados para su respuesta al tratamiento de inducción: 112 pacientes alcanzaron la remisión completa (RC), 23 fueron resistentes, y 12 murieron. La respuesta al tratamiento no mostró ninguna relación con *delGSTM1*, *delGSTT1*, o con *CYP1A1\*2A*. Sin embargo, los pacientes con el polimorfismo *NQO1\*2* mostraron una tendencia a una peor respuesta ( $P = 0.08$ ), ya que el 81% (55/68) de los casos negativos para el polimorfismo *NQO1\*2* y el 63% (30/48) de los positivos para el polimorfismo *NQO1\*2* alcanzaron RC. Cuando se consideró el número de alelos funcionales *NQO1*, se encontró que 55 de 68 (81%)

pacientes negativos para *NQO1*\*2, 28 de 41 (69%) pacientes heterocigotos, y dos de siete (27%) pacientes homocigotos alcanzaron RC ( $P = 0.04$ ) (Fig. 29).



**Figura 29.** El número de alelos polimórficos *NQO1*\*2 influye en la respuesta a la terapia de inducción.

### 4.3 Polimorfismos y valor pronóstico

En los pacientes que alcanzaron la RC, la mediana de seguimiento fue de 26 meses (rango, 0.61-141 meses). La probabilidad estimada de SLE fue del 49%. El análisis univariante demostró que la SLE estaba significativamente influenciada por la edad mayor de 60 años ( $P = 0.0002$ ), el grupo de riesgo citogenético ( $P = 0.01$ ), y *delGSTM1* ( $P = 0.04$ ) (Tabla 36).

**Tabla 36.-** Análisis univariante

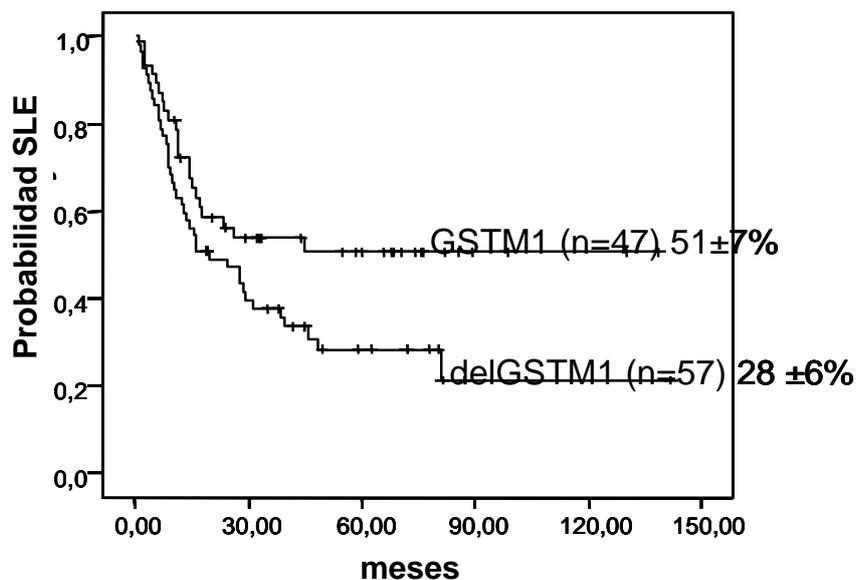
	N (%)	Nº eventos (%)	Análisis univariante	
			RR (95% IC)	P
<b>Edad</b>				
≥60 vs <60	78(72.2) vs 30(27.8)	39±4% vs 18±4%	2.52 (1.05-3.48)	<b>0.0002</b>
<b>Cariotipo</b>				
Favorable vs intermedio vs alto	17(18.3) vs 70(75.3) vs 6(6.5)	59±10% vs 50±11% vs 20±11	2.02 (1.10-3.74)	<b>0.01</b>
<b>GSTM1</b>				
Deleción vs normal	58(53.7) vs 47(44.8)	28±6% vs 51±7%	1.70 (1.05-2.87)	<b>0.04</b>
<b>GSTM1T1</b>				
Cualquier deleción vs normal	21(20.2) vs 83(79.8)	30±7% vs 58±7%	1.97 (1.05-3.47)	<b>0.03</b>
<b>GSTM1*Sexo</b>				
Deleción vs normal	29(49.2) vs 30(50.8)	28±11% vs 57±9%	1.31 (0.99-1.78)	0.06

N: número de pacientes que entran en RC

Eventos: recaída o muerte en RC

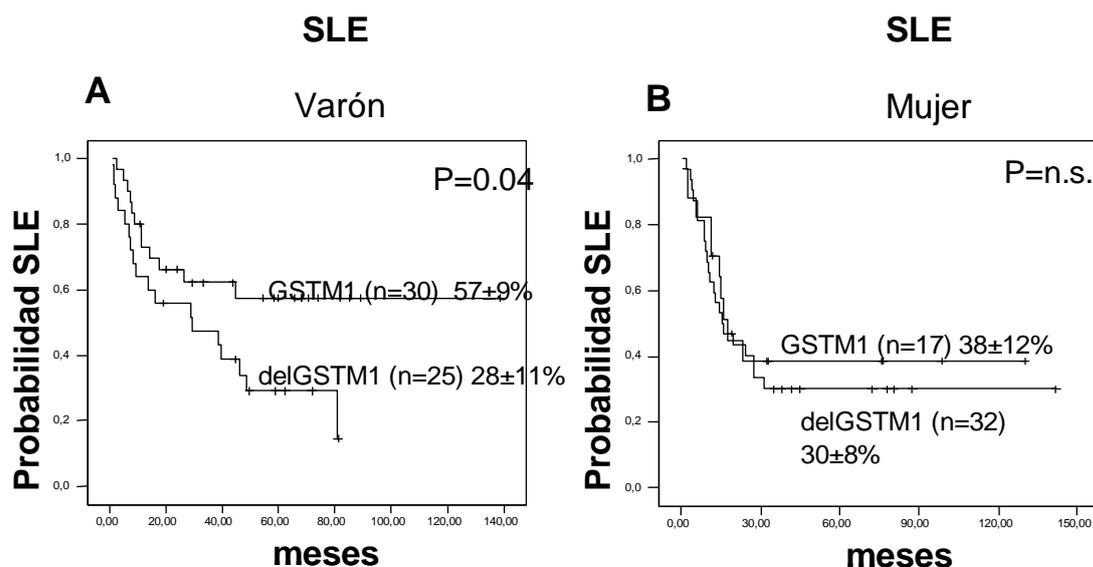
\*Interacción

La probabilidad de SLE fue significativamente menor en pacientes con *delGSTM1* respecto a los pacientes con *GSTM1* no delecionado (28% frente a 51%, respectivamente;  $P = 0.04$ ; Fig. 30).



**Figura 30.** Las deleciones *GSTM1* tienen un valor pronóstico negativo en la SLE.

Dado que *delGSTM1* fue asociado significativamente al sexo, se examinó la influencia del sexo en relación con *delGSTM1*. Se observó que la presencia de *delGSTM1* afectó exclusivamente la SLE en los hombres (28% SLE para *delGSTM1* frente a 57% SLE para *GSTM1* no delecionado;  $P = 0.04$ ; Fig. 31) pero no tenía ningún impacto significativo en mujeres.

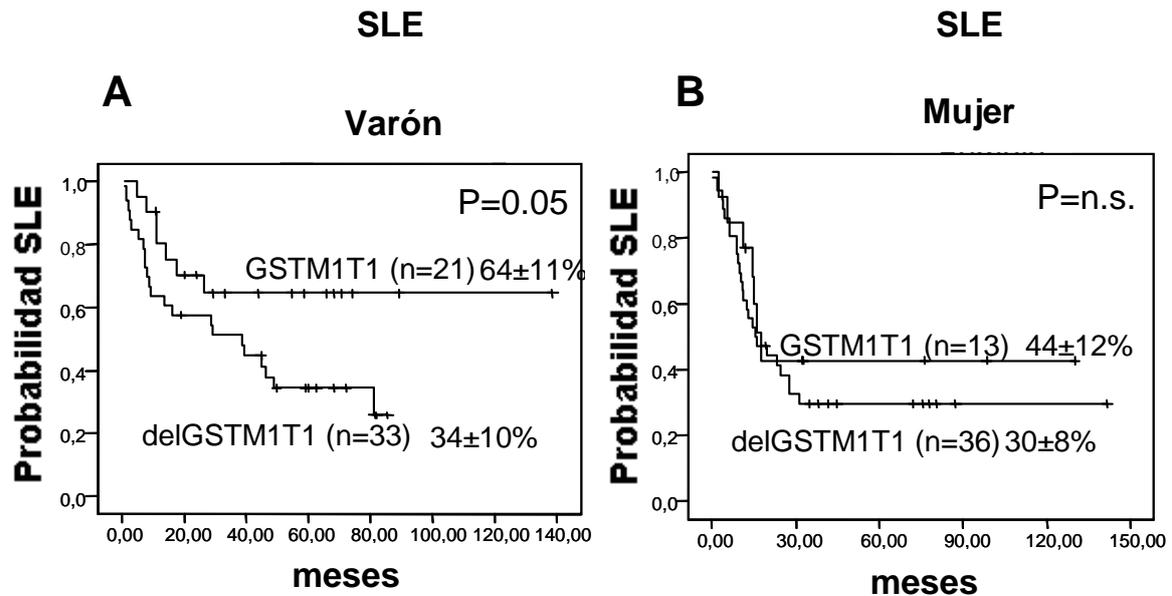


**Figura 31.** Las deleciones *GSTM1* están asociadas con una probabilidad de SLE más baja para los varones (A) pero no modifica el pronóstico en mujeres (B).

Asimismo, al evaluar el impacto del polimorfismo *delGSTM1* dentro del grupo de riesgo citogenético intermedio, se observó que los hombres con *delGSTM1* presentaban una probabilidad reducida de SLE comparado con aquellos con *GSTM1* no delecionado (29% frente a 60%, respectivamente;  $P = 0.05$ ). Sin embargo, no se encontró diferencias significativas en mujeres.

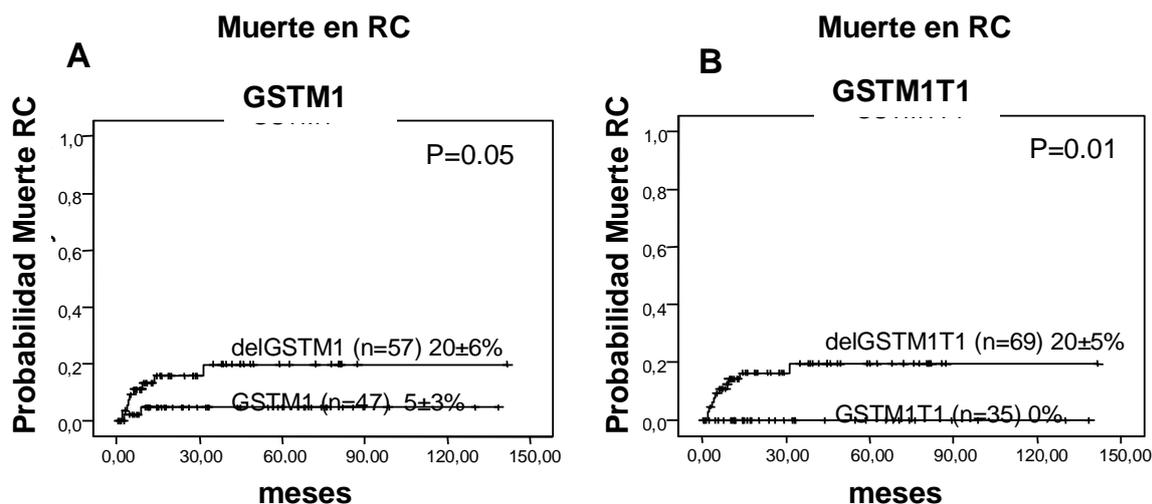
El análisis de los genotipos combinados *GSTM1* y *GSTT1* demostró que los pacientes con los genes no delecionados *GSTM1* y *GSTT1* tenían una SLE significativamente mayor que los pacientes con al menos una deleción *GST* (58% frente a 30%, respectivamente;  $P = 0.03$ ). Al estratificar los datos por sexo, se observó que los pacientes varones con *GSTM1* y *GSTT1* no delecionados tenían una SLE significativamente mayor que los pacientes varones con al menos una deleción de *GST* (64% frente a 34%, respectivamente;  $P = 0.05$ ). Por el contrario, *GSTM1* y *GSTT1* no delecionados no afectaron la SLE en las mujeres (Fig. 32).

También se observó que los varones en el grupo de riesgo citogenético intermedio con al menos una deleción de *GST* tenían una SLE significativamente más corta que aquellos con *GSTM1T1* no delecionado (30% frente a 73%, respectivamente;  $P = 0.03$ ). De nuevo, no se encontró ninguna diferencia significativa en mujeres.



**Figura 32.** La presencia de al menos una deleción *GST* tiene un valor pronóstico negativo para la SLE en varones (A) pero no modifica el pronóstico en mujeres (B).

El análisis de la significación de las deleciones de *GST*, se consideró por separado la incidencia de la muerte en remisión y la SLR. La frecuencia de la muerte en remisión era significativamente más alta en pacientes con *delGSTM1* comparado con aquellos sin la deleción *GSTM1* (20% frente a 5%, respectivamente;  $P = 0.05$ ) o en aquellos que albergaban por lo menos una deleción de *GST* comparado con aquellos con *GSTM1* y *GSTT1* no delecionados (19% frente a 0%, respectivamente;  $P = 0.01$ ; Fig. 33).



**Figura 33.** La incidencia de muertes en remisión es significativamente mayor en pacientes *delGSTM1* que en aquellos que no presentan la delección (A). Los pacientes con al menos una delección *GST* presentan una mayor incidencia de muertes en remisión que aquellos sin la delección (B).

No se encontraron diferencias en la SLR entre las delecciones de *GST* y los genes *GSTM1T1* no delecionados, aunque los hombres con *delGSTM1* ( $P = 0.06$ ) o con al menos una delección de *GST* ( $P = 0.08$ ) mostraron una tendencia a una SLR más corta en relación con el genotipo no deleccionado de *GST* en los hombres. El análisis multivariante de la regresión de Cox incluyendo la edad, género, número de ciclos de tratamiento para alcanzar la RC, subtipo FAB, leucocitos, grupo de riesgo citogenético, *delGSTM1*, y *GSTM1T1* no deleccionados mostró que la edad mayor de 60 años ( $P = 0.002$ ) era un factor pronóstico independiente único para SLE (Tabla 36). Sin embargo, el análisis multivariante considerando la interacción entre *delGSTM1* y el sexo mostró que los varones con *delGSTM1* tendían a tener un peor pronóstico ( $P = 0.09$ ) (Tabla 37).

**Tabla 37.- Análisis multivariante**

	N (%)	Nº eventos (%)	Análisis multivariante	
			RR (95% IC)	P
<b>Edad</b>				
≥60 vs <60	78(72.2) vs 30(27.8)	39±4% vs 18±4%	4.35 (2.29-8.27)	<b>0.0001</b>
<b>Cariotipo</b>				
Favorable vs intermedio vs alto	17(18.3) vs 70(75.3) vs 6(6.5)	59±10% vs 50±11% vs 20±11	-	-
<b>GSTM1</b>				
Deleción vs normal	58(53.7) vs 47(44.8)	28±6% vs 51±7%	-	-
<b>GSTM1T1</b>				
Cualquier deleción vs normal	21(20.2) vs 83(79.8)	30±7% vs 58±7%	-	-
<b>GSTM1*Sexo</b>				
Deleción vs normal	29(49.2) vs 30(50.8)	28±11% vs 57±9%	1.34 (0.94-1.97)	0.09

N: número de pacientes que entran en RC

Eventos: recaída o muerte en RC

\*Interacción

# **DISCUSIÓN**



Las enzimas metabolizadoras de drogas, carcinógenos y tóxicos ambientales son capaces de degradar sustancias químicas exógenas (xenobióticos) a los cuales se exponen los seres vivos. Constituyen la primera línea de defensa para evitar el ingreso de sustancias potencialmente nocivas al interior del organismo y se caracterizan por su amplia especificidad de sustrato, son fácilmente inducibles o inhibibles por los propios xenobióticos y presentan un alto grado de polimorfismo genético. Estas variaciones genéticas en combinación con la exposición a tóxicos podrían conferir un mayor riesgo a desarrollar leucemia especialmente en los niños, debido a la exposición diferencial y/o inmadurez fisiológica, o en pacientes con cáncer sometidos a tratamiento citotóxico intensivo.

En el presente trabajo, nos hemos planteado determinar la posible asociación entre la susceptibilidad a la leucemia y una serie de polimorfismos genéticos en enzimas metabolizantes de citotóxicos (*CYP1A1\*2A*, *CYP2E1\*5B*, *CYP3A4\*1B*, *delGSTM1*, *delGSTT1*, *NQO1\*2*, *MTHFR C677T* y *TS 2R3R*) en tres grupos de pacientes: 78 con LS/SMDs, 317 con LMA *de novo* y 162 con LLA; y un grupo control formado por 454 individuos sanos. Por otra parte, se ha estudiado el valor pronóstico de los polimorfismos *NQO1\*2*, *CYP1A1\*2A*, *delGSTM1* y *delGSTT1* en 147 pacientes con LMA *de novo*, para evaluar su repercusión en la eficacia del tratamiento inicial.

## 1. POLIMORFISMOS EN ENZIMAS METABOLIZANTES DE DROGAS Y RIESGO DE SMDS/LS

El análisis de los polimorfismos *CYP1A1\*2A*, *CYP2E1\*5B*, *CYP3A4\*1B*, *delGSTM1*, *delGSTT1*, *NQO1\*2*, *MTHFR677T* y *TS 2R3R* ha mostrado que el haplotipo *CYP1A1\*2A*, *delGSTT1* y *NQO1\*2* modifica fuertemente el riesgo de SMDS/LS<sup>147</sup> (OR = 18.41; 95% IC =1.6-212.77; *P* = 0.02). Así, la presencia de los tres polimorfismos aumenta 18 veces este riesgo. Estos polimorfismos han sido asociados individualmente con el desarrollo de SMDS/LS en estudios previos<sup>55,70,93,148,149,150,151</sup>, tal y como se discute a continuación.

El aumento de actividad enzimática causada por la presencia del polimorfismo *CYP1A1\*2A* aumentaría la producción de agentes electrofílicos y, como consecuencia, podría contribuir al acúmulo de cambios genéticos. La implicación de *CYP1A1\*2A* en SMDS/LS no se ha demostrado en ningún trabajo previo, pero sí se ha relacionado con la susceptibilidad a desarrollar LLA<sup>148</sup> y LMA *de novo*<sup>149</sup>.

La ausencia de actividad enzimática, producida por la presencia de los polimorfismos *delGSTM1* y *delGSTT1*, implicaría una detoxificación deteriorada y por lo tanto un acúmulo de determinadas drogas quimioterápicas. En ese sentido, Sasai y cols.<sup>93</sup>, en un estudio de pacientes japoneses, ha demostrado una asociación estadísticamente significativa entre *delGSTT1* y el riesgo de desarrollar SMDS/LS (OR = 4.62; 95%IC=1.48-14.4). Por otra parte, Haase y cols.<sup>150</sup> refieren que la combinación entre *delGSTM1* y *delGSTT1* está asociada con el riesgo de

SMDS/LS después de recibir quimioterapia por cáncer de mama. En nuestro análisis, aunque encontramos una mayor incidencia de *delGSTT1* en el grupo de SMDS/LS que en el GC, el resultado no es estadísticamente significativo. Las diferencias entre nuestros resultados y los mencionados anteriormente, podrían deberse al número de pacientes y de controles, que es menor que en nuestro estudio (2 a 5 veces menos en el grupo de SMDS/LS y de 2 a 10 veces menos en el GC).

La disminución de la actividad enzimática causada por la presencia del polimorfismo *NQO1\*2*, favorece el aumento de benceno y de las especies reactivas de oxígeno en el organismo, dañando así las células. Dos estudios realizados en adultos de diferentes grupos étnicos han encontrado una asociación entre *NQO1\*2* y predisposición a SMDS/LS<sup>55,70</sup>. Asimismo, se ha publicado que los pacientes con SMDS/LS tienen una proporción significativamente mayor de individuos homocigotos y heterocigotos para el alelo *NQO1\*2* comparado con la población control, y la homocigosis para *NQO1\*2* confiere un aumento de 2.6 veces el riesgo de desarrollar un SMDS/LS<sup>55</sup>. Además, se ha observado que el polimorfismo está altamente asociado con anomalías características de las LS en los cromosomas 5 y/o 7<sup>70</sup>. En este sentido, Fern y cols.<sup>150</sup> proponen que los pacientes con actividad *NQO1* reducida, tratados con dosis estándar de quimioterapia, estarían más expuestos a un acortamiento de los telómeros y un posible desarrollo de hematopoyesis clonal y, como consecuencia, estos pacientes estarían más expuestos a desarrollar SMDS/LS. En nuestro trabajo, aunque la asociación entre *NQO1\*2* y la predisposición a desarrollar SMDS/LS no alcanza la significación estadística, la incidencia de *NQO1\*2* es mayor en el grupo SMDS/LS que en el grupo control (47.3% vs. 35.8%). Estas

diferencias también pueden ser debidas a diferencias étnicas, dado que en la población asiática, la frecuencia de este polimorfismo es mayor que en la población caucásica ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)).

A la vista de nuestros resultados, aunque los polimorfismos analizados individualmente no se han visto asociados con SMDS/LS, la combinación de *CYP1A1\*2A*, *delGSTT1* y *NQO1\*2* aumenta significativamente el riesgo de SMDS/LS, lo que sustentaría la hipótesis de que el riesgo a desarrollar leucemia es una compleja interacción entre múltiples variantes genéticas de baja penetrancia.

Este trabajo junto con el publicado por Guillem y cols.<sup>151</sup>, son los que reúnen las series más largas de SMDS/LS, en las que se demuestra la influencia de variantes genéticas en el desarrollo de la leucemia. Guillem y cols.<sup>151</sup> demuestran que los polimorfismos *MTHFR C677T* y *A1298C* están implicados en el riesgo de desarrollar SMDS/LS, sobre todo en pacientes que han padecido cáncer de mama y pacientes con malignidades hematológicas que han recibido ciclofosfamida. Estos resultados no se confirman en nuestro estudio.

No es sencillo relacionar algunas influencias genéticas con el desarrollo de SMDS/LS debido a la heterogeneidad de los tratamientos. Además, se debe considerar que algunas variantes alélicas pueden estar en desequilibrio de ligamiento y/o pueden existir posibles interacciones genéticas entre alelos polimórficos de varios genes de reparación del ADN.

Por último, la representación excesiva de una variante en SMDS/LS podría reflejar la predisposición conferida por la variante a la malignidad primaria. Una variante podría aumentar la tasa de supervivencia tras

terapia por una malignidad primaria aumentando la eficacia de la muerte de la célula tumoral, y a su vez dañando la célula progenitora hematopoyética en la médula ósea. Ambas podrían desajustar los trabajos de interacción genética en SMDS/LS.

## **2. POSIBLE EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS EN ENZIMAS METABOLIZANTES EN EL RIESGO DE DESARROLLAR UNA LEUCEMIA AGUDA**

### **2.1 POLIMORFISMOS Y RIESGO DE DESARROLLAR LMA**

Nuestros resultados muestran que los polimorfismos *delGSTT1* y *NQO1\*2* se asocian con un mayor riesgo de padecer LMA<sup>152</sup>. Así, la mayor incidencia del polimorfismo *delGSTT1* que elimina por completo la actividad de la enzima GSTT1 ha sido referida por otros autores en relación con el riesgo de LMA. En diferentes trabajos<sup>89,150,153-155</sup>, este polimorfismo se asocia con el riesgo de desarrollar una LMA, y este riesgo aumenta si se analiza en combinación con *delGSTM1*. Además se ha asociado *delGSTT1* con el riesgo de LMA en combinación con *CYP1A1\*4*<sup>50</sup>. Por el contrario, Chauhan y cols.<sup>156</sup> han encontrado una mayor incidencia de *delGSTT1* en el grupo control que en el grupo de LMA, y aunque no alcanza la significación estadística, sugieren que podría tener un papel protector en el desarrollo de la LMA.

El análisis de los polimorfismos genéticos en relación con las características clínico-biológicas, muestra que el polimorfismo *CYP2E1\*5B* es más frecuente en pacientes del subtipo FAB M3. Al separar el análisis por sexo, el polimorfismo *delGSTM1* es 6 veces más frecuente en mujeres del

subtipo FAB M2 que en los varones del mismo subtipo. En la literatura, se ha relacionado *delGSTM1* en niños con el subtipo FAB M3 y M4<sup>157</sup> y en adultos con los subtipos M0, M1, M3 y M6<sup>89</sup>, aunque las estimaciones del riesgo de LMA son poco elevadas y los extremos del intervalo de confianza se solapan.

Los varones con el subtipo FAB M3 y homocigotos para *NQO1\*2* muestran un aumento de riesgo de desarrollar una LMA que no se observa en las mujeres. Reynolds y cols.<sup>158</sup> han publicado que la mieloperoxidasa (MPO) presenta un polimorfismo *MPO\*2* (G-642A) en la región promotora que está sobrerrepresentado en pacientes con los subtipos FAB M3 y M4. El genotipo *MPO\*2* aumenta la expresión de MPO y cooperaría con la homocigosidad *NQO1\*2*, aumentando así la susceptibilidad a envenenamiento por benceno<sup>72</sup>.

Es conocido que la incidencia de la leucemia aguda es más frecuente en varones que en mujeres; en este sentido, en nuestro estudio se ha obtenido una predominancia clara de LMA en varones menores de 30 años y mayores de 50 años, mientras que la enfermedad es más prevalente en mujeres entre 30 y 50 años. Del mismo modo, nuestros resultados sugieren que la mayor susceptibilidad de LMA conferida por *NQO1\*2* en varones, sobre todo los que son del subtipo FAB M3, con respecto a las mujeres, podría ayudar a explicar el aumento de riesgo en desarrollar una leucemia en los varones.

Uno de los polimorfismos estudiados que no se relaciona con LMA en nuestro trabajo pero sí ha sido referido por otros autores es *delGSTM1*. Se ha asociado con LMA solo<sup>155</sup> o en combinación con otros polimorfismos, *delGSTT1*<sup>155</sup>, *CYP1A1\*2A*, *CYP2D6*<sup>153,159</sup>, y *NAT2\*6B*<sup>160</sup>. La diferencia entre nuestros resultados y los publicados puede deberse en parte al número de pacientes y de controles que es menor que el de nuestro trabajo. Dado que *delGSTM1* tiene el mismo efecto sobre la actividad enzimática que *delGSTT1*, podríamos esperar una asociación entre *delGSTM1* y la susceptibilidad a desarrollar una LMA. Pero, debemos de tener en cuenta que el 50% de la población normal presenta el polimorfismo, por lo tanto es difícil encontrar diferencias entre los pacientes y los sujetos sanos.

En nuestro trabajo, el polimorfismo *CYP1A1\*2A* parece tener un papel protector en las mujeres. Un trabajo sobre leucemias agudas en niños<sup>85</sup> demuestran que siendo *CYP1A1\*2A* más frecuente en el grupo control, disminuye el riesgo de desarrollar una leucemia aguda no linfoblásica (LANL), lo que podría sugerir que el genotipo homocigoto, o heterocigoto en nuestro caso, podría estar ligado a factores asociados con la reducción del riesgo de desarrollar una LANL en las mujeres.

## **2.2 POLIMORFISMOS Y RIESGO DE DESARROLLAR LLA**

Al igual que en las LMA *de novo*, nuestros resultados apuntan a que los polimorfismos *delGSTT1* y *NQO1\*2* están implicados en el desarrollo de LLA. Así, hemos encontrado que el genotipo *delGSTT1* está asociado con un aumento del riesgo a desarrollar LLA. Sin embargo, en un meta-análisis

realizado en trabajos que analizan la posible relación entre *delGSTT1* y riesgo de LLA<sup>148</sup>, no se ha encontrado relación de este polimorfismo con el riesgo de LLA. Esta discrepancia podría explicarse en parte debido a las diferencias de edad de las poblaciones estudiadas. En nuestro estudio, los sujetos son sobre todo adultos, mientras que en la mayoría de los diferentes trabajos son niños<sup>51,86,62,81,95,161</sup>. Por otra parte, la mayor incidencia de *delGSTT1* en nuestro estudio se ha encontrado únicamente en varones con LLA.

Asimismo, nuestros resultados para *NQO1\*2* en pacientes con LLA están de acuerdo con los resultados obtenidos en los pacientes con LMA del subtipo FAB M3. De modo, que la presencia de *NQO1\*2* aumenta el riesgo de LLA sólo en varones, pero no lo modifica en mujeres. Este aumento de riesgo conferido por la homocigosis de *NQO1\*2* encontrado en este trabajo está de acuerdo con algunos trabajos realizados en niños con LLA<sup>71,77,80,162</sup>. Además, se ha relacionado este polimorfismo con *CYP1A1\*2A* y *CYP1A1\*2B* en el desarrollo de LLA<sup>163</sup>.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo en los pacientes con LLA se han basado principalmente en pacientes adultos. Para este grupo de edad, Cartwright y cols.<sup>164</sup> han demostrado una clara predominancia de LLA en varones, mientras que la incidencia de LLA en niños es similar en niñas y en niños. A este respecto, nuestros hallazgos del aumento de riesgo de LLA en varones conferido por *delGSTT1* y, en particular, por *NQO1\*2*, proporciona una base genética para la alta incidencia de LLA observada en varones.

Dado que no existe una hipótesis ambiental actual para explicar la alta incidencia de leucemia aguda en varones, se podría suponer que las mujeres están mejor protegidas genéticamente que los varones frente a agentes tóxicos y ambientales que la causan. En este sentido, y si bien no lo hemos analizado en nuestra serie, un trabajo en Malasios<sup>165</sup> sugiere que podría existir un gen "sensible al sexo" localizado cerca del locus ABO en el cromosoma 9, que podría proteger a las mujeres del grupo sanguíneo O contra la leucemia aguda. Además, algunos resultados sugieren un posible papel de los esteroides en el control de la proliferación de las células leucémicas. Por ejemplo, se ha publicado que el efecto antiproliferativo del estradiol 17- $\beta$  en la línea celular U937 monoblástica humana es más potente que la de la testosterona<sup>166</sup>.

Uno de los polimorfismos implicados en el metabolismo del folato, *MTHFR C677T*, es menos frecuente en el grupo de LLA que en el grupo control, y por lo tanto esta diferencia podría indicar un papel protector de este polimorfismo en el riesgo de LLA. El papel de los polimorfismos genéticos *MTHFR C677T* y *A1298C* en la susceptibilidad a desarrollar una LLA, ha sido descrito tanto en niños como en adultos<sup>121,122,167,168</sup> aunque los resultados obtenidos por meta-análisis para *MTHFR C677T* no evidencian una relación entre el genotipo y el riesgo de LLA.

Por último, el polimorfismo *TS2R3R* que disminuye la cantidad de dTMP, necesario para la incorporación de timina durante la síntesis de ADN y favorece la incorporación de uracilo, desencadenando roturas de doble cadena y daño al ADN, en nuestro trabajo no se asocia con el riesgo a desarrollar LLA. Es más, contrariamente a lo esperado, los estudios

publicados por otros autores han descrito un papel protector de este polimorfismo en la LLA<sup>123,169-171</sup>.

### **3. VALOR PRONÓSTICO DE LOS POLIMORFISMOS EN LAS ENZIMAS METABOLIZANTES DE DROGAS**

Las enzimas metabolizantes de drogas son responsables de la activación y/o detoxificación de drogas citotóxicas. Por lo tanto, las variaciones genéticas en estas enzimas podrían explicar la variabilidad entre pacientes en las respuestas frente a la droga<sup>172</sup> y por tanto en el pronóstico. Por una parte una disminución o ausencia de la actividad enzimática en el metabolismo de las drogas quimioterápicas, podría favorecer un acúmulo de dichas drogas en el organismo provocando mayor toxicidad, y por el contrario si el polimorfismo causara un aumento de la actividad enzimática y del metabolismo de la droga disminuiría así la eficacia del tratamiento.

En nuestro estudio hemos encontrado que el número de alelos polimórficos *NQO1*\*2 influye en la respuesta a la terapia de inducción<sup>173</sup>. Probablemente debido al aumento de toxicidad por ausencia de actividad enzimática, se ha observado que la mayoría de los pacientes homocigotos para este polimorfismo no han alcanzado la remisión completa. *NQO1* es importante en la detoxificación de algunos metabolitos quimioterapéuticos y activador de agentes antitumorales bioeductivos como la mitomicina-C<sup>6,174</sup>. Las antraciclinas administradas en los protocolos de tratamiento para la LMA inducen una activación modesta de la enzima *NQO1* a través de la producción de especies reactivas de oxígeno. Teniendo en cuenta el papel detoxificante de *NQO1*, cabe esperar que los individuos heterocigotos, que tienen actividad enzimática intermedia o baja y los individuos homocigotos

que carecen de actividad, presenten un aumento de los efectos tóxicos debido a esta detoxificación reducida. En este trabajo, *NQO1*\*2 no tiene impacto en pacientes adultos con LMA que han alcanzado la remisión completa, a diferencia de un estudio<sup>175</sup> en niños con LMA en los que *NQO1*\*2 reduce la probabilidad de supervivencia.

Nuestros resultados indican que la presencia de al menos una deleción del gen *GST* está asociada con una baja SLE, debido a un aumento de la tasa de muertes en remisión, y este efecto es más significativo en los varones, es decir que los varones con *GST* no delecionado tienen una SLE significativamente mayor que los varones con al menos una deleción de *GST* (64% frente a 34%, respectivamente;  $P = 0.05$ ). Las enzimas *GST* tienen un papel muy importante en la detoxificación de drogas quimioterápicas incluyendo agentes alquilantes, doxorubicina y vincristina<sup>63</sup>. Los polimorfismos conducen a una ausencia de actividad enzimática y a una reducción de la detoxificación de drogas.

Esta detoxificación reducida podría producir dos efectos, por un lado un aumento en la toxicidad, aunque también podría asociarse con una mayor respuesta debido a una mayor biodisponibilidad de los agentes quimioterápicos. Estos efectos podrían ser más acentuados en los pacientes varones debido al papel del estradiol 17- $\beta$ . Los experimentos publicados por Sánchez y cols.<sup>176</sup>, sugieren que el estradiol potencia la expresión de *NQO1* y *GST*, dado que el complejo estradiol-receptor-estradiol se une a elementos de respuesta electrofílicos en los promotores de estos genes. Por lo tanto, las mujeres con el polimorfismo que anula la actividad enzimática *GST* podrían estar más protegidas que los varones, dado que el estradiol podría inducir la expresión de *NQO1*.

Nuestro trabajo ha demostrado que *delGSTM1* y *delGSTT1* no tienen ningún impacto en la respuesta al tratamiento de inducción, contrariamente a los resultados publicados por Voso y cols.<sup>38</sup> en el que los pacientes con al menos una delección *GST* tienen una baja probabilidad de alcanzar la remisión completa tras la inducción, debido a un aumento de muertes en la inducción, como también se ha demostrado en otros trabajos<sup>177-180</sup>.

Es difícil explicar el mecanismo específico por el cual los polimorfismos *delGSTM1* y *NQO1\*2* modifican la respuesta al tratamiento, debido al papel dual (activación y/o detoxificación) y al gran número de enzimas implicado en el metabolismo de drogas. Sin embargo, considerando que las drogas administradas en estos pacientes muestran una pequeña activación a través de las enzimas *NQO1* y *GST*, cabría esperar que los principales efectos se debieran a la actividad de detoxificación reducida de estas enzimas que confieren los polimorfismos.

Algunos trabajos han descrito que los pacientes *CYP1A1\*2A* con LMA<sup>148</sup> tienen una mayor tasa de muertes tras la inducción, aunque en nuestro trabajo no se haya confirmado. Las discrepancias entre nuestros resultados y los publicados por Voso y cols.<sup>148</sup> en pacientes con LMA podrían atribuirse a diferencias metodológicas y en la procedencia de los pacientes. Solo hemos considerado pacientes con LMA *de novo*, y las series de Voso y cols. incluyen pacientes con LMA *de novo* y secundarias. Por lo tanto, podríamos esperar algunas diferencias debido a los protocolos de tratamiento.

En conclusión, en nuestro estudio, la existencia de los polimorfismos *delGSTT1* y *NQO1\*2* se han visto implicados en el desarrollo de los tres tipos de leucemia. Esta combinación puede implicar la función de NQO1 y GSTT1 en la superposición de las vías del metabolismo de carcinógenos. Es posible que la diferencia interindividual en las actividades enzimáticas NQO1 y GSTT1 debida a los polimorfismos, conduzca a una diferencia en la cantidad de carcinógenos y/o aductos de ADN en las células leucémicas. Además, las deleciones *GST* y el polimorfismo *NQO1\*2* podrían conferir variabilidad interindividual en la respuesta al tratamiento en pacientes con LMA.

Aunque los datos parecen sugerir que ciertas variantes genéticas están implicadas en la susceptibilidad individual a desarrollar algún tipo particular de leucemia, los resultados deben ser tomados con cautela. Hoy en día, las técnicas de genotipado masivo de SNP mediante microarray permiten realizar estudios de asociación alélica a lo largo de todo el genoma (GWA), pudiendo así establecer la predisposición genética a ciertas enfermedades e identificar mutaciones y variantes que pueden explicar las diferencias entre las respuestas individuales ante las enfermedades y los tratamientos. Recientemente, se han publicado dos estudios GWA en LLA de niños y LS en los que se analizan miles de polimorfismos<sup>181,182</sup>. Los resultados confirman que existen variantes genéticas heredadas que contribuyen al riesgo de estas leucemias, aunque no se encuentra ninguna de las que se habían reportado en estudios previos individuales.

Diferencias genéticas en la regulación, expresión y actividad de las enzimas de fase I y II del metabolismo de xenobióticos, pueden ser factores cruciales para definir esta susceptibilidad, debido a la producción de mayor

o menor cantidad de metabolitos. Las investigaciones hasta ahora realizadas, muestran que genotipos o alelos asociados en un estudio con un proceso tumoral, en otro no lo están. Esta diferencia se podría explicar por tres razones: diferencias étnicas, que pueden producir variación en la expresión de enzimas que activan o inactivan carcinógenos; la falta de asociación debido al análisis de grupos muy pequeños, de diferentes grupos de edad o pruebas estadísticas inadecuadas para analizar bajas frecuencias en poblaciones; el ligamiento de polimorfismos, que pueden explicar más acertadamente la susceptibilidad a cáncer.

## **CONCLUSIONES**



Del análisis y discusión de los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1.** *NQO1\*2A* es el polimorfismo con mayor incidencia en SMDS/LS.
- 2.** La combinación de los haplotipos *CYP1A1\*2A*, *delGSTT1* y *NQO1\*2* aumenta significativamente el riesgo de desarrollar SMDS/LS, lo que demostraría que los alelos de baja penetrancia pueden cooperar para desarrollar SMDS/LS.
- 3.** En el grupo de pacientes con leucemia aguda *de novo*, el polimorfismo *CYP2E1\*5B* es más frecuente en pacientes del subtipo FAB M3, y *delGSTM1* en mujeres del subtipo FAB M2.
- 4.** Los polimorfismos *delGSTT1* y *NQO1\*2* se asocian con un mayor riesgo de padecer LMA y LLA.
- 5.** La susceptibilidad a desarrollar leucemia aguda conferida por los polimorfismos *delGSTT1* y *NQO1\*2*, se ha demostrado en varones, lo que supone que el sexo podría modificar el riesgo de desarrollar una leucemia aguda.
- 6.** El polimorfismo *CYP1A1\*2A* disminuye el riesgo de LMA en mujeres y el polimorfismo *MTHFR C677T* implicado en el metabolismo del folato, disminuye el riesgo de LLA, teniendo ambos así un papel protector.

**7.** Los polimorfismos en los genes que intervienen en el metabolismo de drogas como *NQO1\*2*, *delGSTM1* y *delGSTT1* se han asociado con SLE y con un mayor número de muertes en remisión completa. Este conocimiento podría condicionar la pauta terapéutica inicial.

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Camitta BM, Pullen J, Murphy S. Biology and treatment of acute lymphocytic leukemia in children. *Semin Oncol* 1997; 24:83-91.
2. Flandrin G. Classification of acute myeloid leukemias. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, May 2002.
3. Kosary CL, Gloeckler LA, Miller BA, Hankey BF, Harras A, Edwards BK, editors. SEER cancer statistics review, 1973-1992. Tables and graphs. National Cancer Institute. NIH Publ No 96-2789. Bethesda: National Institutes of Health, 1996.
4. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr opin Oncol* 2000; 12:3-12.
5. Phillips MJ, Cull GM, Ewings M. Establishing the incidence of myelodysplasia syndrome. *Br J Haematol* 1994; 88:896-897.
6. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Weatley K, Harrison C, Harrison G, Reses J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in acute myeloid leukemia: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukemia Working Parties. *Blood* 1998; 92:2322-2333.
7. Wheatley K, Burnett A, Goldstone A, Gray R, Hann I, Harrison C, Rees J, Stevens R, Walker H. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br J Haematol*. 1999;107:69-79.
8. Slovak M, Kopecky K, Cassileth P, Harrington D, Theil K, Mohamed A, Paietta E, Willman C, Head D, Rowe J, Forman S, Appelbaum F. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96:4075-4083.
9. Byrd J, Mrózek K, Dodge R, Carroll A, Edwards C, Arthur D, Pettenati M, Patil S, Rao K, Watson M, Koduru P, Moore J, Stone R, Mayer R, Feldman E, Davey F, Schiffer C, Larson R, Bloomfield C. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100:4325-4336.
10. Dean M. Cancer as a complex developmental disorder-nineteeth. Cornelius P. Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 1998; 58:5633-5636.

11. Greaves MF. Etiology of acute leukemia. *Lancet* 1997; 349:344-349.
12. Smith MT and Zang L. Biomarkers of leukemia risk: benzene as a model. *Environ Health Perspect* 1998; 106, Suppl. 4:937:946.
13. Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000; 464:65-76.
14. Hirvoen A. Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environ Health Perspect.*, 1999; 107(Suppl.1):37-47.
15. International Agency for Research on Cancer. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1 to 42. IARC monographs on the evaluation of carcinogenetic risk to humans, supplement 7. United Kingdom: International Agency for Research on Cancer 1987; 40-46.
16. Mike V, Meadows AT, D'Angiò GJ. Incidence of second malignant neoplasms in children: results of an international study. *Lancet* 1982; 2:1326-1331.
17. Brusamolino E, Anselmo AP, Klersy C, Santoro M, Orlandi E, Pagnucco G, Lughì F, Maurice-Enrici R, Baroni CD, Lazzarino M, Mandelli F, Bernasconi C. The risk of acute leukemia in patients treated for Hodgkin's disease is significantly higher after combined modality programs than after chemotherapy alone and is correlated with the extend radiotherapy and type and duration of chemotherapy: a case control study. *Haematologica* 1998; 83:812-823.
18. Diamandidou E, Buzdar AU, Smith TL, Frye D, Witjaksono M, Hortobagyi GN. Treatment-related leukemia in breast cancer patients treated with fluorouracil-doxorubicin-cyclophosphamide combination adjuvant chemotherapy: the University of Texas MD Anderson cancer center experience. *J Clin Oncol* 1996; 14:2722-2730.
19. Greene MH, Harris EL, Gershenson DM, Malkasian GD, Jr, Melton LJ, III, Dembo AJ, Bennett JM, Moloney WC, Boice JD, Jr. Melphalan may be a more potent leukemogen than cyclophosphamide. *Ann Intern Med* 1986; 105:360-367.
20. Haas JF, Kittelmann B, Mehnert WH, Staneczak W, Mohner M, Kaldor JM, Day NE. Risk of leukemia in ovarian tumor and breast cancer patients following treatment by cyclophosphamide. *Br J Cancer* 1987; 55:213-218.
21. Jansen JH, Löwenberg B: Acute promyelocytic leukemia with a PLZF-RARalpha fusion protein. *Semin Hematol* 2001;38 (1): 37-41.
22. König M, Reichel M, Marschalek R, et al.: A highly specific and sensitive fluorescence in situ hybridization assay for the detection of

- t(4;11)(q21;q23) and concurrent submicroscopic deletions in acute leukaemias. *Br J Haematol* 2002;116 (4): 758-64.
23. Kim HJ, Cho HI, Kim EC, et al.: A study on 289 consecutive Korean patients with acute leukaemias revealed fluorescence in situ hybridization detects the MLL translocation without cytogenetic evidence both initially and during follow-up. *Br J Haematol* 2002;119 (4): 930-9.
  24. Gilliland DG, Griffin JD: The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002;100 (5): 1532-42.
  25. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, et al.: Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* 2003;102 (1): 43-52.
  26. Olney HJ, Mitelman F, Johansson B, et al.: Unique balanced chromosome abnormalities in treatment-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33 (4): 413-23.
  27. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al.: The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001;98 (6): 1752-9.
  28. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, et al.: Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 2005;19 (8): 1345-9.
  29. Bowen DT, Frew ME, Rollinson S, Roddam PL, Dring A, Smith MT, Langabeer SE, Morgan GJ. CYP1A1\*2B (Val) allele is overrepresented in a subgroup of acute myeloid leukemia patients with poor-risk karyotype associated with NRAS mutation, but not associated with FLT3 internal tandem duplication. *Blood* 2003;101:2770-2774.
  30. Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 149-173.
  31. Goeptar AR, Sheerens H, Vermeulen NPE. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 1995; 25: 25-65.
  32. Capdevila J, Harris RC, Falck JR. Microsomal cytochrome P450 and eicosanoid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 780-789.

33. Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ, Vaz ADN. Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J* 1992; 6: 669-673.
34. Lenhinger (1984). *Principios de Bioquímica*, Omega, Barcelona.
35. Birch JM. Genes and cancer. *Archive of Disease in Childhood* 1999;80:1-6.
36. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshü A, Shinada N, Watanabe J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS Lett* 1990;263:131-133.
37. Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 1996;56:2965-2969.
38. Voso MT, D'Alo F, Putzulu R, Mele L, Scardocci A, Chiusolo P, Latagliata R, Lo-Coco F, Rutella S, Pagano L, Hohaus S, Leone G. Negative prognostic value of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) deletions in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;100:2703-2707.
39. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1225-1229.
40. Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winicki NJ, Cheung NKV, et al. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13176-13181.
41. Amirmani B, Walker AH, Weber BL, Rebbeck TR. RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1588-1590.
42. Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, et al. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III A5 (HLp3). *Mol Pharmacol* 1990;38:207-213.
43. Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. (<http://cypalleles.ki.se/>).
44. Tu YY & Yang, CS. High-affinity nitrosamine dealkylase system in rat liver microsomes and its induction by fasting. *Cancer Res.* 1983;42:623-629.
45. Yang CS, Tu YY, Koop DR, & Coon MJ. Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Res.* 1985;45:1140-1145.

46. Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Lett.* 1985;183:265-269.
47. Yoo JS, Guengerich FP, Yang CS. Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Cancer Res.* 1988;48:1499-1504.
48. Wrighton SA, Thomas PE, Molowa DT, Haniu M, Shively JE, Maines SL, Watkins PB, Parker G, Mendez-Picon G, Levin W, et al. Characterization of ethanol-inducible human liver N-nitrosodimethylamine demethylase. *Biochemistry.* 1986;25:6731-6735.
49. Watanabe J, Hayashi S, Nakachi K, Imai K, Suda Y, Sekine T, Kawajiri K. PstI and RsaI RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:7194.
50. D'Alò F, Voso MT, Guidi F, Massini G, Scardocci A, Sica S, Pagano L, Hohaus S, Leone G. Polymorphisms of CYP1A1 and glutathione S-transferase and susceptibility to adult acute myeloid leukaemia. *Haematologica* 2004; 89:664-670.
51. Krajinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: Influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood* 1999;93:1496-1501.
52. Walker AH, Jaffe JM, Gunasegaram S, Cummings SA, Huang CS, Chern HD, et al. Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk. *Hum Mutat* 1998;12: 289-293.
53. van Schaik RHN, de Wildt SN, van Iperen NM, Uitterlinden AG, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch Caucasians. *Clin Chem* 2000;46:1834-1836.
54. Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, Williams TL, Levin H, Klein EA, et al. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:901-905.
55. Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, Ino T, Utsunomiya A, Maruta A, Jin-nai I, Kamada N, Kubota Y, Nakamura H, Shimazaki C, Horiike S, Kodera Y, Saito H, Ueda R, Wiemels J, Ohno R. Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research* 2000; 6:4091-4095.

56. Aplenc R, Glatfelter W, Han P, Rappaport E, La M, Cnaan A, et al. CYP3A genotypes and treatment response in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2003;122:240–244.
57. Blanco JG, Edick MJ, Hancock ML, Winick NJ, Dervieux T, Amylon MD, et al. Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics* 2002;12:605–611.
58. Collado M, Barragán E, Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Colomer D, Munarriz B, et al. Lack of association of CYP3A4-V polymorphism with the risk of treatment-related leukemia [letter]. *Leuk Res* 2005;29:595–597.
59. Vijayakrishnan J and Houlston RS. Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Haematologica* 2010; 95:1405-1414.
60. Krajinovic M, Sinnnett H, Richer C, Labuda D, Sinnnett D. The role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibilities to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer* 2002; 97:230-236.
61. Aydin-Sayitoglu M, Hatirnaz O, Erensoy N, Ozbek U. Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias. *American Journal of Hematology* 2006; 81:162–170.
62. Krajinovic M, Labuda D, Mathonnet G, Labuda M, Moghrabi A, Champagne J, et al. Polymorphisms in genes coding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8: 802–810.
63. Rocha JC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH, et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;105:4752-4758.
64. Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science* 2004;306:1774–1776.
65. Traver RD, Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Danenberg PV, Ross D, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res* 1992;52:797–802.
66. Pan SS, Forrest GL, Akman SA, Hu LT. NAD(P)H: quinone oxidoreductase expression and mitomycin C resistance developed by human colon cancer HCT 116 cells. *Cancer Res* 1995;55:330-335.

67. Krajcinovic M. Further insight into the role of NQO1 in childhood leukemia. *Haematologica* 2005;90:1445.
68. Smith MT. Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7624–7626.
69. Edwards YH, Potter J, Hopkinson DA. Human FAD-dependent NAD(P)H diaphorase. *Biochem J* 1980;187:429–436.
70. Larson RA, Wang Y, Banerjee M, Wiemels J, Hartford C, Le Beau MM, Smith MT. Prevalence of the inactivating 609 C to T polymorphism in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood* 1999; 94:803–807.
71. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, Knight D, Sadakane Y, Isoyama K et al. Acute Lymphoblastic Leukemia The association of a distinctive allele of NAD(P)H:quinone oxidoreductase with pediatric acute lymphoblastic leukemias with MLL fusion genes in Japan. *Haematologica* 2005; 90:1511-1515.
72. Rothman N; Smith MT, Hayes RB, Traver RD, Hoener B, Campleman S et al. Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with NQO1 609C>T variation and rapid functional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res* 1997; 57:2839–2842.
73. Kelly KM, Perentesis JP. Polymorphisms of drug metabolizing enzymes and markers of genotoxicity to identify patients with Hodgkin's lymphoma at risk of treatment-related complications. *Ann Oncol* 2002;13(Suppl 1):34–39.
74. Wan J, Shi J, Hui L, Wu D, Jin X, Zhao N, et al. Association of genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 genes with benzene poisoning. *Envir Health Pers* 2002;110:1213–1218.
75. Moran JL, Siegel D, Ross D. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96;8150–8155.
76. Radjendirane V, Joseph P, Lee Y, Kimura S, Klein-Szantoi AJP, Gonzalez FJ, et al. Disruption of the DT diaphorase (NQO1) gene in mice leads to increased menadione toxicity. *J Biol Chem* 1998;273:7382–7389.
77. Smith MT, Wang Y, Skibola CF, Slaler DJ, Lo Nigro L, Nowell PC, et al. Low NAD(p)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL tyranlocations in infants and children. *Blood* 2002;100:4590-3.

78. Wiemels JL, Pagnamenta A, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. A lack of a functional NAD(P)H: Quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. *Cancer Res* 1999;59:4095–9.
79. Smith MT, Wang Y, Kane E, Rollinson S, Wiemels JL, Roman E, et al. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood* 2001;97:1422–1426.
80. Alves S, Amorim A, Ferreira F, Norton L, Prata MJ. The GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children from north Portugal. *Leukemia* 2002;16:1565–1567.
81. Kracht T, Schrappe M, Strehl S, Reiter A, Elsner H-A, Trka J, et al. NQO1 C609T polymorphism in distinct entities of pediatric hematologic neoplasms. *Haematologica* 2004;89:1492-1497.
82. Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are because of a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7293–7297.
83. Sprenger R, Schlagenhauer R, Kerb R, Bruhn C, Brockmoller J, Roots I, et al. Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype–phenotype correlation. *Pharmacogenetics* 2000;10:557–565.
84. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 1997;272:10004–10012.
85. Balta G, Yuksek N, Ozyurek E, Ertem U, Hicsonmez G, Altay C, et al. Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematol* 2003;73:154–160.
86. Allan JM, Wild ChP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, et al. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy induced leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11592–11597.
87. Seedhouse C, Faulkner R, Ashraf N, Das-Gupta E, Russell N. Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10:2675–2680.

88. Wilson MH, Grant PJ, Hardie LJ, Wild CP. Glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a decreased risk of myocardial infarction. *FASEB J* 2000;14:791–796.
89. Rollinson S, Roddam P, Kane E, Roman E, Cartwright R, Jack A, Morgan GJ. Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia. *Carcinogenesis* 2000; 21:43–47.
90. Gonzalez CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 2002;100:249–260.
91. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997;18:641–644.
92. Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, et al. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet* 1996;347:295–297.
93. Sasai Y, Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Kobayashi M, Fujii H, Kashima K, Taniwaki M. Genotype of glutathione S-transferase and other configurations in myelodysplasia. *Leukemia Research* 1999;23:975–981.
94. Atoyebi W, Kusec R, Fidler C, Peto TE, Boulwood J, Wainscoat JS. Glutathione S-transferase gene deletions in myelodysplasia. *Lancet* 1997;349:1450–1451.
95. Davies SM, Bhatia S, Ross JA, Kiffmeyer WR, Gaynon PS, Radloff GA, et al. Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100:67–71.
96. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Radloff GA, Ross JA, Perentesis JP. Glutathione S-transferase polymorphisms in children with myeloid leukemia: a Children's Cancer Group study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:563–566.
97. Joseph T, Kusumakumary P, Chacko P, Abraham A, Pillai MR. DNA repair gene XRCC1 polymorphism in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett.* 2005 217:17–24.
98. Yuille M, Condie A, Hudson C, Kote-Jarai Z, Stone E, Eeles R, et al. Relationship between glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:4216–4218.

99. Saadat I, Saadat M. The glutathione S-transferase mu polymorphism and susceptibility to acute lymphocytic leukemia. *Cancer Lett* 2000;158:43–45.
100. Zheng Y, Honglin S. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: A systematic review and meta-analysis *European Journal of Cancer* 41 (2005) 980–989.
101. Stanulla M, Schrappe M, Müller-Brechlin A, Zimmermann M, Welte K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood* 2000;95:1222–1228.
102. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Tjoa T, Woods WG, Radloff GA, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute leukemia. *J Clin Oncol* 2001;19:1279–1287.
103. Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999;55:578–592.
104. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000;130:129–132.
105. Huang S. Histone methyltransferases, diet nutrients and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:469–476.
106. Duthie SJ, McMillan P. Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis. *Carcinogenesis* 1997;18:1709–1714.
107. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3290–3295.
108. Duthie SJ, Hawdon A. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. *FASEB J* 1998;12:1491–1497.
109. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195–200.
110. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Raymond A, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12810–12815.

111. Candelaria M, Taja-Chayeb L, Vidal-Millan S, Gutiérrez O, Serrano-Olvera A, Arce-Salinas C, Dueñas-González A. Importancia de la determinación de variantes genéticas que influyen en la eficacia y toxicidad farmacológica en oncología. *Cancerología* 2006;1: 57-70.
112. Engbersen AM, Franken DG, Boers GH, Stevens EM, Trijbels FJ, Blom HJ. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995;56:142–150.
113. de Franchis R, Sebastio G, Mandato C, Andria G, Mastroiacovo P. Spina bifida, 677T-->C mutation, and role of folate. *Lancet* 1995;346:1703.
114. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044–1051.
115. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169–172.
116. Bailey LB. Folate, Methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C→T polymorphism affect cancer risk: Intake recommendations. *J Nutr* 2003;133:3748S–3753S.
117. 5-Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 1988 Oct; 6(10):1653-1664.
118. Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* 1987 Apr 15; 47(8):2203-2206.
119. Marsh S, Ameyaw MM, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Hum Mutat* 2000;16:528.
120. Franco RF, Simoes BP, Tone LG, Gabelini SM, Zago MA, Falcao RP. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;115:616–618.
121. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexanderi FE, Mel F. Greaves, and United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4004–4009.

122. Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard M, Théorêt Y, Moghrabi A, et al. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:252–257.
123. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, Rollinson S, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:3786–3791.
124. Taub JW, Matherley LH, Ravindranath Y, Kaspers GJ, Rots MG, Zantwijk CH. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methotrexate activity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2002;16:764–765.
125. Aplenc R, Lange B. Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia [review]. *Br J Haematol* 2004;125:421–434.
126. Krajcinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrabi A. Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* 2004;4:66–72.
127. Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, et al. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 2001;98:231–234.
128. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Mechanisms of disease. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;350:1535–1548.
129. Krajcinovic M, Costea I, Chiasson S. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2002;359:1033–1034.
130. Lanciotti M, Dufour C, Corral L, Di Michele P, Pigullo S, De Rossi G, et al. Genetic polymorphism of NAD(P)H:quinone oxidoreductase is associated with an increased risk of infant acute lymphoblastic leukemia without MLL gene rearrangements. *Leukemia*. 2005 19:214–216.
131. Lauten M, Asgedom G, Welte K, Schrappe M, Stanulla M. Thymidylate synthase gene polymorphism and its association with relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003;88:353–354.
132. Preudhomme C, Nisse C, Hebbar M, Vanrumbeke M, Brizard A, Lai JL, et al. Glutathione S-transferase theta 1 gene defects in myelodysplastic syndromes and their correlation with karyotype and exposure to potential carcinogens. *Leukemia* 1997;11:1580–1582.

133. Flannery JT, Boice JD, Devesa SS, Kleinerman RA, Curtis RE, Fraumeni JF. Cancer registration in Connecticut and the study of multiple primary cancers, 1935-82. *Natl Cancer Inst Monogr* 1985; 68:13-24.
134. Levine EG, Bloomfield CD. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation and environmental exposure. *Semin Oncol* 1992; 19:47-84.
135. Harrison CN, Gregory W, Hudson GV, Devereux S, Goldstone AH, Hancock B, et al. High-dose BEAM chemotherapy with autologous haemopoietic stem cell transplantation for Hodgkin's disease is unlikely to be associated with a major increased risk of secondary MDS/AML. *Br J Cancer* 1999;81: 476-83.
136. Kollmannsberger C, Hartmann JT, Kanz L, Bokemeyer C. Risk of secondary myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome following standard-dose chemotherapy with stem cell support in patients with potentially curable malignancies (Review). *J cancer Res Clin oncol* 1998; 124:207-214.
137. Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, Bell DA. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet* 1996; 347:295-297.
138. Pedersen-Bjerggaard J, Andersen MK, Christiansen DH, Nerlov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99:1909-1912.
139. Harth V, Bruning T, Abel J, Koch B, Berg I, Sachinidis A, Bolt HM, Vetter H, Ko Y. Real-time genotyping of cytochrome P4501A1 A4889G and T6235C polymorphisms. *Mol Cell Probes*. 2001; 15:93-7.
140. Choi JY, Abel J, Neuhaus T, Ko Y, Harth V, Hamajima N, Tajima K, Yoo KY, Park SK, Noh DY, Han W, Choe KJ, Ahn SH, Kim SU, Hirvonen A, Kang D. Role of alcohol and genetic polymorphisms of CYP2E1 and ALDH2 in breast cancer development. *Pharmacogenetics*. 2003;13:67-72.
141. Von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No Influence of the *MDR-1* C3435T Polymorphism or a CYP3A4 Promoter Polymorphism (CYP3A4-V Allele) on Dose-adjusted Cyclosporin A Trough Concentrations or Rejection Incidence in Stable Renal Transplant Recipients. *Clinical Chemistry*. 2001;47:1048-1052.
142. Harth V, Donat S, Ko Y, Abel J, Vetter H, Bruning T. NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 codon 609 polymorphism and its association to colorectal cancer. *Arch Toxicol*. 2000, 73:528-31.
143. Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, Garcia-Foncillas J, Azinovic I, Martinez E, Illarramendi JJ, Arias F, Martinez Monge R, Salgado E, Angeletti S, Brugarolas A. Polymorphisms of the repeated sequences

- in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 15;19:1779-1786.
144. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimations from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-481.
  145. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966;50:163-170.
  146. Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *JR Stat Soc B*. 1972;34:187-220.
  147. Bolufer P, Collado M, Barragan E, Calasanz MJ, Colomer D, Tormo M, González M, Brunet S, Batlle M, Cervera J, Sanz MA. Profile of polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the risk of therapy-related leukaemia. *Br J Haematol*. 2007 Feb;136(4):590-596.
  148. Voso MT, D'Alo F, Guimero D, Guidi F, Hohaus S, Leone G. The CYP1A1\*2A allele is an independent prognostic factor for acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2005; 90:982-984.
  149. Haase D, Binder C, Bunger J, et al. Increased risk for therapy-associated hematologic malignancies in patients with carcinoma of the breast and combined homozygous gene deletions of glutathione transferases M1 and T1. *Leuk Res* 2002;26:249-254.
  150. Fern L, Pallis M, Ian Carter G, Seedhouse C, Russell N and Byrne J. Clonal haematopoiesis may occur after conventional chemotherapy and is associated with accelerated telomere shortening and defects in NQO1 pathway; possible mechanisms leading to an increased risk of t-AML/MDS. *British Journal of Haematology* 2004; 126:63-71.
  151. Guillem VM, Collado M, Terol MJ, Calasanz MJ, Esteve J, Gonzalez M, Sanzo C, Nomdedeu J, Bolufer P, Lluch A, Tormo M. Role of MTHFR (677, 1298) haplotype in the risk of developing secondary leukemia after treatment of breast cancer and hematological malignancies. *Leukemia*. 2007 Jul;21(7):1413-22. Epub 2007 May 3.
  152. Bolufer P, Barragan E, Collado M, Cervera J, Lopez JA, Sanz MA. The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *Haematologica*. 2007 Mar;92(3):308-314.
  153. Arruda VR, Lima CSP, Grignoli CRE, et al. Increased risk for acute myeloid leukemia individuals with glutathione S-transferase mu1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) gene defects. *Eur J Haematol* 2001; 66:383-388.
  154. Seedhouse C, Faulkner R, Ashraf N, et al. Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the

- risk of developing acute myeloid leukaemia. *Clin Cancer Res* 2004;10:2675-2680.
155. Das P, Sahik AP, Bammidi VK. Meta-analysis study of glutathione-S-transferases (GSTM1, GSTP1, and GSTT1) gene polymorphisms and risk of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2009;50:1345-1351.
  156. Chauhan PS, Ihsan R, Yadav DS, Mishra AK, Bhushan B, Soni A, Kaushal M, Devi TR, Saluja S, Gupta DK, Mittal V, Saxena S, Kapur S. Association of glutathione S-transferase, EPHX, and p53 codon 72 gene polymorphisms with adult acute myeloid leukaemia. *DNA Cell Biol* 2011;30:39-46.
  157. Stella M. Davies, Leslie L. Robison, Jonathan D. Buckley, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms in children with myeloid leukemia: A Children's Cancer Group Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:563-566.
  158. Reynolds WF, Chang E, Douer D, Ball ED, Kanda V. An allelic association implicates myeloperoxidase in the etiology of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1997; 90:2730-2737.
  159. Han-Chun C, Wei-xin H, Ping-xia L, Wen-kai L, Fang-zhi C, Zhou-zhou R, Xin-fa L, Ya-ping L, Yan-fei C. Genetic polymorphisms of metabolic enzymes CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 and acute leukaemia susceptibility. *European Journal of Cancer Prevention* 2008; 17:251-258.
  160. Sunipa M, Bama Charan M, Moloy G, Sarmistha D, Ashis M, Sarmila C, Uma B.D. Association of cytochrome P450, glutathione s-transferase and N-acetyl transferase 2 gene polymorphisms with incidence of acute myeloid leukaemia. *European Journal of Cancer Prevention* 2008; 17:125-132.
  161. Chen CL, Liu Q, Pui CH, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro R, et al. Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997; 99:1701-1707.
  162. Yamaguti GG, Lourenço GJ, Silveira VS, Tone LG, Lopes LF, Lima CS. Increased risk for acute lymphoblastic leukemia in children with cytochrome P450A1 (CYP1A1)- and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)-inherited gene variants. *Acta Haematol.* 2010;124(3):182-184.
  163. Shuster JJ, Wacker P, Pullen J, Humbert J, Land VJ, Mahoney DH, et al. Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1998; 16:2854-2863.

164. Cartwright RA, Gurney KA, Moorman AV. Sex ratios and the risks of haematological malignancies. *Br J Haematol* 2002; 118:1071-1077.
165. Jackson N, Menon BS, Zarina W, Zawawi N, Naing NN. Why is acute leukemia more common in males? A possible sex-determined risk linked to the ABO blood group genes. *Ann Hematol* 1999; 78:233-236.
166. Mossuz P, Cousin F, Castinel A, Chauvet M, Sotto MF, Polack B, et al. Effects of two sex steroids (17 beta estradiol and testosterone) on proliferation and clonal growth of the human monoblastic leukemia cell line, U937. *Leukemia Research* 1998; 22:1063-1072.
167. Pereira TV, Rudnicki M, Pereira AC, Pombo-de-Oliveira MS, Franco RF. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:1656-1963.
168. Zintzaras E, Koufakis T, Ziakas PD, Rodopoulo P, Giannouli S, Voulgarelis M. A meta-analysis of genotypes and haplotypes of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in acute lymphoblastic leucemia. *Eur J Epidemiol* 2006; 21:501-510.
169. de Jonge R, Tissing WJE, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJL, Lindemans J, Peters GJ, Pieters R. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009;113:2284-2289.
170. Koppen IJ, Hermans FJ, Kaspers GJ. Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 2009;148,:3-14.
171. Canalle R, Silveira VS, Alberto Scrideli C, Queiroz RG, Fernando Lopes L, Gonzaga Tone L. Impact of thymidylate synthase promoter and DNA repair gene polymorphisms on susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011 Apr 4. [Epub ahead of print].
172. Birch J.M. Genes and cancer. *Archive of Disease in Childhood* 1999;80:1-3.
173. Barragan E, Collado M, Cervera J, Martin G, Bolufer P, Roman J, Sanz MA. The GST deletions and NQO1\*2 polymorphism confers interindividual variability of response to treatment in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2007 Jul;31(7):947-953.
174. Powis, G. Free radical formation by antitumor quinones. *Free Radical Biology & Medicine* 1989;6:63-101.
175. Krajinovic, M., Labuda, D., Mathonnet, G., Labuda, M., Moghrabi, A., Champagne, J. & Sinnett, D. Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and

response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research* 2002;8: 802–810.

176. Sanchez, R.I., Mesia-Vela, S. & Kauffman, F.C. 2003 Induction of NAD(P)H quinone oxidoreductase and glutathione S-transferase activities in livers of female August-Copenhagen Irish rats treated chronically with estradiol: comparison with the Sprague-Dawley rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2003;87:199–206.
177. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Tjoa T, Woods WG, Radloff GA, Ross JA, Perentesis JP. Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *Journal Clinical Oncology* 2001;19:1279–1287.
178. Autrup JL, Hokland P, Pedersen L, Autrup H. Effect of glutathione S-transferases on the survival of patients with acute myeloid leukaemia. *Eur J Pharmacol* 2002; 438: 15–18.
179. Müller P, Asher N, Heled M, Bar Cohen S, Risch A, Rundb D. Polymorphisms in transporter and phase II metabolism genes as potential modifiers of the predisposition to and treatment outcome of de novo acute myeloid leukemia in Israeli ethnic groups. *Leukemia Research* 2008; 32:919–929.
180. Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N et al. Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy. *Leukemia* 2002; 16:203–208.
181. Knight JA, Skol AD, Shinde A, Hastings D, Walgren RA, Shao J, Tennant TR, Banerjee M, Allan JM, Le Beau MM, Larson RA, Graubert TA, Cox NJ, Onel K. Genome-wide association study to identify novel loci associated with therapy-related myeloid leukemia susceptibility. *Blood*. 2009 May 28;113(22):5575-5582.
182. Treviño LR, Yang W, French D, Hunger SP, Carroll WL, Devidas M, Willman C, Neale G, Downing J, Raimondi SC, Pui CH, Evans WE, Relling MV. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009 Sep;41(9):1001-1005.



**ANEXO**



Letter to the Editor

**Lack of association of *CYP3A4-V* polymorphism with the risk of treatment-related leukemia**

Preliminary reports related the genetic variations in activity of the enzymes of the phase I metabolism with the risk of cancer and treatment-related leukemia (TRL) caused by anticancer drugs. In fact, phase I metabolism by cytochrome P450 (CYP) enzymes convert many anticancer drugs to reac-

tive intermediates, some of which can damage DNA [1]. Thus in the promoter region of the *CYP3A4* gene has been discovered the A(-290)G polymorphism also known as *CYP3A4-V* [2]. The role of this polymorphism is controversial and initially it has been suggested that it could reduce transcription based on the low incidence of the polymorphism in prostate cancer [2] and in TRL/myelodysplastic syndrome (MDS) [3].

Table 1  
Features of the group of subjects with treatment-related leukemia/myelodysplastic syndrome

Patient no.	Gender	Primary cancer	Age at primary Dx.	<i>CYP3A4</i> substrate exposure	Interval from Dx. of primary tumor (year)	Secondary leukemia	Karyotype	Genotype W/V
147	M	NHL	35	VM26,VP16,IFOS	4.25	RAEB-t	46,XY,-7,+mar	W-W
264	M	Low grade lymphoma	63	CPM, VCR	6.26	RAEB-t	46,XY(15%)/45,XY,-7(85%)	W-W
276	F	Cervix cancer	67	IFOS	3.36	RAEB-t	46,XX	W-W
310	F	BC	75	CFM	7.13	RAEB-t	46,XX	W-W
139	M	Primary brain lymphoma	65	CPM, VCR	1.92	Biphenotypic leukemia	Trisomy 8+21deletion	W-W
151	M	NHL	54	CPM, VCR	4.16	M0	45,XY,-7,-21,+i(21) [9]	W-W
321	M	Bladder cancer	78	VBL	7.67	M1	46,XY	W-W
182	M	NHL	68	CPM, VCR	6.75	M2	46XX[6]/47,XX,der(3)add(3)(q25)?,del(5)(q13;q31),+der(5)del(5)(q13;q31),t(3;12)(q21;p13),-18,+mar[cp14]	W-W
216	F	BC	44	CPM	3.11	M2	47,XX,+8	W-W
250	M	Ewing sarcoma	28	VCR	6.93	M2	45,XY,t(8;21)(q22;q22)	W-W
137	M	NHL	61	CPM, VCR	6.20	M2	del(1)(p31) + Monosomy 7	W-W
141	F	BC	62	VP-16	2.21	M3	NA	W-W
144	F	NHL	63	CPM,VCR,VP-16,IFOS	3.83	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q11)	W-W
140	F	Mantle cell lymphoma	51	CPM, VCR, IFOS	1.42	M4	46,XX,t(8;16)(p11;p13)	W-W
145	F	NHL	57	CPM, VCR	8.84	M4	46,XX,t815;17)(q22;q11)	W-V
146	M	SCLC	65	VP-16	1.12	M4	46,XY,inv(16)(p13;q22)/	W-W
149	M	CLL	41	CPM,VCR	7.70	M4	45,XY,-4,del(5)(q?),-7,del(13)(q?),del(15)(q?),-17,+mar2/45,XY,del(5)(q?),-7,-17,+mar2	W-W
218	F	BC	40	CPM	5.36	M4	46,XX	W-W
6038	M	Ewing sarcoma	7	VP-16, IFOS	3.10	M4	NA	W-W
6033	F	Follicular lymphoma	30	CPM, VCR	3.27	M4Eo	46, XX, t(16;16)	W-W
217	F	Fallopian tube adenocarcinoma	69	CPM	2.94	M6	NA	W-W
220	M	HL	44	VBL,CPM,VCR	6.63	pre-B	46,XY/FISH:tetrasomy 22 (53%)	W-W
206	M	HL	54	VBL	8.97	LMA(NC)	46,XY	W-W

Abbreviations: Dx.: diagnosis; BC: breast cancer; SCLC: small cell lung cancer; HL: Hodgkin-lymphoma; NHL: non Hodgkin-lymphoma; CLL: chronic lymphocytic leukaemia; NA: not available; W: wild type ;V: *CYP3A4-V* variant; CPM: cyclophosphamide; IFOS: ifosphamide; VBL: vinblastine; VM26: teniposide; VP16: etoposide; VCR: vincristine; NC: not classified; RAEB-t: refractory anemia with excess blasts in transition.

We investigated if *CYP3A4-V* polymorphism conferred a high risk to acute leukaemia (AL) and TRL/MDS in Spanish Caucasian population.

The *CYP3A4-V* polymorphism was studied in 215 de novo AL: 51 with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and 164 with acute myeloid leukemia (AML; three M0, 18 M1, 27 M2, 86 M3, three M3v, 11 M4, 10 M5, three M6, and three M7), and 23 patients with TRL/MDS. All TRL/MDS patients had been treated with anticancer drugs metabolised by *CYP3A4* (Table 1). We also included a control group for de novo AL (AL-CG) of 173 healthy volunteers matched in age and gender with de novo AL, and another for TRL/MDS (TRL/MDS-CG) of 25 subjects treated with chemotherapy who remained disease-free for a median follow-up of 17 years (range: 9–26 years).

The *CYP3A4-V* polymorphism was assessed by real time PCR in the LightCycler (Roche) following the method of Von Ahlsen et al. [4].

The *CYP3A4-V* polymorphism showed a mean frequency of 9% for both control groups [two heterozygous (het) in 25 subjects (8%) and 14 het and two homozygous (hom) in 173 subjects (9.2%) for TRL/MDS-CG and AL-CG, respectively] and in the de novo AL patients [three hom and 14 het in 215 patients (7.9%)], consistent with the frequency reported for Caucasians [2,5,6]. However, the frequency of *V* polymorphism represented 4.5% (one het out of 23) of the TRL/MDS. Differences in the incidence of *CYP3A4-V* between the TRL/MDS and de novo AL or control groups were not statistically significant in agreement with the results reported in children by Blanco et al. [7].

Conversely to our results, Felix et al. [3] reported similar incidence for *V* polymorphism in the group of TRL/MDS but found a statistical significant difference with the group of de novo leukemia. This was due to the higher incidence of *V* polymorphism in the de novo AL than the reported here (19% versus 9%), probably due to the inclusion of non-Caucasian in de novo AL subjects of that study.

However, the lack of association of *V* allele with TRL/MDS of the present study is not unexpected. Thus, the concrete role of the polymorphism remains to be elucidated. Hence although experiments based on the measurement of enzymatic activity in liver samples suggested that the *CYP3A4-V* had no effect on transcription [8]. On the contrary, other experiments indicate that *V* allele increases transcription as compared with *CYP3A4-W* [9]. In conclusion our results indicate that the *CYP3A4-V* allele does not seem to be relevant to a predisposition to TRL/MDS in Caucasian population.

#### Acknowledgement

This study has been supported by the Spanish FIS project PI020180

#### References

- [1] Friche E, Danks MK, Beck WT. Characterization of tumor cell resistance to 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin developed in Ehrlich ascites cells in vivo. *Cancer Res* 1992;52:5701–6.
- [2] Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in *CYP3A4*. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1225–9.
- [3] Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung NV, et al. Association of *CYP3A4* genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13176–81.
- [4] Von Ahlsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a *CYP3A4* promoter polymorphism (*CYP3A4-V* allele) on dose-adjusted cyclosporin A through concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 2001;47:1048–52.
- [5] van Schaik RHN, de Wildt SN, van Iperen NM, Uitterlinden AG, van den Anker JN, Lindemans J. *CYP3A4-V* polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch caucasians. *Clin Chem* 2000;46:1834–6.
- [6] Zeigler-Johnson CM, Walker AH, Mancke B, Spangler E, Jalloh M, Mc Bridge S, et al. Ethnic differences in the frequency of prostate cancer susceptibility alleles at SRD5A2 and *CYP3A4*. *Hum Hered* 2002;54:13–21.
- [7] Blanco JG, Edick MJ, Hancock ML, Winick NJ, Dervieux T, Amylon MD, et al. Genetic polymorphisms in *CYP3A5*, *CYP3A4* and *NQO1* in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics* 2002;12:605–11.
- [8] Ando Y, Tateishi T, Sekido Y, Yamamoto T, Satoh T, Hasegawa Y, et al. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in *CYP3A4*. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1587–90.
- [9] Amirmani B, Walker AH, Weber BL, Rebbeck TR. RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in *CYP3A4*. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1588–90.

María Collado

Eva Barragan

Pascual Bolufer\*

Laboratory of Molecular Biology

Department of Medical Biopathology

Hospital Universitario La Fe

Valencia, Spain

\* Corresponding author

Tel.: +34 961973351; fax: +34 91 806 1206

E-mail address: bolufer\_pas@gva.es

(P. Bolufer)

María J. Calasanz

María J. Larrayoz

Departamento de Genética

Universidad de Navarra

Pamplona, Spain

Dolors Colomer

Department of Hematology

Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Blanca Munarriz

Medical Oncology

Hospital Universitario La Fe

Valencia, Spain

Amparo Verdeguer  
*Pediatric Oncology, Hospital  
Pediátrico: Hospital Universitario  
La Fe, Valencia, Spain*

Antonio Gutierrez  
*Service of Hematology  
Hospital Son Dureta  
Palma de Mallorca, Spain*

Montserrat Batlle  
*Service of Hematology, Hospital Universitari  
Germans Trias i Pujol, Badalona  
(Barcelona), Spain*

Miguel A. Sanz  
*Clinical hematology, Servicio de Hematología  
Hospital Universitario La Fe  
Valencia, Spain*

Available online 12 January 2005





Review

Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression

Pascual Bolufer<sup>a,\*</sup>, Eva Barragan<sup>a</sup>, Maria Collado<sup>a</sup>, José Cervera<sup>b</sup>, José-Antonio López<sup>c</sup>, Miguel A. Sanz<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Molecular Biology, Department of Medical Biopathology, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Clinical Hematology (Service of Hematology), Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain

Received 9 January 2006; received in revised form 9 January 2006; accepted 30 January 2006

Abstract

**Background:** Recent studies have provided evidence that common genetic variations with low penetrance could account for a proportion of leukemia and could also influence disease outcome, although the results obtained are still controversial.

**Material and methods:** We reviewed 54 recent reports focused on the contribution of genetic polymorphisms to the risk of developing leukemia and to disease progression. The polymorphisms of genes encoding drug-metabolising enzymes (CYP family, NQO1, GSTT1, GSTM1, GSTP1), enzymes involved in folate metabolism (MTHFR, TYMS, SHMT1, MTRR), and DNA repair enzymes (XPD, XPG, RAD51, XRCC1, XRCC3, CHEK2, ATM) were considered in the review.

**Results:** There was a good agreement on the influence of NQO1\*2 polymorphism and those of the enzymes involved in DNA repair with the increased risk of therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome. Most studies found a strong association between the polymorphisms MTHFR, C677T or A1298C, and NQO1\*2 or \*3 and the risk of acute lymphoblastic leukemia (ALL). In addition, most of the studies reported an association between GSTT1 deletions and an increased risk of de novo acute myeloid leukemia. In ALL, polymorphisms in the genes of folate metabolism are associated with poor prognosis, and the 3R3R TYMS polymorphism in particular is associated with methotrexate resistance.

**Conclusion:** The reports reviewed support the hypothesis that several low-penetrance genes with multiplicative effects together with dietary effects, ambient exposition, and individual immune system responses, may account for the risk of leukaemia.

© 2006 Published by Elsevier Ltd.

**Keywords:** Polymorphisms; Genetic predisposition; Leukemia; Therapy-related leukemia; Risk

Contents

1. Quinone oxoreductase ..... 1472
1.1. NQO1\*2 in treatment-related leukemia/myelodysplastic syndrome ..... 1473
1.2. NQO1\*2 in de novo acute leukemia ..... 1474
2. Myeloperoxidase ..... 1480
3. Glutathione S-transferases ..... 1480
3.1. Treatment-related leukemia/myelodysplastic syndrome ..... 1482

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CR, complete remission; DSB, double strand breaks; EFS, event free survival; FAB, French–American–British Cooperative Group; hom, homozygous; het, heterozygous; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; HR, hazard ratio; HRC, homologous recombination; MDS, myelodysplastic syndrome; MMR, mismatch repair; MRC, Medical Research Council; MTX, methotrexate; NER, nucleotide excision DNA repair; OR, odds ratio; OS, overall survival; t-AML, therapy-related AML; t-MDS, therapy-related myelodysplastic syndrome
\* Corresponding author. Tel.: +34 961973351; fax: +34 961973351.

E-mail address: bolufer\_pas@gva.es (P. Bolufer).

3.2.	Pediatric acute lymphoblastic leukemia .....	1482
3.3.	Outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia .....	1482
3.4.	Acute myeloblastic leukemia .....	1482
3.5.	Outcome of acute myeloblastic leukemia .....	1482
3.6.	Lymphocytic leukemia .....	1484
4.	Cytochromes .....	1484
4.1.	CYPs polymorphisms and leukemia .....	1485
4.2.	CYPs polymorphisms and disease outcome .....	1485
5.	Polymorphisms in genes involved in folate metabolism .....	1485
5.1.	Polymorphisms of the genes of folate metabolism and acute leukemia .....	1486
5.2.	Polymorphisms of the genes of folate metabolism and disease outcome .....	1486
6.	DNA repair genes .....	1487
6.1.	DNA repair gene/polymorphisms in acute leukemia .....	1487
7.	Concluding remarks .....	1488
8.	Databases consulted .....	1488
	Acknowledgment .....	1488
	References .....	1488

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common acute leukemia (AL) in adults, with a median incidence of 2.4 cases per 100,000 inhabitants [1]. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common form of leukemia in childhood, accounting for about 30–50 new cases per million children [2] and represents 25–30% of all childhood malignancies [3–5].

The incidence of AL, particularly AML, occurring as a second tumor has increased because of the rising numbers of long-term survivors of cancer [6–11]. Therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome (t-AML/t-MDS) accounts for about 10–20% of all cases of AML [12]. The cumulative risk of developing t-AML/t-MDS at 10 years after the start of chemotherapy for breast cancer, non-Hodgkin's lymphoma, ovarian cancer, or Hodgkin's disease has been estimated at 1.5%, 7.9%, 8.5%, and 3.8%, respectively [6,13–15]. Molecular epidemiological studies have begun to provide new insights into the genetic background of patients developing AL and t-AML/t-MDS, and this is the focus of this review [6,16].

While the clinical and biological aspects of leukemia are well documented, little is known about the factors that condition an individual's susceptibility to leukemia. Highly penetrating mutations account for a reduced incidence of leukemia [17], but it is very likely that normal polymorphic variations of several genes together with dietary effects, ambient exposure to carcinogens and individual immune system characteristics could be factors predisposing to develop leukemia [18].

Genetic polymorphisms in the drug metabolizing enzymes are extremely common and may contribute to the risk of developing secondary cancers. These polymorphisms could explain differences in the way at which the individuals metabolise the chemical agents [19]. They are generally not associated with a dramatically increased risk of developing leukemia when considered in isolation from other etiological factors or exposure to chemotherapy, but they may act as risk factors of low penetrance in the development of secondary

malignancies [20]. Among these genetic factors, several polymorphisms in the genes coding for enzymes involved in the metabolism of drugs, ambient toxics and xenobiotics have been reported. Studies have involved polymorphisms in the genes coding for P450 cytochromes (CYPs) involved in phase I of metabolism (oxidation/activation), glutathione *S*-methyl transferase (*GST*) implicated in phase II of metabolism (conjugation/detoxification), and quinone oxoreductase (*NQO1*), which acts in free radical metabolism/oxidative stress (Table 1).

The variations in activity of the genes implicated in the folic acid metabolism, such as that for methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR*), which plays an indirect role in the accurate DNA synthesis (Table 1), could also have an important role in leukemia susceptibility.

Lastly, several studies have evaluated the relevance of the variations on the genes coding for the DNA repair machinery, such as *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *XRCC1*, *XRCC3*, *XPD*, *XPG*, *CHEK2* and *ATM* (Table 1), which can produce genome instability.

## 1. Quinone oxoreductase

Quinone oxoreductase, also called NAD(P)H, menadione oxidoreductase 1 or *NQO1*, is a flavoprotein that catalyzes a two-electron reduction. This enzyme converts the quinones derived from benzene into hydroquinones and has been associated with the hematotoxicity of benzene [21] and mytomicin C resistance [7,22].

Two polymorphisms in the *NQO1* gene have been described, the C609T and C465T substitutions, leading to P187S and R139W amino acid replacements, respectively (Table 1). Both variants affect the enzyme's function; C465T causes a diminution of enzyme activity, whereas the C609T causes a complete loss of enzyme activity [23].

In the early 1990s, Traver et al. [7] characterized the *NQO1* activity of cell lines derived from colon and lung cancer

[8]. The authors reported that BE and H596 cells, derived from colon and lung cancers, respectively, lacked NQO1 activity. The cDNA sequence of the gene obtained from BE cells revealed the presence of the C609T polymorphism, also known as *NQO1*\*2 (Table 1). This polymorphism causes a P187S substitution, which leads to a loss of function resulting from protein instability.

Edwards et al. in 1980 [9] reported that 4% of the UK population showed a complete absence of NQO1 activity. Homozygosity for this polymorphism has been detected in 4–5% of Caucasians and Afro-Americans, with a higher incidence among Hispanics [6] (Table 1). Homozygosity for this polymorphism was also detected in 20% of Chinese [8].

The *NQO1* C465T polymorphism, also called *NQO1*\*3, causes a diminution in enzyme activity as the result of alternative splicing, which leads the loss of exon 4 in *NQO1*\*3 mRNA and also posttranscriptional modifications [23].

The allele frequency of the *NQO1*\*3 polymorphism is 0.032 with 6.5% heterozygosity in Caucasians and the allele frequency is 0.019 with 3.7% heterozygosity among the Japanese [24].

NQO1 normally protects against benzene poisoning. Thus, a case–control study carried out in benzene-exposed workers in China showed an increased risk of hematotoxicity and leukemia in individuals who harboured *NQO1*\*2 allele

[8,10,20]. Homozygosity for *NQO1*\*2 combined with the high enzymatic activity of *CYP2E1* causes a 7.6-fold increase (95% CI, 1.8–31.2) of the risk of benzene poisoning [10]. Furthermore, when *NQO1*\*2 homozygosity is combined with tobacco smoking or alcohol consumption, the risk of benzene poisoning increases 8.15 times and 21.5 times relative to that of heterozygous and homozygous carriers of the wild-type allele, respectively [11].

Interestingly, normal bone marrow lacks NQO1 activity. However, the presence of high concentrations of the benzene metabolite hydroquinone induces it [13]. Likewise, bone marrow cells with wild type genotype (C/C) show increased NQO1 activity in response to hydroquinone; those homozygous for the polymorphism (T/T) do not show this response, and the heterozygous cells (C/T) show an intermediate response. On the other hand, menadione produces greater toxicity in mice carrying the NQO1 null genotype than in carriers of the wild type allele [14].

1.1. *NQO1*\*2 in treatment-related leukemia/myelodysplastic syndrome

Several studies carried out in adults in various ethnic groups found an association of the *NQO1*\*2 polymorphism with t-AML/t-MDS (Table 2). Significantly more patients with t-AML/t-MDS were homozygous or heterozygous for the *NQO1*\*2 allele than in controls [6,15]. Moreover, being

Table 1 Genetic polymorphisms studied in relation to leukaemia

Biological role	GENE (locus)	OMIN	Polymorphism	Effect	dbSNP ID / SNP500Cancer ID	Polymorphism frequency %	Biological effect	
Phase I metabolism	<i>CYP1A1</i> (15q22-q24)	108330	<i>CYP1A1</i> *2A T6235C(MspI) 3' UTR Ex 7			12-16	Increases expression	
			<i>CYP1A1</i> *2B A4889G	I462V	rs1048943/	8-9	Increases expression	
			<i>CYP1A1</i> *4 C4887A Ex-7	T461N	rs1799814/	10	Unknown	
	<i>CYP3A4</i> (7q22.1)	124010	<i>CYP3A4</i> *1B/V -A290G	Promotor	rs2740574/ CYP3A4-02	22	Possibly reduces expression	
	<i>CYP3A5</i> (7q22.1)	605325	<i>CYP3A5</i> *3 A-J	Induces splicing variants				Decreases enzymatic activity
			<i>CYP3A5</i> *6 14690G>A	Induces splicing variants			1-17	No effect or severely reduces expression
Phase II metabolism	<i>MPO</i> (17q23.1)	606989	<i>MPO</i> *2 -642G>A	Promotor	rs2333227/ MPO-02	44	Increases expression	
	<i>GSTM1</i> (1p13.3)	138350	del{GSTM1}	Deletion	----/ GSTM1-02	50	Abolishes expression	
	<i>GSTT1</i> (22q11.2)	600436	del{GSTT1}	Deletion	----/ GSTT1-02	41	Abolishes expression	
	<i>GSTP1</i> (11q13)	134660	<i>GSTP1</i> *B Ex5-24A>G	I105V	rs947894/ GSTP1-01	54	Decreases catalytic activity	
Free radicals/	<i>NQO1</i> (11q22.1)	125860	<i>NQO1</i> *2 C609T	P187S	rs1800566/ NQO1-01	48	Abolishes the enzymatic activity	
			<i>NQO1</i> *3 C465T	R139W	rs4986998/ NQO1-03	4	Decreases expression	

Table 1 (Continued)

Biological role	GENE (locus)	OMIN	Polymorphism	Effect	dbSNP ID/ SNP500Cancer ID	Polymorphism frequency %	Biological effect
<b>Folic acid metabolism</b>	<b>MTHFR</b> (1p36.3)	236250	A1298C Ex8 - 62A>C	E429A	rs1801131/ MTHFR-01	49	Decreases enzymatic activity
			C667T Ex5 + 79C>T	A222V	rs1801133/ MTHFR-02	51	Decreases cathalitic activity
	<b>SHMT1</b> (17p11.2)	182144	C1420T or C1444T	L435F	rs1979277/ SHMT1-01	38	Alters enzymatic activity
	<b>TYMS</b> (18p11.32)	188350	Ex12 + 138C>T 28 bp tandem repeats in 5'-UTR in multiples of two (2R) or three (3R)			38-54 (3R)	Increases expression
	<b>MTRR</b> (5p15.3-p15.2)	602568	A2756G	D919G		17	Alters enzymatic activity
	<b>MTHFD1</b> (14q24)	172460	A1958G	K134R	rs1950902	30	
<b>DNA repair genes</b>	<b>CHEK2</b> (22q12.1)	604373	1100delC Ex10			1.1	Abolishes kinase activity
	<b>RAD51</b> (15q15.1)	602774	-G135C 5'-UTR			11	Alters HRC
	<b>hMLH1</b> (3p21.3)	120436	Ex8-23A>G	I219V	rs1799977/ MLH1-02	23	MMR
	<b>hMSH2</b> (2p22-p21)	609309	IVS12-6C>T		rs2303428/ MSH2-03	15	MMR
	<b>XPD</b> (19q13.2-q13.3)	278730	Ex23+ 61A>C	K751Q	rs13181/ ERCC2-03	39	NER
			Ex6-22C>T	R194W	rs1799782/ XRCC1-03	23	HRC
	<b>XRCC1</b> (19q13.2)	194360	Ex10-4A>C	R399Q	rs25487/ XRCC1-01		HRC
			Ex9+16G>A	R280H	rs25489/ XRCC1-02		HRC
	<b>XRCC3</b> (14q32.3)	600675	Ex8-53C>T	T241M	rs861539/ XRCC3-01	35	HRC
	<b>ATM</b> (11q23)	607585	T1229C	V410A		0-2	HRC
T1744C			F582L		1-3	HRC	
		T4388G	F1463C		0-2	HRC	

HRC: homologous recombination; MMR: mismatch repair; NER: nucleotide excision DNA repair.

homozygous for *NQO1*\*2 conferred a 2.6-fold increase in the risk of developing t-AML compared with those carrying the wild-type allele [15]. Additionally, this polymorphism was strongly associated with t-AML carrying abnormalities of chromosomes 5 and/or 7 [6]. Contrary to the results observed in adults, a study of children with ALL undertaken by Blanco et al. [25] found no differences in the incidence of *NQO1*\*2 between patients with t-AML (53 patients with ALL who developed t-AML) and controls (215 patients with ALL who did not develop t-AML).

It could be concluded that the *NQO1*\*2 and \*3 polymorphisms are associated with an increased risk of t-AML/t-MDS. The discrepancies observed between adults and children may be attributable to many factors, particularly the therapy regimen used to treat the first tumor. More studies are required to resolve this controversy.

### 1.2. *NQO1*\*2 in de novo acute leukemia

The *NQO1*\*2 allele is more prevalent in children with ALL carrying mixed lineage leukemia (*MLL*) gene translocations (*MLL*-positive) than in controls ([32,33]; Table 3). Moreover, the presence of at least one *NQO1*\*2 allele conferred 2.7-fold increase in the risk of ALL/*MLL*-positive. Furthermore, children younger than 1 year with de novo leukemia *MLL*-positive were most likely to be heterozygous or homozygous for *NQO1*\*2 (OR > 10.8; 95% CI, 1.58– $\infty$ ;  $P=0.013$ ) [32]. In addition, individuals with ALL with the *NQO1*\*2 allele had also worse therapeutic outcome ([44]; Table 4). When in the Cox regression model were included demographic parameters, biological parameters, treatment protocol and type of population, the combination of *NQO1*\*2 and *CYP1A1*\*2A alleles appeared to be the

Table 2  
Polymorphisms and risks of developing therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome (t-AML/t-MDS)

Pathway	Gene	Polymorphism	Ethnic groups	Cases	Polymorphism frequency (%)	Controls	Polymorphism frequency (%)	OR	95% CI	P	References
Phase I metabolism	CYP3A4	*1B/V	White, Black, Hispanic	33	3	99 AML	19	0.07	0.0-0.7	0.05	Felix et al. [16]
			White	41	9.7	167	6.6	1.53	0.3-1.5	n.s.	Blanco et al. [25]
	Black	8	87.5	32	93.7	0.47	0.0-5.9	n.s.			
	Hispanic	4	25.0	23	39.1	0.52	0.1-5.8	n.s.			
	CYP3A4	*1B/V	Caucasian	23	4.5	173	8.0	n.r.	n.s.	Collado et al. [26]	
CYP3A5	*3	White	41	14.6	167	17.9	1.28	0.5-3.3	n.s.	Blanco et al. [25]	
		Black	8	87.5	31	93.5	2.07	0.2-26.2	n.s.		
		Hispanic	4	25.0	23	30.4	1.31	0.1-14.9	n.s.		
Phase II metabolism	GSTM1	deletion	Japanese	18	61	43	53	FET		n.s.	Sasai et al. [27]
			Japanese	58	44.8	150	51.3	0.77	0.0-1.7	n.s.	Naoe et al. [15]
			Caucasian	89	55	1022	49	1.31	0.8-2.0	n.s.	Alan et al. [28]
	GSTM1	deletion	Caucasian	42	54.7	175	49.5	0.98	0.5-2.0	n.s.	Seedhouse et al. [29]
			Japanese	18	67	43	30	FET		0.01	Sasai et al. [27]
	GSTT1	deletion	Japanese	58	46.6	150	54.0	0.74	0.0-1.6	n.s.	Naoe et al. [15]
	GSTT1	deletion	Caucasian	89	21	1022	14	1.79	1.0-3.1	n.s.	Alan et al. [28]
GSTP1	*B	Caucasian	89	63	1022	51	1.58	1.0-2.5	0.05	Alan et al. [28]	
Free radicals	NQO1	*2	Caucasian, Afro-american, Hispanic, Asian Adults	56	51.7	*Estimated	21.65 <sup>a</sup>	Chi-square		0.03	Larson et al. [8]
			Japanese Adults	58	24.1(hom) 72	150	10.6(hom) 58	2.62	2.2-3.1	0.002	Naoe et al. [15]
	NQO1	*2	White	41	44	160	35	1.45	0.7-2.9	n.s.	Blanco et al. [25]
Black	8	38	32	38	1.00	0.2-4.9	n.s.				
Hispanic Children	4	50	23	65	0.53	0.1-4.5	n.s.				
DNA repair	RAD51	135C	Caucasian	51	24	186	11	2.06	1.2-6.0	0.02	Seedhouse et al. [29]
	XRCC3	241M	Caucasian	44	47	175	54	1.44	0.7-2.9	n.s.	Seedhouse et al. [29]
	RAD51 & XRCC3	241M	Caucasian	44	47	175	54	8.11	2.2-29.7	0.002	Seedhouse et al. [29]
	XPD	K751Q	Caucasian	51 t-AML after chemotherapy	(33)K/K (41)K/Q (25)Q/Q	729	(42)K/K (43)K/Q (25)Q/Q	1.0 1.22 2.22	----- 0.6-2.4 1.0-4.7	<0.05	Allan et al. [30]
	hMSH2	IVS12-6C>T	Caucasian	16 t-AML after O <sup>6</sup> -guanine treatment	(62.5)TT (37.5)TC+CC	837	(86.2)TT (13.8)TC+CC	1.0 4.02	----- 1.4-11.4	0.03	Worilow et al. [31]

CI: confidence interval; ethnic groups: descriptors used in the original articles; FET: Fisher exact test; hom: homozygous; n.s.: not significant; OR: odds ratio; polymorphism frequency: % (homozygous + heterozygous).

<sup>a</sup>Estimated for the different ethnic groups.

Table 3  
Polymorphisms and risks of developing acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute leukemia (AL)

Pathway	Gene	Polymorphism	Ethnic groups	Cases	Polymorphism/genotypic frequency (%)	Controls	Polymorphism/genotypic frequency (%)	OR	95% CI	P	References
Phase I metabolism	<i>CYP1A1</i>	*2A	Caucasian (Turkish)	144 ALL & 33 ANLL (children)	16.7	185	16.9	0.99	0.6-1.6	n.s.	Balta et al. [34]
	<i>CYP1A1</i>	*2A	Caucasian	170 ALL (adult)	19.4	299	11.7	1.8	1.1-3.1	0.03	Krajnovic et al. [35]
	<i>CYP1A1</i>	*2B	Caucasian	170 ALL (adult)	7.3	299	8.0	0.9	0.4-1.8	n.s.	Krajnovic et al. [35]
	<i>CYP1A1</i>	*4	Caucasian	177 ALL (adult)	5.6	295	9.5	0.6	0.3-1.2	n.s.	Krajnovic et al. [35]
Phase II metabolism	<i>GSTM1</i>	deletion	Whites	163 ALL (children)	55.2 Whites	416	53.5	0.68	----	n.s.	Chen et al. [36]
			Blacks		41.2 Blacks		27.6	2.6		0.0005	
	<i>GSTM1</i>	deletion	Caucasian	177 ALL (children)	64	304	51.3	1.8	1.2-2.6	0.04	Krajnovic et al. [35]
	<i>GSTM1</i>	deletion	Caucasian	47 ALL (children)	88.1	102	49.0	2.2	1.1-4.5	0.035	Alves et al. [37]
	<i>GSTM1</i>	deletion	Whites	616 ALL Whites	54 Whites	532	54	FET	----	n.s.	Davies et al. [38]
			Blacks	35 ALL Blacks (children)	40 Blacks	201	32			n.s.	
	<i>GSTM1</i>	deletion	Caucasian (Turkish)	139 AL (children)	55.4	185	54.6	1.03	0.7-1.6	n.s.	Balta et al. [34]
	<i>GSTT1</i>	deletion	Whites	163 ALL(children)	14.1 Whites	416	15.0	FET		n.s.	Chen et al. [36]
			Blacks		35.3 Blacks		24.1				
	<i>GSTT1</i>	deletion	Caucasian	177 ALL(children)	15.9	304	17.2	0.9	0.5-1.5	n.s.	Krajnovic et al. [35]
	<i>GSTT1</i>	deletion	Caucasian	47 ALL (adults)	19.2	102	25.5	2.2	1.1-4.5	n.s.	Alves et al. [37]
	<i>GSTT1</i>	deletion	Whites	616 ALL Whites	16 Whites	532	16	FET		n.s.	Davies et al. [38]
			Blacks	35 ALL Blacks (children)	17 Blacks	201	28			n.s.	
	<i>GSTT1</i>	deletion	Caucasian (Turkish)	139 AL (children)	20.9	185	22.7	0.9	0.5-1.5	n.s.	Balta et al. [34]
	<i>GSTP1</i>	*B	Caucasian (Turkish)	139 AL (children)	44.1	185	44.3	1.16	0.7-2.0	n.s.	Balta et al. [34]

Table 3 (Continued)

Free radicals	<i>NQO1</i>	*2	Caucasian	39 MLL(+) AL (children)	61.5	56 MLL(-) de novo B-lineage ALL	39.3	2.77	1.2-6.6	0.033	Smith et al. [32]	
	<i>NQO1</i>	*2	British	36 (ALL and AML MLL(+)) (adults)	55	100 cord blood	33	2.54	1.1-6.0	0.015	Wiemels et al. [33].	
	<i>NQO1</i>	*2	Japanese	64 (49 ALL+ 15 AML, MLL +) (infants)	(59.1)ALL (56.0)MLL-AF4 (80)AML	185 cord blood	55.3	1.17 1.03 3.23	0.8-2.2 0.4-2.4 0.9-11.8	n.s. n.s. n.s.	Eguchi-Ishimae et al. [24]	
	<i>NQO1</i>	*2	Caucasian	138 infant ALL	(25.7)MLL/AF4(CT) (29.2)TEL/AML1(CT)	190	(66.3)CC (32.1)CT	0.79 0.92 1.42	0.4-1.7 0.5-1.7 0.4-3.8	.56 .79 .37	Kracht et al. [39]	
	<i>NQO1</i>	*2	Caucasian	50 infant ALL(32 MLL+ and 18 MLL-)	(38.7)BCR/ABL(CT) (72)CC+CT	106 cases of pediatric ALL 147 healthy controls	(38)CC+CT(147 healthy controls) CC+CT(106ALL)	4.22 5.72	1.4-12.5 1.7-16.0	0.008 0.002	Lanciotti et al. [40]	
	<i>NQO1</i>	*3	Japanese	64 (49 ALL+ 15 AML, MLL +) (infants)	(12.2)ALL (20.0)MLL-AF4 (0)AML	185 cord blood	3.7	3.55 6.36	1.1-11.1 1.8-21.9	0.02 0.001	Eguchi-Ishimae et al. [24]	
	Folic acid metabolism	<i>MTHFR</i>	A1298C	Caucasian	69 ALL (adult)	33.3 (AC) 1.5 (CC)	114	47.7 (AC) 9.6 (CC)	0.33 0.07	0.2-0.7 0.0-1.8	0.05 n.s.	Skibola et al. [41]
<i>MTHFR</i>		C677T	Caucasian	71 ALL(adult)	42 (CT) 7.2 (TT)	114	34.2 (CT) 12.3 (TT)	0.58 0.23	0.3-1.3 0.1-0.8	n.s. 0.05	Skibola et al. [41]	
<i>MTHFR</i>		C677T	Caucasian	71 ALL (children)	39.4 (CT) 8.4 (TT)	71	50.7 (CT) 18.3 (TT)	0.5 0.3	0.2-0.9 0.1-0.8	0.05 0.05	Franco et al. [42]	
<i>MTHFR</i>		A1298C	Caucasian	71 ALL (children)	47.8 (CT+TT) 42.2 (AC) 7.0 (CC) 49.2 (AC+CC)	71	69.0 (CT+TT) 39.4 (AC) 2.8 (CC) 42.2 (AC+CC)	1.3 2.8 1.3	0.7-7.6 0.5-15.6 0.7-2.6	n.s. n.s. n.s.	Franco et al. [42]	
<i>MTHFR</i>		C677T	Caucasian	37 MLL(+)(ALL (children)	21.6	200 healthy newborns	35.8	0.36	0.2-0.9	0.017	Wiemels et al. [43]	
<i>MTHFR</i>		A1298C	Caucasian	37 MLL(+)(ALL (children)	40.5	200 healthy newborns	32.4	1.14	0.5-2.7	n.s.	Wiemels et al. [43]	
<i>MTHFR</i>		C677T	Turkish	142 ALL (adults)	29	185	28	1.04	0.7-1.5	n.s.	Balta et al. [34]	
<i>MTHFR</i>		C677T	French-Canadian	270 ALL (children)	47 (CT) 11.5(TT)	300	42.7 (CT) 15.3 (TT)	1.1 0.8	0.8-1.6 0.4-1.3	n.s. n.s.	Krajinovic et al. [44]	
<i>MTHFR</i>		TT677/AA1298	French-Canadian	270 ALL (children)	11.5	300	15.3	0.4	0.2-0.9	0.02	Krajinovic et al. [44]	
<i>MTHFR</i>		CC677/CC1298	French-Canadian	270 ALL (children)	4.4	300	10.3	0.3	0.1-0.6	0.001	Krajinovic et al. [44]	
<i>MTHFR</i>		A1298C	French-Canadian	270 ALL (children)	39.8 (AC) 4.4 (CC)	300	39.7 (AC) 10.3 (CC)	0.9 0.4	0.6-1.3 0.2-0.8	n.s. n.s.	Krajinovic et al. [44]	
<i>TYMS</i>		2R3R	Caucasian	71 ALL (adults)	52.2 (2R/3R) 11.9 (3R/3R)	114	58.8 (2R/3R) 21.1 (3R/3R)	0.36 0.25	0.2-0.8 0.1-0.8	0.01 0.01	Skibola et al. [45]	
<i>SHMT1</i>		C1420T	Caucasian	71 ALL (adults)	36.6 (CT) 5.6 (TT)	114	44.7 (CT) 15.80 (TT)	0.48 0.31	0.3-0.9 0.1-0.9	0.02 0.031	Skibola et al. [45]	
<i>MTRR &amp; SHMT1</i>		2756AG & 1420CT/TT	Caucasian	71 ALL (adults)	36.6 (CT) 5.6 (TT)	114		0.18	0.1-0.6	0.008	Skibola et al. [45]	
DNA repair genes		<i>XRCC1</i>	399(R→Q), 194(R→W), 280(R→H)	Indian children	177 ALL(children)	Codon 399 13.6(Q/Q) 39.3(R/Q) 47.0(R/R)	117	Codon 399 8.0(Q/Q) 28.2(R/Q) 64.1(R/R)	2.42 1.90 1.00	1.0-5.9 1.1-3.4 Reference	0.05 0.03 Reference	Jopseph et al. [46]

ANLL: acute non-lymphocytic leukemia; CI: confidence interval; ethnic groups: descriptors used in the original articles; FET: Fisher exact test; n.s.: not significant; OR: odds ratio; Polymorphism frequency: % (homozygous + heterozygous).

Table 4  
Polymorphisms and outcomes for patients with ALL.

Pathway	Gene	Polymorphism	Ethnic groups	Event	Cases	Controls	OR	95% CI	P	References
Phase I metabolism	CYP1A1	*2A	French-Canadians	EFS	68 relapses	320 children in CR	2.3 <sup>a</sup>	1.1-4.9	0.003	Krajinovic et al. [47]
	CYP3A4	*1B	Non-African-American, African-American	Relapse	222 relapses	982 children in CR	1.9	0.6-2.2	n.s.	Aplenc et al. [48]
	CYP3A5	*3	Non-African-American, African-American	Relapse	222 relapses	982 children in CR	1.02	0.6-1.7	n.s.	Aplenc et al. [48]
	CYP3A5	*3	White, Blacks, Others	Adverse events: relapses, death in remission	47 relapses	246 children in CR			n.s.	Rocha et al. [50]
	CYP3A5	*6	Non-African-American, African-American	Relapse	222 relapses	982 children in CR	0.79	0.1-4.0	n.s.	Aplenc et al. [48]
Phase II metabolism	GSTM1	deletion	Caucasians	Relapse	64 relapses	64 children in CR	0.5	0.2-1.1	n.s.	Stanulla et al. [49]
	GSTM1	deletion	French-Canadians	EFS	68 relapses	247 children with ALL	1.1 <sup>a</sup>	0.6-2.1	n.s.	Krajinovic et al. [47]
	GSTM1	non-null	White, Blacks, Others	Adverse events: relapses, death in remission	47 relapses	246 children in CR	18.1 <sup>a</sup>	3.9-84.4	0.0002	Rocha et al. 2005 [50]
	GSTM1	deletion	White, Black, Hispanic, Asian	OS, EFS	132 relapses	710 ALL children (616 whites)	0.9 <sup>b</sup> , 0.9 <sup>b</sup>		n.s., n.s.	Davies et al. [38]
	GSTT1	deletion	Caucasians	Relapse	64 relapses	64 children in CR	0.36	0.1-1.0	0.048	Stanulla et al. [49]
	GSTT1	deletion	French-Canadians	EFS	68 relapses	231 children with ALL	1.1 <sup>a</sup>	0.4-3.1	n.s.	Krajinovic et al. [47]
	GSTT1	deletion	White, Black, Hispanic, Asian	OS, EFS	132 relapses	710 ALL children (616 whites)	1.2 <sup>b</sup> , 1.0 <sup>b</sup>		n.s., n.s.	Davies et al. [38]
	GSTP1	*B	Caucasians	Relapse	64 relapses	64 children in CR	0.33	0.1-1.2	0.099	Stanulla et al. [49]
Free radicals	NQO1	*2	French-Canadians	EFS	68 relapses	252 children in CR	3.6 <sup>a</sup>	1.7-7.4	0.001	Krajinovic et al. [47]

Table 4 (Continued)

Folic acid metabolism	<i>MTHFR</i>	C677T/ A1298C	French-Canadians	EFS	35 relapses	166 adults in CR	2.2 <sup>a</sup>	1.1-4.7	0.04	Krajinovic et al. [51]
	<i>MTHFD1</i>	A1958	French-Canadians	EFS	35 relapses	166 adults in CR	2.8 <sup>a</sup>	1.1-7.3	0.003	Krajinovic et al. [51]
	<i>TYMS</i>	2R3R	French-Canadian	Relapse or death	32 relapses	173 adults in CR	5.2	1.6-16.9	0.005	Krajinovic et al. [52]
	<i>TYMS</i>	3R3R vs others	French-Canadian	Relapse or death	40 Relapses	40 adults in CR	1.1	0.7-3.0	n.s.	Lauten et al. [53]
	<i>TYMS 3R/3R+ GSTM1 non-null</i>		White, Blacks Others	Relapse	47 adverse events (relapses, second malignancies, death in remission)	246 children in CR	14.5 <sup>a</sup>	2.5-85.2	0.0031	Rocha et al. [50]
DNA repair	<i>hMLH1</i>	I219/I219	French-Canadian	Relapse	67 relapses	252 adults in CR	1.6 <sup>a</sup>	0.8-3.4	n.s.	Krajinovic et al. [47]
	<i>hMLH1 &amp; CYP1A1*2A</i>	I219	French-Canadians	EFS	68 relapses	252 children in CR	5.6 <sup>a</sup>	1.9-16.8	0.0002	Krajinovic et al. [47]
	<i>XRCC1</i>	399(R → Q), 194(R → W), 280(R → H)	Indian children	n.r.	n.r.	n.r.	KM, Chi-square	n.r.	n.s.	Jopseph et al. [46]
	<i>XPD</i>	K751Q	341 patients MCR	DFS 12 month OS 12 month	(44)K/K(38) (36)K/Q(35) (16)Q/Q(23)		DFS 1.30 <sup>b</sup> OS 1.19 <sup>b</sup>	1.0-1.7 1.0-1.4	0.04 0.07	Allan et al. [30]

CI: confidence interval; CR: complete remission; EFS: event free survival; ethnic groups: descriptors used in the original articles; KM: Kaplan–Meier; OR: odds ratio; n.s.: not significant; n.r.: not reported; polymorphism frequency: % (homozygous + heterozygous).

<sup>a</sup>Hazard ratio.

<sup>b</sup>Relative risk.

best predictor of relapse ( $P < 0.03$  and  $0.001$ , respectively) [44].

In another study of infants, the inverse relationship between the *NQO1*\*2 polymorphism and *MLL* rearrangements was observed [40]. Only an association between the *NQO1*\*2 allele and ALL/*MLL*-negative patients was observed (Table 3). These differences were even more significant when the genotypes of ALL/*MLL*-negative infants were compared with those of all pediatric ALL patients ( $P = 0.002$ ) and with those of pediatric ALL/*MLL*-negative patients ( $P = 0.001$ ) (Table 3). The discrepancy was explained by the authors as being due to the age limit defined for the group of infants ( $\leq 1$  year), the selective influence of xenobiotics or toxins, ethnic factors, etc.

In contrast to previous reports, two case-control studies (one involving 108 Japanese infants with ALL [24], and the other, 138 patients with childhood ALL [39]), found no correlation between the *NQO1*\*2 allele and leukemia associated with *MLL* rearrangements or with *MLL*-negative ALL (Table 3). However, Eguchi-Ishimae et al. [24] found a strong association between the C465T variant and ALL/*MLL*-positive infants, particularly in those with the *MLL-AF4* rearrangement (Table 3).

The studies performed on adults with acute leukemia (mostly AML) showed a significantly higher incidence of the *NQO1*\*2 allele in the patients with leukemia than in controls ([54]; Table 5). Thus, the presence of the *NQO1*\*2 allele conferred an increase in the risk of both AML and ALL (OR = 1.5 and 1.9, respectively). Furthermore possessing the *NQO1*\*2 allele was associated with a particularly high incidence among those patients with AML harbouring inv(16) (OR = 8.1; 95% CI, 1.4–46.4).

In summary, most reports note that the *NQO1*\*2 and \*3 polymorphisms are associated with an increased risk of ALL. However, controversial issues remain, particularly with regard to the association with *MLL* rearrangements, which require clarification.

## 2. Myeloperoxidase

The neutrophil enzyme myeloperoxidase (*MPO*) metabolizes benzene to toxic quinones and free radicals [62], and its reactive by-products have been linked to DNA strand breakage, generation of carcinogens, and inhibition of DNA repair. The antimicrobial functions of *MPO* are linked to cytotoxic effects, such as DNA damage, which could lead to leukemogenesis [63].

The *MPO* database documents the  $-642G > A$  polymorphism also called *MPO*\*2 (Table 1). This polymorphism alters the binding of SP1 transcription factor [11], and increases enzyme expression [63]. The allele is over-represented in patients with AML-M3 and M4 FAB subtypes of leukemia, suggesting that higher levels of *MPO* are associated with an increased risk for this subset of leukemias [63,64]. Furthermore, it has been reported that *MPO*\*2

homozygosity cooperates with *NQO1*\*2, increasing susceptibility to benzene toxicity [10,20]. In contrast, Krajcinovic et al. [47] found no association between the *MPO*\*2 polymorphism and response to treatment in patients with childhood ALL.

The paucity of reports on this polymorphism prevents us from drawing any definitive conclusions.

## 3. Glutathione S-transferases

Glutathione *S*-transferases (GSTs) constitute a family of enzymes encoded by five gene families,  $\mu$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\alpha$  and  $\sigma$  (MIM 138350). These enzymes are involved in phase II metabolism and are implicated in the detoxification of a broad range of compounds, including xenobiotics, pesticides, environmental carcinogens, PAHs and some chemotherapeutic drugs (including alkylating agents, doxorubicin and vincristine) [20]. They catalyze the conjugation of electrophilic compounds to glutathione, a reaction that is sometimes the first step in the detoxification process leading to formation of mercapturic acid.

Functional polymorphisms have been reported in at least three of the genes that code for GSTs, including *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* (Table 1).

In the human *GSTT1* and *GSTM1* genes there is a widespread polymorphism, which consists in the complete deletion of the gene that causes the loss of enzymatic activity [37,65,66] (Table 1). The I105V *GSTP1* polymorphism, also called *GSTP1*\*B, causes the replacement of I for V in the electrophilic-binding active site of the GST- $\pi$  peptide [67] and affects the catalytic activity and thermal stability of the enzyme [28,34].

The *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms show broad differences in incidence among ethnic groups. Thus, the *GSTM1*-null polymorphism was found in 51–53% of ‘whites’ and 32% of ‘blacks’, whereas *GSTT1* was found in 15–17% of ‘whites’ and 28% of ‘blacks’ [19,29,32]. The I105V/*GSTP1*\*B polymorphism showed a mean incidence of 53.5% among the different ethnic groups and 51.6% in Caucasians (Table 1).

Polymorphisms within the *GST* genes are associated with susceptibility to non-malignant [68] and malignant diseases including AML [37,59,69–71]. Patients with a *GSTs*-null genotype are believed to exhibit impaired detoxification of environmental genotoxic agents and chemotherapeutic drugs, leading to an increased risk of developing primary and secondary cancers and treatment-related complications. Particularly, *GSTP1* conjugates and protects against the cytotoxic effects of some chemotherapeutic agents, including alkylating agents, anthracyclines and cyclophosphamide metabolites [55]. *GST* polymorphisms may thus contribute to susceptibility to t-AML/t-MDS following chemotherapy for primary malignancies.

Additionally, the role of GSTs in the detoxification of ambient carcinogens, such as benzopyrenes and other PAHs,

Table 5  
Polymorphisms and risk of developing acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome (AML/MDS)

Pathway	Gene	Polymorphism	Ethnic groups	Cases	Polymorphism /genotypic frequency (%)	Controls	Polymorphism /genotypic frequency (%)	OR	95% CI	P	References
Phase I metabolism	<i>CYP1A1</i>	*2B	Caucasian	53 AML with NRAS mutations (adults)	15.1	371 AML without NRAS mutations	7	2.36	1.0-5.5	0.05	Bowen et al. [18]
	<i>CYP1A1</i>	*2B	Caucasian	193 AML (adults)	7.3	273	9.2	n.r.	n.s.		D'Al6 et al. [55]
	<i>CYP1A1</i>	*4	Caucasian	193 AML (adults)	19.1	273	9.9	2.2	1.3-3.7	0.006	D'Al6 et al. [55]
	<i>CYP3A4</i>	*1B/V	Caucasian	215 AML (adults)	9.7	173	9.2	n.r.	n.s.		Collado et al. [26]
Phase II metabolism	<i>GSTM1</i>	deletion	Caucasian	92 MDS (adults)	42	201	48	0.8	0.5-1.3	n.s.	Chen et al. [56]
	<i>GSTM1</i>	deletion	Caucasian	166 MDS (adults)	55	112	48	0.89	0.5-1.4	n.s.	Atoyebi et al. [57]
	<i>GSTM1</i>	deletion	Japanese	116 MDS (adults)	55	43	53	0.80	0.6-2.4	n.s.	Sasai et al. [27]
	<i>GSTM1</i>	deletion	Caucasian	232 AML (children)	64	153	47	2.0	1.3-3.1	0.001	Atoyebi et al. [58]
	<i>GSTM1</i>	deletion	Caucasian	475 AML(adults)	54	826	49	1.24	1.0-1.6	= 0.05	Rollinson et al. [59]
	<i>GSTM1</i>	deletion	Caucasian	193 AML(adults)	43	273	47	--	----	n.s.	D'Al6 et al. [55]
	<i>GSTM1</i>	deletion	Caucasian	200 AML(adults)	50	177	44	1.28	0.8-2.0	n.s.	Seedhouse et al. [29]
	<i>GSTT1</i>	deletion	Caucasian	92 MDS (adults)	46	190	16	4.3	2.5-7.4	0.00001	Chen et al. [56]
	<i>GSTT1</i>	deletion	Caucasian	166 MDS (adults)	21	112	16	0.72	0.4-1.3	n.s.	Atoyebi et al. [57]
	<i>GSTT1</i>	deletion	Caucasian	174 MDS/16 t-AML(adults)	22	100(blood donors)	19	$\chi^2$		n.s.	Preudhomme et al. [61]
	<i>GSTT1</i>	deletion	Japanese	116 MDS (adults)	53	43	30	2.65	1.3-5.5	0.05	Sasai et al. [27]
	<i>GSTT1</i>	deletion	Caucasian	232 AML (children)	22	153	15	1.6	0.9-2.9	n.s.	Davies et al. [58]
	<i>GSTT1</i>	deletion	Caucasian	475 AML(adults)	19	826	15	1.32	1.0-1.8	= 0.05	Rollinson et al. [59]
	<i>GSTT1</i>	deletion	Caucasian	193 AML(adults)	29	273	19	1.7	1.1-2.7	0.02	D'Al6 et al. [55]
	<i>GSTP1</i>	*B	Caucasian	472 AML(adults)	13.9 (homo)	823	14 (hom)	0.94	0.7-1.3	n.s.	Rollinson et al. [59]
	<i>GSTP1</i>	*B	Caucasian NRAS mutations	53 AML(adults)	15.1	371	7	2.36	1.0-5.5	0.05	Bowden et al. [18]
Free radicals	<i>NQO1</i>	*2	Caucasians	420 AML and 67 ALL (adults)	41(hom+het)	838	32(hom+het)	1.49	1.2-1.9	0.05	Smith et al. [54]
Folic acid metabolism	<i>MTHFR</i>	C677T	Caucasian	237 AML(adults)	29.6 (CT)	377	35.2 (CT)	0.73	0.5-1.1	n.s.	Skibola et al. [41]
	<i>MTHFR</i>	A1298C			10.3 (TT) 44.5 (AC) 10.5 (CC)		11.7 (TT) 43.4 (AC) 11.0 (CC)	0.84 0.99 0.95	0.4-1.6 0.7-1.5 0.5-1.8	n.s. n.s. n.s.	
DNA repair	<i>RAD51</i>	135C	Caucasian	216 AML(adults)	17	186	11	1.6	0.9-2.9	n.s.	Seedhouse et al. [29]
	<i>XRCC3</i>	241M	Caucasian	216 AML(adults)	54	186	47	1.38	0.9-2.1	n.s.	Seedhouse et al. [29]
	<i>RAD51 &amp; XRCC3</i>	135C & 241M	Caucasian	216 AML(adults)	54	186	47	3.77	1.4-10.2	0.009	Seedhouse et al. [29]
	<i>XPD</i>	K751Q	Caucasian	420 de novo	(16)Q/Q (48)K/Q (38)K/K	729	(15)Q/Q (43)K/Q (42)K/K	1.22 1.20 1.0	0.8-1.8 0.9-1.6 ----	n.s. n.s. ----	Allan et al. [30]
	<i>XPD</i>	K751Q	White (116) Black(20) Hispanic(40) Asian(7) Other(9)	456 children with de novo AML	(37.1)AA (45.4)AC (17.6)CC	578 normal blood donors	(42.4)AA (44.9)AC (12.7)CC	$\chi^2$	n.s.	n.s.	Metha et al. [60]
	<i>hMSH2</i>	IVS12-6C>T	Caucasian	420 de novo AML(adults)	(84.3)TT (15.7)TC+CC	837	(86.2)TT (13.8)TC+CC	1.0 1.2	--- 0.1-1.6	n.s.	Worilow et al. [31]

CI: confidence interval; ethnic groups: descriptors used in the original articles; hom: homozygous; het: heterozygous; n.r.: not reported; n.s.: not significant; OR: odds ratio; polymorphism frequency: % (homozygous + heterozygous).

suggests the possible implication of *GST* polymorphisms in the development of de novo leukemia.

### 3.1. Treatment-related leukemia/myelodysplastic syndrome

The I105V/*GSTP1*\*B polymorphism is associated with t-AML/t-MDS, but not with de novo leukemia. A case–control study showed that individuals with at least one *GSTP1* V allele were significantly over-represented among the t-AML patients in relation to controls, suggesting an increased risk of developing t-AML ([28]; Table 2). Moreover, the presence of at least one V allele generates an increased risk of developing t-AML after chemotherapy in relation to individuals homozygous for I allele (OR=2.7; 95% CI, 1.4–5.1). Furthermore, the risk of developing t-AML is particularly increased (OR=4.3; 95% CI, 1.4–13.2) in patients treated with chemotherapeutic agents that act as substrates of the *GSTP1* enzyme, such as isophosphamide, busulfan or chlorambucil [28]. These promising results need to be confirmed by further studies.

Several studies have investigated the influence of *GSTM1* and *GSTT1*-null polymorphisms on the risk of developing t-AML/t-MDS ([15,27–29]; Table 2). Most of these studies did not find association of the *GSTM1* [15,27–29] or *GSTT1*-null polymorphism [15,28] with t-AML/t-MDS. However, in a study with a reduced number of Japanese subjects (18 cases and 43 controls), Sasai et al. [27] reported a significant association between the *GSTT1*-null genotype and t-AML/t-MDS (Table 2). Thus, the majority of studies reviewed here found no association between *GSTT1* or *GSTM1* deletions and the risk of t-AML/t-MDS.

### 3.2. Pediatric acute lymphoblastic leukemia

The results obtained for *GSTM1* are controversial and, whereas some studies shown association of the *GSTM1*-null genotype with an increased risk for pediatric ALL ([35,37]; Table 3) and that the *GSTT1* and *GSTM1*-null genotypes were more prevalent in ‘black’ children with ALL than in black controls (23.5% versus 3.9% in controls;  $P=0.0005$ ) [36], other reports [34,38] identified no association between the *GSTM1*-null genotype and ALL (Table 3). Overall, it seems that *GSTM1* might confer an increased risk of ALL, as supported by the majority of studies reviewed.

For the *GSTT1*-null genotype, all the studies reviewed ([34–38]; Table 3) confirmed the lack of association of this polymorphism with the risk of developing ALL.

### 3.3. Outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia

Several studies of *GSTs* genotypes and susceptibility to childhood ALL provided contradictory results. Thus, whereas Davies et al. [38], in a study carried out in one of the largest series (710 children with ALL treated by the Children’s Cancer Group), and Krajcinovic et al. [47] found

no differences in disease outcome according to *GSTs* genotype, particularly in terms of relapse rate. However, studies performed in shorter series ([49,50]; Table 4) reported that the patients with the *GSTT1* or *GSTM1* non-null genotypes had greater risk of hematological relapse as compared with the null genotype. Further studies are required to clarify this issue.

Stanulla et al. [49] found no association between the *GSTP1*\*B I105V polymorphism and disease outcome in children with ALL (Table 4).

### 3.4. Acute myeloblastic leukemia

Most of the studies performed in adults with AML/MDS found similar incidence of the *GSTM1*-null genotype in patients and controls ([27,29,55–57]; Table 5). In contrast, Rollinson et al. [59] found a weak association between the *GSTM1*-null genotype and a risk of AML. Seedhouse et al. [29] reported that the combination of the *GSTM1*-null genotype with polymorphisms of the DNA repair genes *RAD51*-135C and *XRCC3*-241M dramatically increases the risk of developing AML (OR = 15.3; 95% CI, 1.8–127.8;  $P=0.01$ ).

In children, Davies et al. [58], reported that the *GSTM1*-null genotype was significantly more prevalent in MDS or AML than in matched controls and that the *GSTM1*-null genotype was particularly associated with the M3 and M4, FAB subtypes.

Opposite results have been reported in children and adults for the *GSTT1*-null polymorphism. Thus, whereas Davies et al. ([58]; Table 5), in pediatric MDS/AML did not find association between the *GSTT1*-null and the risk of leukemia, the reports performed in adults showed a higher incidence of *GSTT1*-null genotype in cases than in controls [27,55,56], suggesting that the *GSTT1*-null genotype increases the risk of AML (Table 5). In addition, it was observed that combination of the *GSTT1*-null genotype with the cytochrome P450 polymorphisms *CYP1A1*\*2B and *CYP1A1*\*4 (see below) further increases the risk of developing AML (OR = 10.2; 95% CI, 1.2–83.9;  $P=0.01$ ; and OR = 7.0; 95% CI, 2.0–24.8;  $P=0.001$ , respectively) [46].

These contradictory results in adults do not allow us to draw any firm conclusions. However, the promising results observed in children, although based on a single report, should be confirmed by further studies.

### 3.5. Outcome of acute myeloblastic leukemia

Studies of children [72] and adults [69] have shown that the *GSTs* deletion has an unfavorable effect on outcomes in AML. Thus, investigations carried out in children with AML revealed that patients with the *GSTT1*-null genotype showed a significantly shorter OS than those with the *GSTT1* non-null genotype after intensive chemotherapy, including high-dose anthracycline and cytarabine ([72]; Table 6). Cox regression analysis, including demographic and biological parameters confirmed the increased risk of death of those

Table 6  
Polymorphisms and outcome of acute myeloid leukemia (AML)

Pathway	Gene	Polymorphism	Ethnic groups	Event	Cases	Controls	Comments	OR	95% CI	P	References
Phase II metabolism	<i>GSTM1</i>	deletion	White	OS	189 <i>GSTM1</i> null (children)	116 <i>GSTM1</i> non-null		KM	-----	0.05	Davies et al. [72]
	<i>GSTM1</i>	deletion	Caucasians	Resistance to induction	51 patients with <i>GSTM1</i> and/or <i>GSTT1</i> null genotype Adult AML	44 patients with non-null <i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i>	82% of patients with undelete genotype achieved CR vs. 61 % of those with deletions	4.7	1.2-18.1	0.02	Vosso et al. [69]
	<i>GSTM1</i>	deletion	Caucasians	OS	51 patients with <i>GSTM1</i> and/or <i>GSTT1</i> null genotype Adult AML	44 patients <i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i> non-null		2.4 <sup>a</sup>	1.2-4.9	0.02	Vosso et al. [69]
	<i>GSTT1</i>	deletion	White	OS	65 <i>GSTT1</i> null genotype (children)	240 <i>GSTT1</i> non-null	<i>GSTT1</i> deletion had reduced survival as compared with <i>GSTT1</i> undeleted	1.6 <sup>b</sup>	-----	0.02	Davies et al. [72]
	<i>GSTT1</i>	deletion	White	Relapse	30 <i>GSTT1</i> null genotype (children)	108 <i>GSTT1</i> non-null	The frequency of relapse from the end of induction to 5 years was similar for <i>GSTT1</i> undeleted or deleted	KM	-----	n.s.	Davies et al. [72]
	<i>GSTT1</i>	deletion	White	Death in remission	47 <i>GSTT1</i> null genotype (children)	172 <i>GSTT1</i> non-null	The frequency of death in remission was increased in <i>GSTT1</i> deletion	KM	-----	0.05	Davies et al. [72]
DNA repair	<i>XPD</i>	K751Q	White Black Hispanic	DFS 5 yeras OS 5 years	456 children AML	AA genotype	AC CC	KM		n.s.	Metha et al. [60]

CR: complete remission; DFS: disease free survival; KM: Kaplan-Meier; n.s.: not significant; OR: odds ratio; OS: overall survival.

<sup>a</sup>Hazard ratio.

<sup>b</sup>Relative risk.

carrying the *GSTT1*-null genotype. The incidence of death in remission was also increased in *GSTT1*-null patients owing to the greater sensitivity of these patients to the chemotherapy. However, the *GSTM1*-null genotype did not influence OS.

The study performed in adults with AML also concluded that *GSTs* deletions (*GSTT1*-null and *GSTM1*-null) predict a poor response to induction chemotherapy and, in consequence, to a shorter OS ([69]; Table 6). Moreover, multivariate analysis with the Cox regression model including cytogenetics confirmed *GSTs* deletions as independent prognostic factors for response to chemotherapy and OS ( $P = 0.01$ ). Consequently, determining the *GSTs*-null genotype would be of particular interest for those patients with intermediate cytogenetic risk who lack of other prognostic factors.

Once again, the paucity of data in this field indicates a need for more studies to establish reliable conclusions.

### 3.6. Lymphocytic leukemia

A case-control study performed on 138 patients with chronic lymphocytic leukemia (CCL) and 280 healthy controls found similar incidence for the *GSTT1* and *GSTM1*-null genotypes as for *GSTP1*-I/I homozygotes in cases and controls [73]. However, the concomitant presence of the three high-risk genotypes (*GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1*) increased the risk of developing CCL (OR = 2.8; 95% CI, 1.1–6.9). Regarding ALL, one study performed in adults reported a significantly higher frequency of the *GSTM1*-null genotype in the patients with ALL than in controls (55.3% versus 32%;  $P < 0.025$ ) [74]. Because they are based on only a few reports, these results require confirmation by further studies of larger series of patients.

## 4. Cytochromes

The *CYPs* genes, implicated in phase I metabolism, convert several antineoplastic agents into intermediate reactive metabolites, some of which can damage DNA [75]. There is an initial report on the genetic variations in the activity of these enzymes with the risk of developing secondary cancers and t-AML/t-MDS [16]. Polymorphisms of cytochromes *CYP1A1*, *CYP3A4*, and *CYP3A5* were studied to elucidate their possible contribution in the risk to leukemia (Table 1).

Polymorphisms in the *CYPs* genes have been associated with both increased or decreased risk of certain cancers because of over or under metabolism of carcinogens or drugs [19]. Thus, *CYPs* are implicated in the bioactivation of several chemical carcinogens and PAHs, some of which are found in cigarette smoke [76]. The oxidation of PAHs produces epoxides, intermediate metabolites with very reactive electrophilic groups, which can interact with DNA leading to the formation of adducts [55]. These epoxides damage the DNA unless they are transformed into hydrosoluble inactive metabolites by phase II enzymes.

The genetic predisposition to leukemia conferred by *CYP1A1* has mainly been investigated for the following polymorphisms: (a) *CYP1A1*\*2A located at nucleotide (nt) 1194 in the 3' untranslated region (UTR) of exon 7. It has been shown that this polymorphism increases *CYP* expression [77] (Table 1); (b) *CYP1A1*\*2B results in an I462V substitution located in the binding site of *CYP1A1*. This polymorphism is in linkage disequilibria with the T6235C allele of the same gene. This polymorphism enhances enzyme activity but its biological significance remains unknown; and (c) *CYP1A1*\*4 causes a T461N substitution in the vicinity of the A4889G polymorphism [78].

*CYP3A4* is the most abundant isoform of *CYP* in the adult human liver. It metabolizes numerous clinically, physiologically, and toxicologically important compounds. The liver's expression of *CYP3A4* varies 40-fold among individuals, and metabolism of *CYP3A4* substrates varies at least 10-fold in vivo. For *CYP3A4*, there are 38 different known polymorphisms (see *CYP* allele nomenclature). The *CYP3A4*-V polymorphism, also known as *CYP3A4*\*1B [69] (Table 1) consists of an A290G change in the promoter region [80]. The role of this polymorphism is controversial; it was initially suggested that it could reduce transcription based on the low incidence of the polymorphism in individuals with prostate cancer [80] and in t-AML/t-MDS [16]. However, studies based on luciferase expression of the hepatoblastoma cell line HepG2 transfected with the V promoter sequence indicate that, contrary to expectation, the V allele shows higher transcription than wild type allele [81].

*CYP3A5* is expressed polymorphically in 10–29% of adult livers [82]. *CYP3A* activity is the cumulative output of the family of *CYP3A* genes, including *CYP3A5*, which is polymorphically expressed at high levels in a minority of Caucasians [83]. *CYP3A5* represents at least half of the *CYP3A* content in the liver and jejunum of most individuals carrying a *CYP3A5*\*1 allele, and *CYP3A4* levels in those individuals appear to correlate with *CYP3A5* levels. *CYP3A5* has 22 polymorphic variants described (see *CYP* allele nomenclature). The *CYP3A5*\*3 and *CYP3A5*\*6 variants induce splice site variants that substantially decrease the hepatic content of *CYP3A* (Table 1). The *CYP3A5*\*1 allele produces a correctly spliced transcript and has allele frequencies of 0.15% and 0.45% in Caucasians and African-Americans, respectively; only individuals with at least one *CYP3A5*\*1 allele express *CYP3A5* at a high level [83].

The polymorphisms *CYP1A1*\*2A, *CYP1A1*\*2B, and *CYP1A1*\*4 were detected in 12–16%, 8–9% and 9.5% of Caucasians, respectively [35,55].

The *CYP3A4*\*1B/V polymorphism varies widely in frequency among ethnic groups. There were reported incidences of 8% in Caucasians [79,80,84], 20% in Hispanics [85], 53% in African-Americans [81], and it could not be detected in the Asiatic [15,79].

*CYP3A5*\*5 is present in 18.4% of non-African-Americans, in 75% of African-Americans and *CYP3A5*\*6

is found in 1% of non-African-Americans and 17.2% of African-Americans [48].

#### 4.1. CYPs polymorphisms and leukemia

A study carried out on AML and t-AML/t-MDS secondary to treatment with epipodophyllotoxin showed that *CYP3A4-V* allele was significantly under-represented in t-AML/t-MDS compared with de novo cases ([16]; Table 2). The authors hypothesized that the wild-type genotype could facilitate the production of DNA-damaging reactive intermediate metabolites. However, later studies could not support this conclusion [25,26].

No relationship between *CYP3A5\*3* polymorphism and t-AML was found [25].

A case-control study performed on adults with AML reported higher prevalence of the *CYP1A1\*4* allele in patients than controls ([55]; Table 5). This leads to an increased risk of leukemia which was further augmented when the *GSTT1*-null genotype was combined with *CYP1A1\*2B* and *CYP1A1\*4* alleles (OR = 10.2; 95% CI, 1.2–83.9;  $P=0.01$ ; and OR = 7.0; 95% CI, 2.0–24.8;  $P=0.001$ , respectively). However, these results could not be substantiated in a series of pediatric ALL ([35]; Table 3).

The *CYP1A1\*2B/V* polymorphism is over-represented among patients with AML who carried the *NRAS* mutation compared with those without it ([18]; Table 5). This polymorphism is particularly over-represented among patients with a poor cytogenetic risk (OR = 15.9; 95% CI, 3.7–68.5).

Krajinovic et al. [35] reported higher incidence for the *CYP1A1\*2A* allele in children with ALL compared with controls; this conferred an increase in the risk of developing ALL (Table 3), which could not be confirmed in other report [34]. For the *CYP1A1\*2B* allele Krajinovic et al. [35] did not find any relationship with ALL (Table 3).

In summary, most of the reports reviewed noted that *CYP* polymorphisms increase the risk of AML and ALL, although the paucity of reports in this field and the controversial results demand further studies to confirm these preliminary results.

#### 4.2. CYPs polymorphisms and disease outcome

The *CYP1A1\*2* allele confers a higher risk of relapse in pediatric ALL. Thus, a study performed on children with ALL showed that those carrying *CYP1A1\*2* had shorter survival probabilities ([47]; Table 4). A Cox regression model including other prognosis factors (demographic and biological parameters and white blood cell count) confirmed the predictive value of carrying this allele. Furthermore, the combinations of *CYP1A1\*2* with *NQO1\*2* or with *hMLH1* 1219 were more prevalent among 68 patients who relapsed within 5 years of follow-up than in those who remained disease-free.

However, for the *CYP3A* polymorphisms (*CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3* and *CYP3A5\*6*) the studies of Aplenc et al. [48] and Rocha et al. [50] could not find association of these

*CYP3A* variants with the risk of relapse in children with ALL (Table 4).

In summary, most of the studies reviewed did not find that *CYPs* polymorphisms influence disease outcome. However, the lack of data in this field necessitates further studies to establish a definitive conclusion.

### 5. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism

The enzyme 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) catalyzes the reduction of 5,10-methylene tetrahydrofolate to 5-methylene tetrahydrofolate, which donates a methyl group to homocysteine to be transformed into methionine [86]. However, 5,10-methylene tetrahydrofolate is the main source of methyl groups needed for the conversion of uracil to thymine. If thymine is scarce, uracil will be incorporated into newly synthesized DNA. Subsequent DNA repair mechanisms to excise the misincorporated uracil might produce DNA strand breakage, which is one cause of chromosomal translocations [41,87].

Besides *MTHFR* polymorphisms, other polymorphisms in the genes involved in folate metabolism could also affect the synthesis of nucleic acids. This is the case of thymidylate synthase (*TYMS*), which plays a role in the provision of bases required for DNA synthesis. A reduction of this enzyme's activity has been associated with chromosomal damage and the production of fragile loci [45].

Serine hydroxymethyltransferase (*SHMT1*) is a cytosolic Vitamin B6-dependent enzyme that reversibly catalyzes the conversion of tetrahydrofolate (THF) to glycine and methylene-THF. This isoenzyme plays a role in the supply of carbons for purine, thymidylate and methionine synthesis [45].

The methionine synthase reductase gene (*MTRR*) codes for a Vitamin B12-dependent enzyme that catalyzes the remethylation of homocysteine to methionine.

For *MTHFR*, the *C677T* polymorphism leads to an A222V substitution (Table 1). This polymorphism produces a thermolabile enzyme that causes hyperhomocysteinemia in carriers with low plasma levels of folic acid [88]. This polymorphism is found in 67% of Caucasians [89]. A second polymorphism at A1298C leads to an E429A substitution. The allele has a 45% overall mean frequency and is found in 61% of Caucasians [90]. Individuals homozygous for this polymorphism (10% of the Canadian population) showed a 60% reduction in the lymphocytic activity of *MTHFR* [91]. The double heterozygous condition (A1298C and C677T), found in 15% of the population, is associated with a reduction of enzyme activity to 50–60% of that found in subjects with wild type alleles.

A connection between *MTHFR* functional polymorphisms and leukemogenesis is likely, as there is a relationship between folate concentration and susceptibility to genetic damage in actively dividing cells, such as those involved in

hematopoiesis [87]. Likewise, the *MTHFR* C677T polymorphism is associated with reduced risks of developing colon cancer and ALL [41]. This protective effect is related to folate level, so the risk of cancer may be increased in homozygous subjects for *MTHFR* 677C → T with low folate intake [92].

*TYMS* possesses a unique site of internal tandem repetition at a 5'-UTR, upstream of the ATG start codon [93,94]. This polymorphism consists of 28 bp tandem repeats in multiples of two (2R) or three (3R) (Table 1). The 3R polymorphism enhances gene expression. This hyper-expression can induce the conversion of dUMP to dTMP, decreasing uracil levels and, consequently, preventing the erroneous incorporation of uracil into DNA. The *TYMS* 3R allele is found in 38–54% of Caucasian populations.

For *SHMT1*, the alleles C1420T or C1444T (Table 1) cause a reduction in plasma and erythrocyte folate levels [45]. The T allele had a mean frequency of 38.2% in the different ethnic groups studied.

In the reading frame of *MTRR*, was reported the transition A2756G that leads to D919G. This polymorphism can modify enzymatic activity, as it alters the enzyme domain involved in the methylation and reactivation of the Vitamin B12 cofactor [45]. This allele is associated with reductions in homocysteine levels and elevated levels of folate, and can be associated with an increase in the flow of carbon-containing molecules required for DNA synthesis.

### 5.1. Polymorphisms of the genes of folate metabolism and acute leukemia

The relationship between *MTHFR* polymorphisms and the risk of adult leukemia (AML or ALL) remains unclear. Thus, in adult AML no significant differences in the *MTHFR* genotypes 677TT, 1298AC and 1298CC between cases and controls were seen ([41]; Table 5).

In adult ALL were observed controversial results. Thus, in a case-control study performed in adult ALL (71 ALL patients versus 114 controls) ([41]; Table 3) was shown that the *MTHFR* 677TT genotype had lower incidence in cases than in controls, conferring a great reduction in the risk of ALL. Moreover, the *MTHFR* 1298AC genotype conferred a three-fold reduction in the risk of developing ALL. In addition, individuals who were double heterozygous (677CT/1298AC) showed a strong reduction in the risk of ALL (OR = 0.2; 95% CI, 0.1–0.8) compared with homozygous individuals (677CC/1298AA). However, the reported association between *MTHFR* C677T and the risk of adult ALL could not be confirmed in another study performed in Turkish [34].

Most studies involving children showed that the *MTHFR* C677T polymorphism or its combination with the A1298C polymorphism conferred a protective role against ALL ([42–44]; Table 3). Thus, a study performed on pediatric ALL and healthy controls confirmed that both the TT677/AA1298 and CC677/CC129859 genotypes decreased the risk of ALL [44] and that this protective effect could also be achieved

by providing folate supplements during pregnancy. Furthermore, there is a relationship of *MTHFR* polymorphisms and certain chromosomal rearrangements ([43]; Table 3). Thus, patients with leukemia harbouring *MLL* rearrangement had lower incidences of the C677T allele and higher incidence of A1298C. For TEL-AML1-positive ALL patients occurred the contrary, and for those with hyperdiploid leukemia there was a lower incidence for both loci. Additionally, the CT and TT genotypes at position 677 nt showed a protective effect in patients with *MLL*-positive leukemia, with this effect being stronger for the CT (OR = 0.3; 95% CI, 0.1–0.7) than for the TT allele (OR = 0.5; 95% CI, 0.2–1.5).

It has also been reported that some polymorphisms in other genes implicated in folate metabolism might also confer protection against ALL [45]. Thus, the 1420CT *SHMT1* genotype confers a 2.1-fold reduction and the 1420TT genotype causes a 3.3-fold reduction in the risk of developing ALL (Table 3). Likewise, the *TYMS* 2R3R polymorphism decreases the risk of developing ALL by 2.8-fold and 3R3R reduces it four-fold (Table 3). Furthermore, the combination of 3R3R *TYMS* and 1420CT/TT *SHMT1* polymorphisms confers a strong reduction in the risk of developing ALL (OR = 0.1; 95% CI, 0.0–0.8). In addition, the combination of *MTRR* 2756AG and *SHMT1* 1420CT/TT produces a 5.6-fold reduction in risk (Table 3). However, these results should be interpreted with caution, because they are based on a single study performed on a limited series of patients.

### 5.2. Polymorphisms of the genes of folate metabolism and disease outcome

Polymorphisms of *MTHFR* can be potential modulators of anti-folic chemotherapy with MTX. Thus, the leukemic blasts of patients with the C677T *MTHFR* polymorphism showed greater sensitivity to MTX in vitro [95,96]. Hence, in a study performed in 201 children with ALL treated with MTX, the patients with the haplotype *MTHFR* T677A1298 or methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 (*MTHFD1*) A1958 variant (Table 1) showed a lower probability of EFS and the haplotype *MTHFR* T667A1298 increased the risk of relapse ([51]; Table 4). Furthermore, the combination of *TYMS* 3R and *MTHFR* T667A1298 or *MTHFD1* A1958 also significantly reduced the event-free survival (HR = 9.0; 95% CI, 1.9–42.8; and HR = 8.9; 95% CI, 1.8–44.6, respectively). It has also been reported that homozygosity for 677T *MTHFR* was associated with an increased risk of secondary effects of MTX at oral, gastrointestinal and hepatic levels [97]. However, all these results should be considered preliminary, because they are based on single reports.

*TYMS* is an enzyme essential for cell proliferation and an important target of MTX [98]. The studies of Rocha et al. [50] and Krajinovic et al. [52] performed in larger series confirmed the relevance of *TYMS* 3R polymorphism in the response to MTX (Table 4). Thus, Rocha et al. [50] studied the repercussion of 16 common genetic polymorphisms in the pharmacodynamics of antileukemic drugs in 246 chil-

dren with ALL treated with a regime including high dose MTX. They reported that in the higher risk group of patients the combination of *GSTM1* non-null genotype with the presence of *TYMS* 3R/3R was associated with higher risk of hematological relapse (univariate analysis  $P=0.02$ ) and these polymorphisms were confirmed by multivariate analysis to be independent prognostic factors. Krajcinovic et al. ([52]; Table 4) showed that the homozygous genotype *TYMS* 3R was associated with poor response to treatment in children with ALL also treated with MTX. However, another study in this field [53] could not relate the risk of relapse of patients with ALL with the 3R/3R genotype; hence, the higher doses of MTX given could overcome the drug resistance caused by the polymorphism. Therefore, more studies are required to confirm in influence of *TYMS* 3R/3R genotype in the response to MTX.

## 6. DNA repair genes

Genetic polymorphisms in the DNA repair machinery result in interindividual variation in DNA repair capacity and may account, in part, for the susceptibility of a cell to genotoxic agents and to malignancy. The DNA repair systems correct the damage inflicted by carcinogens and anticancer agents and the defective DNA repair has been reported to be a risk factor for various malignancies [47]. To date, several polymorphisms in the genes involved in DNA repair have been identified. The most frequent damage seen is the DSB produced as consequence of DNA repair accomplished by HRC [29].

One of the proteins involved in HRC is RAD51, which promotes an ATP-dependent HRC after binding to DNA. In the gene, *RAD51*, there is a G135C polymorphism located in the 5'-UTR (Table 1). This polymorphism has been shown to be associated with an increased risk for breast cancer in carriers of the *BRCA2* mutation [29,99].

The gene *XRCC3* is also implicated in DSB repair by HRC; it interacts with and stabilizes RAD51. It has the T241M polymorphism called *XRCC3-241M* (Table 1), which has been associated with higher levels of DNA adducts [29].

The first step in the DNA repair is the detection of DNA errors. In this regard, *hMLH1*, *hMSH2* and *hMSH3* belong to the family of MMR genes that encode proteins integral to the MutS $\alpha$  (*hMSH2* and *hMSH6*) and MutS $\beta$  (*hMSH2* and *hMSH3*) complexes, which recognizes and bind single-base mismatches and insertion loops in DNA [100]. *hMLH1* is integral to the MutL $\alpha$  (*hMLH1* and *hPMS2*) complex, which facilitates degradation and resynthesis of the mispaired regions [101].

The xeroderma pigmentosum group of genes (*XPD*, *XPF*, *XPG*) encode DNA helicases, which mediate the DNA unwinding required for both NER and basal transcription [102].

The causative gene of ataxia-telangiectasia (*ATM*) encodes a 350-kDa protein that contains a phosphatidyli-

nositol 3-kinase (PI3K) domain and is involved in DNA-damage processing and cell-cycle control [103]. The *ATM* gene product regulates a network of genes (*TP53*, *MDM2*, *NBS1*, *BRCA1*, *ABL*, *CHEK2*) that encode proteins involved in the repair of double-stranded DNA breaks, in the regulation of cell proliferation, and in apoptosis, that are implicated in human cancer [104].

*CHEK2* is a protein kinase activated in response to the DNA damage involved in cell cycle arrest. It serves as a link in the pathway ATM–*CHEK2*–*CDC25A*–*CDK2*, which checks genomic integrity in response to DNA damage. The 1100delC mutation in exon 10 abolishes the kinase function of *CHEK2*, and has been reported in patients with Li–Fraumeni Syndrome (LFS) in the USA and in Finnish families with cancer phenotypes suggestive of LFS, including breast cancer [105].

### 6.1. DNA repair gene/polymorphisms in acute leukemia

It is suspected that the *RAD51* and *XRCC3* polymorphisms may affect DSB repair by HRC, producing aberrations that will finally contribute to genetic instability and AML [29]. Thus, it has been reported that the combined presence of *RAD51-135C* and *XRCC3-241M* alleles increased the risk of developing t-AML (Table 2) and to a lesser extent the de novo AML ([29]; Table 5).

For the *CHEK2 1100delC* polymorphism has been reported an increase in the breast cancer risk in patients who were not carriers of *BRCA1/2* mutations [106]. Thus, it can be hypothesized that such polymorphism may also contribute to the onset of leukemia. However the low incidence or absence of the polymorphism 1100delC *CHEK2* found in normal controls makes it irrelevant for leukemia [107].

*XRCC1* and *XPD* DNA repair genes have been studied for their association with the risk of leukemia and disease outcome. Joseph et al. [46] studied the R194W, R399Q, and R280H polymorphisms of the *XRCC1* gene (Table 1) in Indian children with ALL (177 patients with ALL and 177 controls). They reported a greater incidence of the Q variant in patients than in controls, and also an association between the codon 399 variant and the risk of ALL (Table 3). However, no association was found between these variant genotypes and treatment outcome (Table 4).

The K751Q *XPD* gene polymorphism (Table 1) has been reported in two major studies of AML, those of Allan et al. [30] in adults and of Mehta et al. [60] in children. The study of Allan et al. investigated 341 elderly patients with AML entered in the MRC AML 11 trial and 729 controls. It showed that the presence of the Q variant reduces EFS and OS relative to those of K homozygotes (Table 4). Furthermore, 751Q homozygosity increases the risk of t-AML (Table 2). However, a similar incidence of de novo AML was reported in patients and controls (Table 5).

Mehta et al. [60] examined the K751Q *XPD* polymorphism in 456 children treated for AML (432 whites and 146 blacks) and 578 controls. They found similar gene frequen-

cies in patients with AML and controls, which is consistent with the study of Joseph et al. [46], but conversely, they found no statistically significant differences in OS or EFS. Mehta et al. justified the discrepancies between the two studies as the consequence of differences in the biology of the leukemia cells of adults and children, the presence of secondary insult in adults, etc.

The *XPG* DNA excision repair gene could also play a role in the genetic predisposition to leukemia and probably in leukemia outcome. Its relevance in the removal of DNA *cis*-platinum adducts has been demonstrated by Vilpo et al. [108], who reported that the L1210/0 cell line has a defective *XPG* gene, which confers great sensitivity to *cis*-platin.

An IVS12-6C>T transition polymorphism has been identified in *hMSH2* at position -6 of the 3' splice junction consensus sequence (Table 1). Worrillow et al. [31] studied the effect of this polymorphism on the risk of leukemia after chemotherapy in 91 patients with t-AML, 420 with de novo AML, and 837 controls. It has been reported that the *hMSH2* allele was significantly over-represented in patients with t-AML secondary to treatment with O<sup>6</sup>-guanine alkylating agents (Table 2). However, this statistical difference was based on only 16 cases of t-AML. Nevertheless, they found a similar incidence of the allele was found in patients with de novo leukemia and in controls (Table 5).

Similarly, the simultaneous presence of the *hMLH1 I219* allele and *CYP1A1\*2A* polymorphisms (Table 1) conferred a higher risk of relapse in children with ALL ([47]; Table 4).

A major feature of *ATM* mutations is that they increase the risk of cancer, especially among hematological malignancies, leukemia, and lymphoma [109]. Liberzon et al. [110] analyzed the involvement of *ATM* in 39 pediatric T-cell lymphoblastic leukemias among North African Jews and Arabs. They reported sequence changes in eight patients with T-cell ALL (three truncations and three missense variants). The mutations were detected in the germ-line in all patients. When the combined missense variants were compared with those in matched control groups (100 North African Jews and 100 Arabs), their prevalence was significantly higher in patients with ALL than in controls (OR=4.9; 95% CI=1.2–18.2, *P*=0.03). Although the data suggest an association between *ATM* genetic variants and an increased risk of T-cell ALL, this conclusion should be treated with caution because the number of patients examined was small.

## 7. Concluding remarks

The data reviewed support the concept that *NQO1* polymorphisms are associated with an increased risk of all types of leukemia, particularly ALL and t-AML/t-MDS. Certain polymorphisms are specifically related to a particular type of leukemia, such as the genes involved in folate metabolism (*MTHFR*, *TYMS*, *MTRR*), which are associated with a decrease in the risk of ALL; the DNA repair genes (*RAD51*, *XRCC3*, *XPD*, *hMLH1*, *hMSH2*), which are asso-

ciated with t-AML/t-MDS; and *GSTT1*, which is associated with an increased risk of AML.

The *GSTT1* and *GTSM1* null genotypes confer a poor disease outcome on patients with AML and are associated with a good response to treatment in patients with ALL. The polymorphisms in the genes of folate metabolism are associated with poor prognosis, and the 3R3R *TYMS* polymorphism is related to MTX resistance. It should also be noted that the presence of polymorphisms in genes involved in DNA repair are related to a poor response to chemotherapy in patients with ALL. It is difficult to draw any definitive conclusions about the other polymorphisms reviewed, because the number of studies is small.

Overall, the findings support the hypothesis that several low penetrance genes with multiplicative effects may account for the risk of leukemia. This polygenic model, together with the dietary effects, ambient exposition and individual immune system responses, could be the main determining factors to establish a predisposition to leukemia.

However, one of the major limitations of this review is the limited number of studies of certain polymorphisms. Moreover, in the reports reviewed, we found various shortcomings that preclude us from establishing consistent conclusions. The reports are limited to a reduced number of polymorphisms; many lack reproducibility or show lack of rigor in experimental design (cases versus controls). Moreover, some of the statistical differences were based on slight differences in incidences in the study groups. For these reasons, we believe that, to achieve definitive conclusions, we need to develop experimental platforms for high-throughput polymorphism evaluations [111] that will select those relevant polymorphisms that should be tested in large series with rigorous experimental designs [112].

## 8. Databases consulted

MIN: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>.

SNP500 Cancer Database (Cancer Genome Anatomy Project): <http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.cfm>.

CYP allele nomenclature: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>.

## Acknowledgment

This review was supported by grant of the Spanish 'Fondo de Investigación Sanitaria' (PI020180).

## References

- [1] Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;341:1051–61.
- [2] Bonet R, Alos I. Epidemiología descriptiva. In: Delfado RF, Garciano JM, editors. Leucemia linfoblastica aguda en la infancia. Madrid: Jarpyo Editores; 1995.

- [3] Ross JA, Davies SM, Potter JD, Robison LL. Epidemiology of childhood leukemia, with focus on infants. *Epidemiol Rev* 1994;16:243–72.
- [4] Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Opin Oncol* 2000;12:3–12.
- [5] Greaves M. Molecular genetics of ALL. *Haematologica* 2000. EHA 5 Educational Book, p. 95. Available from URL: [http://www.haematologica.it/free/cha5\\_edu\\_greaves.pdf](http://www.haematologica.it/free/cha5_edu_greaves.pdf).
- [6] Larson RA, Wang Y, Banerjee M, Wiemels J, Hartford C, Le Beau MM, et al. Prevalence of the inactivating 609C→T polymorphism in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukaemia. *Blood* 1999;94:803–7.
- [7] Traver RD, Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Danenberg PV, Ross D, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res* 1992;52:797–802.
- [8] Smith MT. Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7624–6.
- [9] Edwards YH, Potter J, Hopkinson DA. Human FAD-dependent NAD(P)H diaphorase. *Biochem J* 1980;187:429–36.
- [10] Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Traver RD, Hoener B, Campelman S, et al. Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with NQO1 609C>T variation and rapid functional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res* 1997;57:2839–42.
- [11] Wan J, Shi J, Hui L, Wu D, Jin X, Zhao N, et al. Association of genetic polymorphisms in *CYP2E1*, *MPO*, *NQO1*, *GSTM1*, and *GSTT1* genes with benzene poisoning. *Environ Health Perspect* 2002;110:1213–8.
- [12] Ng A, Taylor GM, Eden OB. Treatment-related leukaemia—a clinical and scientific challenge. *Cancer Treatment Rev* 2000;26:377–91.
- [13] Moran JL, Siegel D, Ross D. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8150–5.
- [14] Radjendirane V, Joseph P, Lee Y, Kimura S, Klein-Szantoi AJP, Gonzalez FJ, et al. Disruption of the DT diaphorase (*NQO1*) gene in mice leads to increased menadione toxicity. *J Biol Chem* 1998;273:7382–9.
- [15] Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, et al. Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:4091–5.
- [16] Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winicki NJ, Cheung NKV, et al. Association of *CYP3A4* genotype with treatment-related leukaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13176–81.
- [17] Vogelstein B, Kinzler KW. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 1998.
- [18] Bowen DT, Frew ME, Rollinson S, Roddam PL, Dring A, Smith MT, et al. CYP1A1\*2B (Val) allele is overrepresented in a subgroup of acute myeloid leukemia patients with poor-risk karyotype associated with NRAS mutation, but not associated with FLT3 internal tandem duplication. *Blood* 2003;101:2770–4.
- [19] Birch JM. Genes and cancer. *Arch Dis Child* 1999;80:1–6.
- [20] Kelly KM, Perentesis JP. Polymorphisms of drug metabolizing enzymes and markers of genotoxicity to identify patients with Hodgkin's lymphoma at risk of treatment-related complications. *Ann Oncol* 2002;13(Suppl 1):34–9.
- [21] Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science* 2004;306:1774–6.
- [22] Pan SS, Forrest GL, Akman SA, Hu LT. NAD(P)H: quinone oxidoreductase expression and mitomycin C resistance developed by human colon cancer HCT 116 cells. *Cancer Res* 1995;55:330–5.
- [23] Krajcinovic M. Further insight into the role of NQO1 in childhood leukemia. *Haematologica* 2005;90:1445.
- [24] Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, Knight D, Sadakane Y, Isoyama K, et al. Acute lymphoblastic leukemia the association of a distinctive allele of NAD(P)H:quinone oxidoreductase with pediatric acute lymphoblastic leukemias with MLL fusion genes in Japan. *Haematologica* 2005;90:1511–5.
- [25] Blanco JG, Edick MJ, Hancock ML, Winicki NJ, Dervieux T, Amylon MD, et al. Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics* 2002;12:605–11.
- [26] Collado M, Barragán E, Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Colomer D, Munarriz B, et al. Lack of association of CYP3A4-V polymorphism with the risk of treatment-related leukemia [letter]. *Leuk Res* 2005;29:595–7.
- [27] Sasai Y, Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Kobayashi M, Fujii H, et al. Genotype of glutathione S-transferase and other configurations in myelodysplasia. *Leuk Res* 1999;23:975–81.
- [28] Allan JM, Wild ChP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, et al. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy induced leukaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11592–7.
- [29] Seedhouse C, Faulkner R, Ashraf N, Das-Gupta E, Russell N. Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10:2675–80.
- [30] Allan JM, Smith AG, Wheatley K, Hills RK, Travis LB, Hill DA, et al. Genetic variation in *XPD* predicts treatment outcome and risk of acute myeloid leukemia following chemotherapy. *Blood* 2004;104:3872–7.
- [31] Worrillow LJ, Travis LB, Smith AG, Rollinson S, Smith AJ, Wild ChP, et al. An intron splice acceptor polymorphism in *hMSH2* and risk of leukemia after treatment with chemotherapeutic alkylating Agents. *Clin Cancer Res* 2003;9:3012–20.
- [32] Smith MT, Wang Y, Skibola CF, Slaler DJ, Lo Nigro L, Nowell PC, et al. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children. *Blood* 2002;100:4590–3.
- [33] Wiemels JL, Pagnamenta A, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. A lack of a functional NAD(P)H: quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. *Cancer Res* 1999;59:4095–9.
- [34] Balta G, Yuksek N, Ozyurek E, Ertem U, Hicsonmez G, Altay C, et al. Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematol* 2003;73:154–60.
- [35] Krajcinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: Influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood* 1999;93:1496–501.
- [36] Chen CHL, Liu Q, Pui ChH, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro R, et al. Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;99:1701–7.
- [37] Alves S, Amorim A, Ferreira F, Norton L, Prata MJ. The GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children from north Portugal. *Leukemia* 2002;16:1565–7.
- [38] Davies SM, Bhatia S, Ross JA, Kiffmeyer WR, Gaynon PS, Radloff GA, et al. Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100:67–71.
- [39] Kracht T, Schrappe M, Strehl S, Reiter A, Elsner H-A, Trka J, et al. NQO1 C609T polymorphism in distinct entities of pediatric hematologic neoplasms. *Haematologica* 2004;89:1492–7.
- [40] Lanciotti M, Dufour C, Corral L, Di Michele P, Pigullo S, De Rossi G, et al. Genetic polymorphism of NAD(P)H:quinone oxidoreductase is associated with an increased risk of infant acute lymphoblastic leukemia without MLL gene rearrangements. *Leukemia* 2005;19:214–6.

- [41] Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Raymond A, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12810–5.
- [42] Franco RF, Simoes BP, Tone LG, Gabelini SM, Zago MA, Falcao RP. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;115:616–8.
- [43] Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexanderi FE, Mel F, Greaves, and United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4004–9.
- [44] Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard M, Théorêt Y, Moghrabi A, et al. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:252–7.
- [45] Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:3786–91.
- [46] Joseph T, Kusumakumary P, Chacko P, Abraham A, Pillai MR. DNA repair gene XRCC1 polymorphism in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett* 2005;217:17–24.
- [47] Krajcinovic M, Labuda D, Mathonnet G, Labuda M, Moghrabi A, Champagne J, et al. Polymorphisms in genes coding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:802–10.
- [48] Aplenc R, Glatfelder W, Han P, Rappaport E, La M, Cnaan A, et al. CYP3A genotypes and treatment response in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2003;122:240–4.
- [49] Stanulla M, Schrappe M, Müller-Brechlin A, Zimmermann M, Welte K. Polymorphisms within glutathione *S*-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case–control study. *Blood* 2000;95:1222–8.
- [50] Rocha JC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH, et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;105:4752–8.
- [51] Krajcinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrabi A. Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenom J* 2004;4:66–72.
- [52] Krajcinovic M, Costea I, Chiasson S. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2002;359:1033–4.
- [53] Lauten M, Asgedom G, Welte K, Schrappe M, Stanulla M. Thymidylate synthase gene polymorphism and its association with relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003;88:353–4.
- [54] Smith MT, Wang Y, Kane E, Rollinson S, Wiemels JL, Roman E, et al. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood* 2001;97:1422–6.
- [55] D'Alò F, Voso MT, Guidi F, Massini G, Scardocci A, Sica S, et al. Polymorphisms of CYP1A1 and glutathione *S*-transferase and susceptibility to adult acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004;89:664–70.
- [56] Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, et al. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet* 1996;347:295–7.
- [57] Atoyebi W, Kusec R, Fidler C, Peto TE, Boulwood J, Wainscoat JS. Glutathione *S*-transferase gene deletions in myelodysplasia. *Lancet* 1997;349:1450–1.
- [58] Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Radloff GA, Ross JA, Perentesis JP. Glutathione *S*-transferase polymorphisms in children with myeloid leukemia: a Children's Cancer Group study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000;9:563–6.
- [59] Rollinson S, Roddam P, Kane E, Roman E, Cartwright R, Jack A, et al. Polymorphic variation within the glutathione *S*-transferase genes and risk of adult acute leukaemia. *Carcinogenesis* 2000;21:43–7.
- [60] Mehta PA, Alonzo TA, Gerbing RB, Elliott JS, Wilke TA, Kennedy RJ, et al. XPD Lys751Gln polymorphism: etiology and outcome of childhood acute myeloid leukemia. a children's oncology group report. *Blood* 2006;107:39–45.
- [61] Preudhomme C, Nisse C, Hebbar M, Vanrumbeke M, Brizard A, Lai JL, et al. Glutathione *S*-transferase theta 1 gene defects in myelodysplastic syndromes and their correlation with karyotype and exposure to potential carcinogens. *Leukemia* 1997;11:1580–2.
- [62] Ross D. Metabolic basis of benzene toxicity. *Eur J Haematol Suppl* 1996;60:111–8.
- [63] Reynolds WF, Chang E, Douer D, Ball ED, Kanda V. An allelic association implicates myeloperoxidase in the etiology of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1997;90:2730–7.
- [64] Piedrafito FJ, Molander RB, Vansant G, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, et al. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem* 1996;271:14412–20.
- [65] Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are because of a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7293–7.
- [66] Sprenger R, Schlagenhauser R, Kerb R, Bruhn C, Brockmoller J, Roots I, et al. Characterization of the glutathione *S*-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics* 2000;10:557–65.
- [67] Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione *S*-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 1997;272:10004–12.
- [68] Wilson MH, Grant PJ, Hardie LJ, Wild CP. Glutathione *S*-transferase M1 null genotype is associated with a decreased risk of myocardial infarction. *FASEB J* 2000;14:791–6.
- [69] Voso MT, D'Alò F, Putzulu R, Mele L, Scardocci A, Chiusolo P, et al. Negative prognostic value of glutathione *S*-transferase (GSTM1 and GSTT1) deletions in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;100:2703–7.
- [70] Gonzalez CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 2002;100:249–60.
- [71] Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione *S*-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997;18:641–4.
- [72] Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Tjoa T, Woods WG, Radloff GA, et al. Glutathione *S*-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute leukemia. *J Clin Oncol* 2001;19:1279–87.
- [73] Yuille M, Condie A, Hudson C, Kote-Jarai Z, Stone E, Eeles R, et al. Relationship between glutathione *S*-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:4216–8.
- [74] Saadat I, Saadat M. The glutathione *S*-transferase mu polymorphism and susceptibility to acute lymphocytic leukemia. *Cancer Lett* 2000;158:43–5.
- [75] Friche E, Danks MK, Beck WT. Characterization of tumor cell resistance to 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin developed in Ehrlich ascites cells in vivo. *Cancer Res* 1992;52:5701–6.
- [76] Ingelman-Sundberg M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res* 2001;482:11–9.

- [77] Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshü A, Shinada N, Watanabe J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS Lett* 1990;263:131–3.
- [78] Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 1996;56:2965–9.
- [79] Walker AH, Jaffe JM, Gunasegaram S, Cummings SA, Huang CS, Chern HD, et al. Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk. *Hum Mutat* 1998;12:289–93.
- [80] Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1225–9.
- [81] Amirimani B, Walker AH, Weber BL, Rebbeck TR. RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1588–90.
- [82] Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, et al. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III<sub>A5</sub> (HLp3). *Mol Pharmacol* 1990;38:207–13.
- [83] Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27:383–91.
- [84] van Schaik RHN, de Wildt SN, van Iperen NM, Uitterlinden AG, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch Caucasians. *Clin Chem* 2000;46:1834–6.
- [85] Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, Williams TL, Levin H, Klein EA, et al. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:901–5.
- [86] Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994;7:195–200.
- [87] Blount BC, Mack MM, Wehr CM, McGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3290–5.
- [88] Engbersen AM, Franken DG, Boers GH, Stevens EM, Trijbels FJ, Blom HJ. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995;56:142–50.
- [89] de Franchis R, Sebastio G, Mandato C, Andria G, Mastroiacovo P. Spina bifida, 677T → C mutation, and role of folate. *Lancet* 1995;346:1703.
- [90] van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044–51.
- [91] Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169–72.
- [92] Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, Liu X, McLeod HL. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics* 1999;58:310–2.
- [93] Bailey LB. Folate. Methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C → T polymorphism affect cancer risk: Intake recommendations. *J Nutr* 2003;133:3748S–53S.
- [94] Marsh S, Ameyaw MM, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Hum Mutat* 2000;16:528.
- [95] Taub JW, Matherley LH, Ravindranath Y, Kaspers GJ, Rots MG, Zantwijk CH. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methotrexate activity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2002;16:764–5.
- [96] Aplenc R, Lange B. Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia [review]. *Br J Haematol* 2004;125:421–34.
- [97] Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, et al. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 2001;98:231–4.
- [98] Pui CH, Relling MV, Downing JR. Mechanisms of disease. Acute lymphoblastic leukaemia. *N Engl J Med* 2004;350:1535–48.
- [99] Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, Dagan E, Paperna T, Kasinetz L, et al. A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3232–6.
- [100] Palombo F, Iaccarino I, Nakajima E, Ikejima M, Shimada T, Jiricny J. hMutS β, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol* 1996;6:1181–4.
- [101] Li GM, Modrich P. Restoration of mismatch repairs to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MuL homologs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1950–4.
- [102] Lehman AR. The xeroderma pigmentosum group D XPD gene: one gene two functions, three disease. *Gene Dev* 2001;15:15–23.
- [103] Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, et al. A single ataxia-telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995;268:1749–52.
- [104] Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003;3:155–68.
- [105] Wu X, Webster SR, Chen J. Characterization of tumor-associated Chk2 mutations. *J Biol Chem* 2001;276:2971–4.
- [106] Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2\*1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* 2002;31:55–9.
- [107] Collado M, Landt O, Barragan E, Lass U, Cervera J, Sanz MA, et al. Locked nucleic acid-enhanced detection of 1100delC\*CHEK2 germline mutation in Spanish patients with hematologic malignancies. *Clin Chem* 2004;50:2201–4.
- [108] Vilpo JA, Vilpo LM, Szymkowski DE, O'Donovan A, Wood RD. An XPG DNA repair defect causing mutagen hypersensitivity in mouse leukemia L1210 cells. *Mol Cell Biol* 1995;15:290–7.
- [109] Stankovic T, Kidd AMJ, Sutcliffe A, McGuire GM, Robinson P, Weber P, et al. ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet* 1998;62:334–45.
- [110] Liberzon E, Avigad S, Stark B, Zilberstein J, Freedman L, Gorfine M, et al. Germ-line ATM gene alterations are associated with susceptibility to sporadic T-cell acute lymphoblastic leukemia in children. *Genes Chromosom Cancer* 2004;39:161–9.
- [111] Buetow KH, Edmonson M, MacDonald R, Clifford R, Yip P, Kelley J, et al. High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:581–4.
- [112] Kammerer S, Roth RB, Reneland R, Marnellos G, Hoyal CR, Markward NJ, et al. Large-scale association study identifies ICAM gene region as breast and prostate cancer susceptibility locus. *Cancer Res* 2004;64:8906–10.



## The *GST* deletions and *NQO1*\*2 polymorphism confers interindividual variability of response to treatment in patients with acute myeloid leukemia

Eva Barragan<sup>a,\*</sup>, Maria Collado<sup>a</sup>, Jose Cervera<sup>b</sup>, Guillermo Martin<sup>b</sup>, Pascual Bolufer<sup>a</sup>, Jose Roman<sup>c</sup>, Miguel A. Sanz<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Molecular Biology Laboratory (Dpt. Medical Pathology), Spain

<sup>b</sup> Hematology Service of Hospital Universitario La Fe (Valencia), Spain

<sup>c</sup> Hematology Service of Hospital Universitario Reina Sofia (Córdoba), Spain

Received 28 July 2006; received in revised form 29 September 2006; accepted 3 October 2006

Available online 21 November 2006

### Abstract

Functional polymorphisms in the genes encoding detoxification enzymes could modify the response to treatment in acute myeloid leukemia and therefore affect the final clinical outcome. In the present study, we genotyped 153 patients diagnosed with *de novo* acute myeloid leukemia (AML) to clarify the influence of the genetic polymorphisms *CYP1A1*\*2A, *CYP3A4*\*1B, *CYP2E1*\*5B, *del*{*GSTT1*}, *del*{*GSTM1*}, and *NQO1*\*2 on disease outcome. The *del*{*GSTM1*} showed a higher frequency in females (62%) than in males (41%) ( $P=0.01$ ). The number of functional *NQO1* alleles influenced the response to induction therapy; 81% (55/68) *NQO1*-negative patients, 69% (28/41) heterozygous patients, and 27% (2/7) homozygous patients achieved complete remission (CR) ( $P=0.04$ ). The presence of *GST* deletions was associated with a lower probability of disease-free survival (DFS) and this effect was more relevant in male patients. Males with *del*{*GSTM1*} showed a 28% DFS versus 57% DFS for undeleted *GSTM1* ( $P=0.04$ ). Similarly, males with undeleted *GSTM1* and *GSTT1* showed a 64% DFS versus 34% DFS for males with at least one *GST* deletion ( $P=0.05$ ). This study suggests that the *NQO1*\*2 polymorphism is relevant to the patient's response to induction therapy and that *GST* deletions influence treatment outcome after chemotherapy, especially in male patients. © 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Polymorphism; Prognosis; Metabolizing enzymes; Acute myeloid leukemia

### 1. Introduction

Most patients with acute myeloid leukemia (AML) achieve complete remission (CR) after conventional chemotherapy. However, a substantial proportion of patients show primary resistance to treatment or experience relapse [1–3]. In the last three decades several prognostic factors that predict treatment outcome have been identified based on clinical–biological characteristics of the tumor and molecular markers present in tumor cells. A relative paucity of work

has been done to identify genetic variants that might predict the prognosis and response to treatment once the leukemia is diagnosed. Genetic variants that might predict the composite results of treatment represented by tumor response and side effects may reside in the germline, since most tumor DNA remains in the germline DNA of the patient.

Xenobiotic-metabolizing enzymes are responsible for the metabolism of drugs, including chemotherapeutic drugs such as alkylating agents, intercalating agents, and anthracyclines [4,5]. Many of these enzymes are genetically polymorphic and these polymorphisms can vary in their enzymatic activity, potentially modifying treatment response, resistance, or drug-related toxicity [5].

Therefore, studies have investigated polymorphisms in the genes encoding the P450 cytochromes (*CYPs*) that are

\* Corresponding author at: Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Enfermería 7<sup>a</sup> planta, Hospital Universitario La Fe, Avda Campanar, 21, 46009 Valencia, Spain. Tel.: +34 961973160/351; fax: +34 961973030.  
E-mail address: [barragan\\_eva@gva.es](mailto:barragan_eva@gva.es) (E. Barragan).

involved in phase I of metabolism (oxidation/activation). The *CYP* genes implicated in phase I metabolism convert several anti-neoplastic agents into intermediate reactive metabolites, some of which can damage DNA [6]. Most of the polymorphisms that have been described for these genes, such as *CYP1A1\*2A*, *CYP2E1\*5B*, and *CYP3A4\*1B*, are believed to increase their enzymatic activity and are implicated in the bioactivation of several chemical carcinogens into intermediate reactive metabolites, some of which can damage DNA [7]. Glutathione *S*-transferase (*GST*) is implicated in phase II metabolism (conjugation/detoxification). Two widespread genetic polymorphisms in these enzymes have been reported, which involve the deletion of these genes (*del{GSTT1}* and *del{GSTM1}*), leading to the complete absence of enzymatic activity. In the gene (*NQO1*) encoding quinone oxido-reductase has been described, the *NQO1\*2* polymorphism consisting in the C609T substitution, leading to P187S acid replacement, which will cause a complete loss of enzyme activity [8].

To our knowledge, few data have been reported about the influence of these genetic polymorphisms on responses to therapy in patients with AML and only a few reports have examined the relationship between *GST* genotype and clinical outcome [9,10]. The need to clarify the implications of these polymorphisms for clinical outcome prompted us to investigate the influence of the genetic polymorphisms *CYP1A1\*2A*, *CYP3A4\*1B*, *CYP2E1\*5B*, *del{GSTT1}*, *del{GSTM1}*, and *NQO1\*2* on disease outcome in a group of 153 adults with *de novo* AML.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients

This study included a total of 153 adult non-promyelocytic patients, diagnosed with *de novo* AML in six Spanish institutions; 84 consecutive patients collected between January 2001 and April 2004 and 69 patients from banked samples of DNA or RNA obtained from adult AML at diagnosis. Informed consent was obtained from all patients in accordance with the recommendations of the Declaration of Human Rights, the Conference of Helsinki and institutional regulations. Diagnoses were made according to the morphological and cytochemical criteria of the French–American–British (FAB) classification [11]. The main characteristics of the patients are shown in Table 1.

### 2.2. Treatment

One hundred and forty-seven of 153 patients were treated in intensive chemotherapeutic trials (PETHEMA 92, 96, 98, and 99), in which induction chemotherapy consisted of standard combinations of anthracycline plus cytarabine, with or without etoposide. Patients achieving remission received consolidation chemotherapy and eligible patients

Table 1  
Demographic data and clinical characteristics of patients

Characteristics	n (%)
Age	
≤60	98 (64)
>60	55 (36)
Sex	
Male	83 (54)
Female	70 (46)
WBC ( $\times 10^9 \text{ L}^{-1}$ )	
≤50	112 (75)
>50	37 (25)
Hemoglobin (g/dL)	
≤10	87 (61)
>10	55 (39)
Platelets ( $\times 10^9 \text{ L}^{-1}$ )	
≤50	65 (45)
>50	78 (55)
FAB	
M0	9 (6)
M1	40 (26)
M2	40 (26)
M4	32 (21)
M5	27 (18)
M6	4 (3)
M7	1 (1)
Cytogenetic risk group	
Low	17 (13)
Intermediate	91 (71)
High	21 (16)
FLT3 <sup>a</sup>	
ITD/D835–	105 (78)
ITD/D835+	30 (22)

<sup>a</sup> ITD/D835–: negative for FLT3 ITD and D835 mutation; ITD/D835+: positive for ITD or D835 mutation, or positive for both mutations.

were selected for autologous or allogeneic stem-cell transplantation.

### 2.3. Cytogenetic analysis

Karyotype analysis was performed using unstimulated short-term cultures and is described according to the recommendations of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [12]. Whenever possible, at least 20 metaphase spreads were evaluated. Cytogenetic risk groups were defined as follows: *high risk*, 5/del(5q), 7/del(7q), abn 3q, complex aberrations ( $\geq 3$  independent aberrations), *t*(9;22), and *t*(6;9); *low risk*, *t*(8;21) and *inv*(16); *intermediate risk*, all other karyotypic aberrations or a normal karyotype.

### 2.4. Sampling and nucleic acid extraction

Samples were collected at diagnosis for the study of *FLT3* mutations and at diagnosis or in CR for the study of polymorphisms. Venous blood or bone marrow (BM) samples were anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) K3.

DNA was extracted from whole blood with the MagNA Pure LC DNA Large Volume Kit using the MagNA Pure LC System (Roche Mannheim, Germany).

For RNA extraction, red blood cells were lysed and the white blood cells were collected by centrifugation. The collected cells were resuspended in MagNA Pure LC mRNA Lysis Buffer (Roche Mannheim, Germany) and stored at  $-40^{\circ}\text{C}$ . mRNA was isolated following the MagNA Pure LC mRNA HS protocol, using the MagNA pure LC System.

### 2.5. Molecular detection of internal tandem duplications and D835 mutation of *FLT3*

For cDNA synthesis, 6  $\mu\text{L}$  aliquots of mRNA were reverse transcribed in a 25  $\mu\text{L}$  reaction volume using random hexamer primers with the TaqMan Gold RT-PCR Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), following the manufacturer's protocol. *FLT3* internal tandem duplications (ITD) and the aspartate 835 (D835) mutation were studied in cDNA samples using the methods described by Nakao et al. [13] for ITD and by Moreno et al. [14] for the D835 mutation.

### 2.6. Genotyping

Most of the methods used to detect polymorphisms are based on real-time polymerase chain reactions (PCR) performed in the LightCycler System (Roche Mannheim, Germany), using primers and fluorogenically labelled hybridization probes according to previously published methods. Genotyping was based on the different melting temperatures of the hybridization probes for the wild type and polymorphic alleles. Thus, *CYP1A1\*2A* was detected according to the method of Harth et al. [15], *CYP3A4\*1B* with the method of Von Ahsen et al. [16], *CYP2E1\*5B* with the method of Choi et al. [17] and *NQO1\*2* with the method of Harth et al. [18]. In every experiment, the appropriate controls were included: a negative control containing no DNA template to confirm the absence of any contamination, a positive control consisting in a heterozygous positive patient for each polymorphism and a negative sample from an individual previously genotyped as wild type.

Homozygous deletions of the *GSTM1* and *GSTT1* genes were detected with a multiplex PCR technique that included the  $\beta$ -globin gene as the internal control, as previously described by Naoe et al. [19].

### 2.7. Statistics

Polymorphism presence and dichotomous variables were compared with  $\chi^2$  and Fisher's exact test (FET). Unadjusted time-to-event analyses were performed using the Kaplan–Meier method [20] and log-rank tests for comparisons [21]. Disease-free survival (DFS) and relapse-free survival (RFS) were calculated from the date of CR. In the analysis of DFS, relapse and death in CR were considered uncensored events, whichever occurred first. For RFS, relapse

in CR was considered the uncensored event. The follow-up of the patients was updated on 30 March 2005. Multivariate analysis was performed using the Cox proportional hazards model [22]. All tests were two-sided and a *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant. Computations were performed using the SPSS v12.0 statistical package (Chicago, IL).

## 3. Results

### 3.1. Incidence of polymorphisms and patient characteristics

The *del{GSTM1}* polymorphism was detected in 51% AML patients (74/146) and *del{GSTT1}* in 28% patients (41/145); 16% patients (23/144) had a double deletion *GSTM1T1* genotype and 37% (53/144) had an undelleted *GSTM1T1* genotype. The *NQO1\*2* genotype was detected in 41% patients (49/119), 42 of whom were heterozygous (35%), and 7 of whom were homozygous (6%). Among the cytochrome P450 enzymes, the *CYP3A4\*1B* polymorphism was detected in 6% patients (6/106) and all were heterozygous. The *CYP2E1\*5B* allele was detected in 5% patients (5/107), four of whom were heterozygous and one homozygous. The *CYP1A1\*2A* allele was detected in 16% patients (14/90) and all were heterozygous (Table 2). The genotypic distributions in all samples were found to accomplish the Hardy–Weinberg equilibrium. The presence of the four major polymorphisms (*del{GSTM1}*, *del{GSTT1}*, *NQO1\*2*, and *CYP1A1\*2A*) was analyzed in relation to age, sex, white blood cells (WBC), platelets, hemoglobin, FAB, cytogenetic risk group, and *FLT3* mutations. No associations were found in the distribution of the polymorphisms with respect to the clinical characteristic at diagnosis, except for *del{GSTM1}* and sex. A higher frequency of *del{GSTM1}* was observed in women (62%) than in men (41%) (*P*=0.01; Spearman correlation, *r*=0.2).

### 3.2. Polymorphisms and response to treatment

One hundred and forty-seven patients were evaluated for their response to induction: 112 patients achieved CR, 23 were resistant, and 12 died. The response to induction showed no relationship to *del{GSTM1}*, *del{GSTT1}*, or

Table 2  
Incidence of polymorphisms

Polymorphisms	No. of positive/total patients (%)	Allelic frequency
<i>del{GSTM1}</i>	74/146(51)	<sup>a</sup>
<i>del{GSTT1}</i>	41/145(28)	<sup>a</sup>
<i>NQO1*2</i>	49/119(41)	0.24
<i>CYP3A4-V</i>	6/106(6)	0.03
<i>CYP2E1*5B</i>	5/107(5)	0.03
<i>CYP1A1*2A</i>	14/90(16)	0.09

<sup>a</sup> Not estimated because the method only detects homozygous patients.

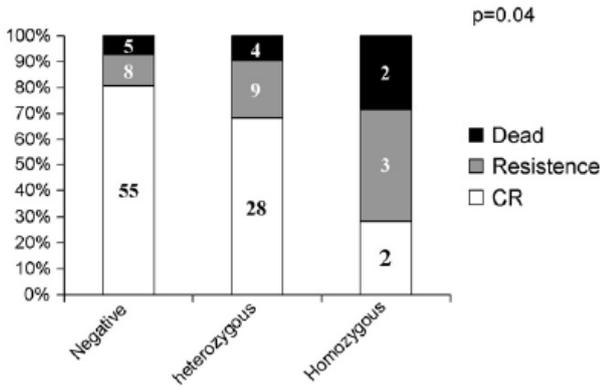


Fig. 1. The number of *NQO1* polymorphic alleles influence the response to induction therapy.

*CYP1A1\*2A* polymorphisms. The *NQO1\*2* polymorphism showed a trend for a worse response to induction 81% patients (55/68) negative for the *NQO1\*2* polymorphism and 63% (30/48) positive for the *NQO1\*2* polymorphism achieved CR ( $P=0.08$ ). However when we considered the number of alleles with *NQO1\*2* polymorphism we found an inverse relationship of the number of polymorphic alleles with the percentage of patients who achieved CR. Thus we found that 81% *NQO1*-negative patients (55/68), 69% heterozygous patients (28/41) and 27% homozygous patients (2/7) achieved CR ( $P=0.03$  FET; Spearman correlation,  $r=0.23$ ) (Fig. 1).

3.3. Polymorphisms and clinical outcome

At a median follow-up of 26 months (range, 0.61–141 months), the estimated probability of DFS was 49%. Univariate analysis showed that DFS was significantly influenced by age over 60 years ( $P=0.0002$ ), *FLT3* mutations ( $P=0.02$ ), cytogenetic risk group ( $P=0.01$ ), and *del{GSTM1}* ( $P=0.04$ ) (Table 3). The probability of DFS was significantly diminished in patients with *del{GSTM1}* relative to that of patients with undeleted *GSTM1* (28% versus 51%, respectively;  $P=0.04$ ; Fig. 2). Because *del{GSTM1}* was significantly associated with sex, we examined the influence of sex in relation to *del{GSTM1}*. We observed that the

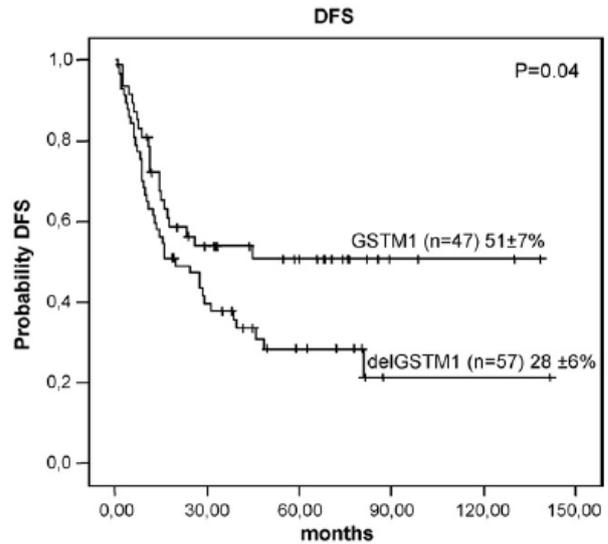


Fig. 2. *GSTM1* deletions are of negative prognostic value for disease free survival (DFS).

presence of *del{GSTM1}* exclusively affected DFS in men (28% DFS for *del{GSTM1}* versus 57% DFS for undeleted *GSTM1*;  $P=0.04$ ) but had no significant impact on women (Fig. 3; Table 3). Likewise, when we evaluated the impact of the *del{GSTM1}* polymorphism within the intermediate cytogenetic risk group, we found that men with *del{GSTM1}* had a reduced probability of DFS compared with those with undeleted *GSTM1* (29% versus 60%, respectively;  $P=0.05$ ). However, no significant differences were found in women.

Analysis of the *GSTM1* and *GSTT1* combined genotypes showed that patients with undeleted *GSTM1* and *GSTT1* genes had a significantly better DFS than patients with at least one *GST* deletion (58% versus 30%, respectively;  $P=0.03$ ). When we stratified the data by gender, we observed that male patients with undeleted *GSTM1* and *GSTT1* had a significantly better DFS than male patients with at least one *GST* deletion (64% versus 34%, respectively;  $P=0.05$ ). In contrast, undeleted *GSTM1* and *GSTT1* did not affect DFS in females (Fig. 4; Table 3). Similarly, we found that males in the intermediate cytogenetic risk group with at least one

Table 3 Univariate and multivariate analysis

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	RR (95% CI)	P	RR (95% CI)	P
Age: >60 vs. ≤60	2.52 (1.05–3.48)	0.0002	4.35 (2.29–8.27)	0.0001
<i>FLT3</i> : mutation vs. no mutation	2.32 (1.58–4.18)	0.02	2.78 (1.48–5.22)	0.002
Karyotype: favorable vs. intermediate vs. unfavorable	2.02 (1.10–3.74)	0.01	–	n.s.
<i>GSTM1</i> : deletion vs. normal	1.70 (1.05–2.87)	0.04	–	n.s.
<i>GSTM1T1</i> : any deletion vs. normal	1.97 (1.05–3.47)	0.03	–	n.s.
<i>GSTM1</i> (males): deletion vs. normal	2.09 (1.00–4.35)	0.04	2.43 (1.05–5.58)	0.036
<i>GSTM1</i> (females): deletion vs. normal	–	n.s.	–	n.s.
<i>GSTM1T1</i> (males): any deletion vs. normal	2.25 (1.00–5.25)	0.05	–	n.s.
<i>GSTM1T1</i> (females): any deletion vs. normal	–	n.s.	–	n.s.

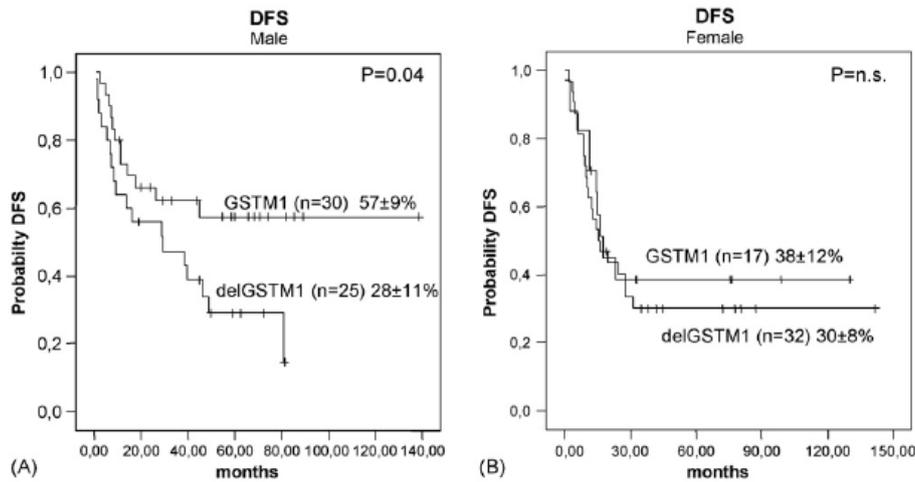


Fig. 3. *GSTM1* deletions are associated with lower probabilities of DFS in males (panel A) but does not modify the prognosis in females (panel B).

*GST* deletion had a significantly shorter DFS than those with undeleted *GSTM1T1* (30% versus 73%, respectively;  $P=0.03$ ). Once again, no significant differences were found in females.

To further analyse the significance of *GST* deletions, we separately considered the incidence of death in remission and RFS. The frequency of death in remission was significantly higher in patients with *del{GSTM1}* compared with those with undeleted *GSTM1* (20% versus 5%, respectively;  $P=0.05$ ) or in those harbouring at least one *GST* deletion compared with those with undeleted *GSTM1* and *GSTT1* (19% versus 0%, respectively;  $P=0.01$ ; Fig. 5). No differences were found in RFS between *GST* deletions and undeleted *GSTM1T1* genes. Multivariable Cox regression analysis including age, gender, leukocytosis, cytogenetic risk group, *FLT3* mutations, *del{GSTM1}*, and undeleted

*GSTM1T1* showed that age over 60 years ( $P=0.002$ ) and *FLT3* mutations ( $P=0.002$ ) were unique independent prognostic factors for DFS in the global series (Table 3). Further multivariate analyses stratified by gender revealed that *del{GSTM1}* was an independent prognostic factor only in male patients ( $P=0.036$ ; Table 3).

#### 4. Discussion

Drug-metabolizing enzymes are responsible for the activation and/or detoxification of cytotoxic drugs. Therefore, genetic variations in these enzymes could explain inter-patient variability in drug responses [23].

We found that the response to induction therapy is inversely correlated with the number of functional *NQO1*\*2

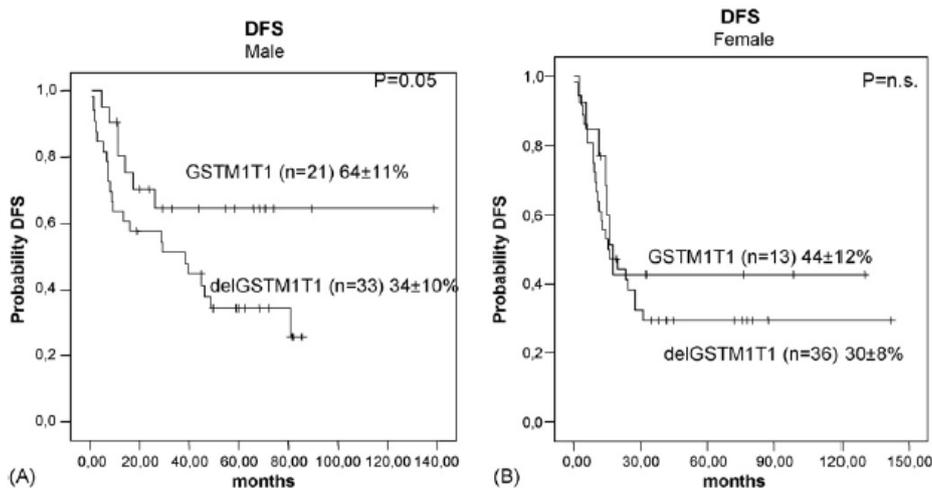


Fig. 4. The presence of at least one *GST* deletion are of negative prognostic value for DFS in male patients (panel A) but does not modify the prognosis in females (panel B).

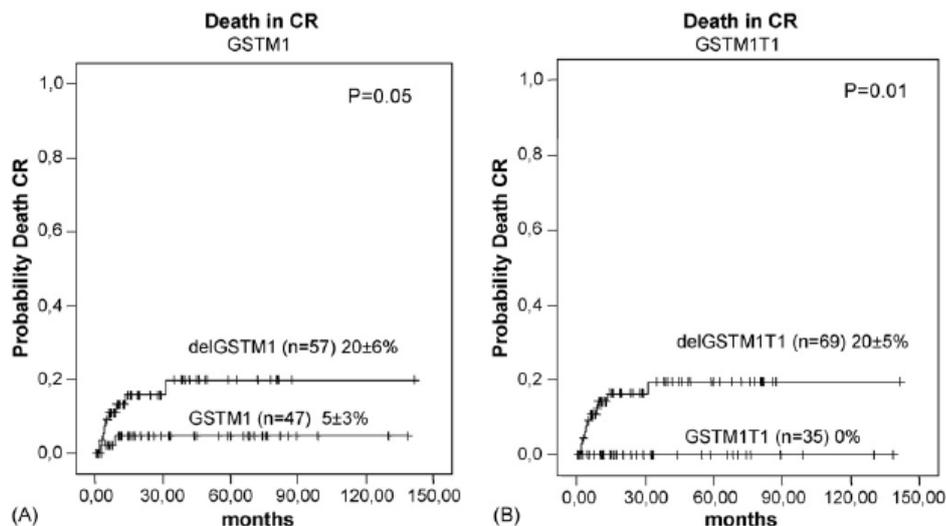


Fig. 5. The incidence of death in remission was significantly higher in patients with *del{GSTM1}* compared with those with undeleted *GSTM1* (panel A). The patients possessing at least one *GST* deletion showed higher incidence of death in remission compared with those with undeleted *GSTM1* and *GSTT1* (panel B).

alleles. Thus, we saw that 80.9% of *NQO1*-negative patients, 68.3% of heterozygous patients, and only 28.6% of homozygous patients achieved CR. *NQO1* is a two-electron reducing enzyme that is important for detoxification of some chemotherapy metabolites and activator of bioreductive anti-tumor agents such mitomycin-C [24,25]. The anthracyclines administered in AML treatment protocols show modest activation by *NQO1* enzyme through the production of reactive oxygen species and they are activated mainly by one-electron reduction [26]. Keeping in mind the detoxifying role of *NQO1*, it might be expected that heterozygous individuals, who have low or intermediate *NQO1* activity, and homozygous individuals, who lack *NQO1* activity, should undergo an increase in toxic effects due to this reduced detoxification activity. It has also been reported that the *NQO1*\*2 polymorphism reduces survival probabilities in children with AML on the basis of drug-associated toxicity [27]. However, in adult patients with AML, our results showed that the *NQO1*\*2 polymorphism influenced the rate of CR after induction, but had no impact on patients who had achieved CR. This is consistent with the report of Naoe et al. [28], who found no impact of the polymorphism on overall survival.

This study also indicated that the presence of at least one *GST* deletion was associated with lower DFS due to an increased incidence of death in remission. This effect was more significant in male patients. The *GST* enzymes play an important role in the detoxification of chemotherapeutic drugs including alkylating agents, doxorubicin and vincristine [29]. The polymorphisms result in a lack of enzymatic activity and a reduced detoxification role for *GST*. This reduced detoxification should increase toxicity but it might also be expected to confer a higher response due to the reduced degradation of chemotherapeutic agents. These effects could be more accentuated in male patients because of

the role of 17- $\beta$  estradiol. Experiments performed by Sanchez et al. [30] suggested that estradiol enhances *NQO1* and *GST* expression because the estradiol-receptor-estradiol complex binds to the electrophile response elements in the promoters of both genes. Therefore, women with polymorphisms that abrogate *GST* enzyme activity would be more protected than men because estradiol would induce *NQO1* expression. This study found that *GSTM1* and *GSTT1* deletions had no impact on response to induction treatment, contrary to the results reported by Voso et al. [9] in a similar adult series of AML patients. However, according to Davies et al. [10], patients with at least one *GST* deletion or *delGSTM1* had a worse DFS due to an increase in death in remission. The prognostic importance of the *GST* genotype was retained in multivariate analysis only in male patients suggesting effect modification by sex.

It is difficult to explain the specific mechanism through which *GSTM1* and *NQO1* polymorphism modify the response to treatment due to the dual role (activation and/or detoxification) and the large number of enzymes implicated in drug metabolism. Nevertheless, considering that the drugs administered in these patients show little activation through *NQO1* and *GST* enzymes, it could be expected that their putative effect were due to the decreased detoxification activity of these enzymes that produces the polymorphisms.

Some other reports have described a worse therapeutic outcome for *CYP1A1*\*2A in patients with AML [31] and acute lymphocytic leukemia [27]. Our study showed that this polymorphism has no prognostic impact. The discrepancies between our results and those reported by Voso et al. [31] in patients with AML could be attributable to some methodological differences and differences in the sources of patients. On the one hand, we explored only the T6235C polymorphism in *CYP1A1* and therefore could not detect the *CYP1A1*\*2B

allele, which results from a combination of T6235C and A4889G. The frequency of *CYP1A1\*2B* is around 3% in AML and it has no prognostic relevance. On the other hand, we only considered patients with *de novo* AML and the series reported by Voso et al. [31] included both patients with *de novo* AML and those with previous cancers. Therefore, we can expect some differences due to differences in treatment protocols.

In conclusion, this report emphasizes the influence of the *NQO1\*2* polymorphism on the response to induction treatment and of *GST* deletions on treatment outcome after chemotherapy. Our findings also stress the relevance of sex as a modulator of the effects of these polymorphisms, because the poor prognostic effects conferred by *GST* are more pronounced in men than in women. However, these results should be considered preliminary and must be confirmed in a larger series.

### Acknowledgement

This study was performed with the financial support of grant PI 02/0180 from the Spanish Instituto de Salud Carlos III.

### References

- [1] Appelbaum FR, Kopecky KJ. Long-term survival after chemotherapy for acute myeloid leukemia: the experience of the Southwest Oncology Group. *Cancer* 1997;80:2199–204.
- [2] Bloomfield CD, Shuma C, Regal L, Philip PP, Hossfeld DK, Hagemeyer AM, et al. Long-term survival of patients with acute myeloid leukemia: a third follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer* 1997;80:2191–8.
- [3] Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998;92:2322–3.
- [4] Tsuchida S, Sato K. Glutathione transferases and cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992;27:337–84.
- [5] Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 2003;348:529–37.
- [6] Friche E, Danks MK, Beck WT. Characterization of tumor cell resistance to 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin developed in Ehrlich ascites cells in vivo. *Cancer Res* 1992;52:5701–6.
- [7] Ingelman-Sundberg M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res* 2001;482:11–9.
- [8] Traver RD, Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Danenberg PV, Ross D, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT—diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res* 1992;52:797–802.
- [9] Voso MT, D'Alo F, Putzulu R, Mele L, Scardocci A, Chiusolo P, et al. Negative prognostic value of glutathione S-transferase (*GSTM1* and *GSTT1*) deletions in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;100:2703–7.
- [10] Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Tjoa T, Woods WG, Radloff GA, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2001;19:279–87.
- [11] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French–American–British Cooperative Group. *Br J Haematol* 1976;33:451–8.
- [12] Mitelman F, editor. *ISCN 1995: an international system for human cytogenetic nomenclature 1995*. Basel, Switzerland: S Karger; 1995.
- [13] Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplications of the *FLT3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1911–8.
- [14] Moreno I, Martin G, Bolufer P, Barragan E, Rueda E, Roman J, et al. Incidence and prognostic value of *FLT3* internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2003;88:19–24.
- [15] Harth V, Bruning T, Abel J, Koch B, Berg I, Sachinidis A, et al. Real-time genotyping of cytochrome P4501A1 A4889G and T6235C polymorphisms. *Mol Cell Probes* 2001;15:93–7.
- [16] Von Ahesen N, Richter M, Grupp C, Ring B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the *MDR-1* C3435T polymorphism or a *CYP3A4* promoter polymorphism (*CYP3A4-V* allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 2001;47:1048–52.
- [17] Choi JY, Abel J, Neuhaus T, Ko Y, Harth V, Hamajima N, et al. Role of alcohol and genetic polymorphisms of *CYP2E1* and *ALDH2* in breast cancer development. *Pharmacogenetics* 2003;13:67–72.
- [18] Harth V, Donat S, Ko Y, Abel J, Vetter H, Bruning T. NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 codon 609 polymorphism and its association to colorectal cancer. *Arch Toxicol* 2000;73:528–31.
- [19] Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, et al. Analysis of genetic polymorphism in *NQO1*, *GST-M1*, *GST-T1*, and *CYP3A4* in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and *de novo* acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:4091–5.
- [20] Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimations from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457–81.
- [21] Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966;50:163–70.
- [22] Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *JR Stat Soc B* 1972;34:187–220.
- [23] Birch JM. Genes and cancer. *Arch Dis Child* 1999;80:1–3.
- [24] Pan S, Forrest G, Akman S, Hu L. NAD(P)H:quinone oxidoreductase expression and mitomycin C resistance developed by human colon cancer HCT 116 cells. *Cancer Res* 1995;55:330–5.
- [25] Powis G. Free radical formation by antitumor quinones. *Free Radic Biol Med* 1989;6:63–101.
- [26] Gutierrez PL. The role of NAD(P)H oxidoreductase (DT-diaphorase) in the bioactivation of quinone-containing antitumor agents: a review. *Free Radic Biol Med* 2000;29:263–75.
- [27] Krajcinovic M, Labuda D, Mathonnet G, Labuda M, Moghrabi A, Champagne J, et al. Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:802–10.
- [28] Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, et al. Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy. *Leukemia* 2002;16:203–8.
- [29] Rocha JC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH, et al. Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005;105:4752–8.
- [30] Sanchez RI, Mesia-Vela S, Kauffman FC. Induction of NAD(P)H quinone oxidoreductase and glutathione S-transferase activities in livers of female August-Copenhagen Irish rats treated chronically with estradiol: comparison with the Sprague–Dawley rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;87:199–206.
- [31] Voso MT, D'Alo F, Gumiero D, Guidi F, Hohaus S, Leone G. The *CYP1A1\*2A* allele is an independent prognostic factor for acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2005;90:982–4.



## The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia

Pascual Bolufer, Maria Collado, Eva Barragán, José Cervera, María-José Calasanz, Dolores Colomer, José Roman-Gómez, Miguel A. Sanz

From the Laboratory of Molecular Biology, Department of Medical Biopathology, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain (PB, MC, EB); Cytogenetics, Service of Hematology, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain (JC); Department of Genetics, University of Navarra, Pamplona, Spain (M-JC); Hematology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain (DC); Service of Hematology, Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain (JR-G); Clinical Hematology, Service of Hematology, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain (MAS)

**Funding:** this study was performed with the financial support of the Spanish Instituto de Salud Carlos III (PI 02/0180).

Manuscript received September 11, 2006. Manuscript accepted January 16, 2007.

**Correspondence:**  
Pascual Bolufer Gilabert, Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Enfermería 7<sup>a</sup>, Hospital Universitario la Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain.  
E-mail: bolufer\_pas@gva.es

### ABSTRACT

#### Background and Objectives

We examined common polymorphisms in the genes for glutathione S-transferase (GST), cytochrome P450 (CYP), quinone oxoreductase (NQO1), methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR), and thymidylate synthetase (TYMS) and the role of gender associated with the susceptibility to *de novo* acute leukemia (AL).

#### Design and Methods

We conducted a case-control study analyzing the prevalence of the polymorphisms CYP1A1\*2A, CYP2E1\*5B, CYP3A4\*1B, *del*(GSTT1), *del*(GSTM1), NQO1\*2, MTHFR C6777, and TYMS 2R/3R in 443 patients with AL [302 with acute myeloblastic leukemia (AML) and 141 with acute lymphoblastic leukemia (ALL)] and 454 control volunteers, using polymerase chain reaction (PCR)-based methods.

#### Results

We found a higher incidence of *del*(GSTT1) in patients with AML than among controls (25.6% vs. 13.7%, OR=2.2,  $p < 0.001$ ) and a higher incidence of NQO1\*2 homozygosity (NQO1\*2<sub>hom.</sub>) in males with the M3 FAB subtype than in control males (8.6% vs. 2.2%, OR=4.9,  $p = 0.02$ ). The *del*(GSTT1) and NQO1\*2<sub>hom.</sub> polymorphisms increased the risk of ALL (OR=2.2 and 3.0,  $p = 0.001$  and 0.003, respectively). The higher risk conferred by NQO1\*2<sub>hom.</sub> and *del*(GSTT1) mainly affected males (OR=6.1 and 2.4;  $p = 0.002$  and 0.005, respectively).

#### Interpretation and Conclusions

Males harboring NQO1\*2<sub>hom.</sub> and *del*(GSTT1) polymorphisms showed a higher risk than females of developing AL. Thus, gender might influence the risk of AL associated with these genetic polymorphisms.

**Key words:** polymorphisms, gender, risk, drug-metabolizing enzymes, acute leukemia.

Haematologica 2007; 92:308-314

©2007 Ferrata Storti Foundation

Acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) are the most common acute leukemias (AL) in adults<sup>1</sup> and children.<sup>2,3</sup> On the whole AL is more common in males of all age groups,<sup>4</sup> a fact that remains unexplained. Although the clinical and biological aspects of leukemia are well documented, little is known about the factors that condition an individual's susceptibility to *de novo* leukemia. Normal polymorphic variations in several genes, together with dietary effects, environmental exposure to carcinogens, and individual immune system characteristics are likely to be factors that predispose individuals to develop AL.<sup>5</sup> Polymorphisms could also explain the different incidence of AL observed between the genders.

Genetic polymorphisms in the drug-metabolizing enzymes are extremely common and may contribute to the risk of developing cancers. These polymorphisms could explain differences in the way in which individuals metabolize chemical agents.<sup>6</sup> Studies have included polymorphisms of genes coding for P450 cytochromes (CYP), which are involved in phase I of metabolism (oxidation/activation). Most polymorphisms described for these genes, such as T6235C of *CYP1A1* (*CYP1A1\*2A*), C-1019T of *CYP2E1* (*CYP2E1\*5B*), and -A290G of *CYP3A4* (*CYP3A4\*1B*), are believed to cause an increase in enzymatic activity. They have been implicated in the bioactivation of several chemical carcinogens and the conversion of polyaromatic hydrocarbons from tobacco smoke into intermediate reactive metabolites, some of which can damage DNA.<sup>7</sup> Glutathione S-methyl transferases (GST) are implicated in phase II of metabolism (conjugation/detoxification). Two widespread genetic polymorphisms that involve deletions in the *GSTT1* and *GSTM1* genes, (*del[GSTT1]* and *del[GSTM1]*), have been reported to lead to abrogation of enzyme activity.

Quinone oxidoreductase (NQO1) is a detoxification enzyme that acts in limiting free radical oxidative stress. Two polymorphisms, the C609T (*NQO1\*2*) and C465T (*NQO1\*3*) substitutions, have been described in the *NQO1* gene; they cause complete loss or reduction of enzyme activity, respectively.<sup>8</sup>

Variations in the activity of genes involved in folic acid metabolism, such as methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) and thymidylate synthetase (*TYMS*), affect dUMP availability and hence DNA repair machinery. In particular, the *MTHFR C677T* polymorphism decreases the activity of the *MTHFR* enzyme and the double (2R) or triple (3R) 28 base pair repeat polymorphism in the 5'-untranslated region of *TYMS* (2R/3R *TYMS*) modifies the rate of enzyme transcription. Several studies have tried to relate these polymorphisms to the risk of *de novo* leukemia, particularly in patients with ALL. There are only a few reports on AML.<sup>9</sup> For both situations, the results obtained are controversial and require further investigation to confirm or

clarify the data obtained. Furthermore, as far as we know, there have been no studies on the possible relationship of these polymorphisms with gender. Such an interaction could explain the unequal risk of AL observed between the sexes.

To clarify these issues we conducted a case-control study to analyze the influence of the genetic polymorphisms *CYP1A1\*2A*, *CYP2E1\*5B*, *CYP3A4\*1B*, *del[GSTT1]*, *del[GSTM1]*, *NQO1\*2*, *MTHFR C677T*, and *TYMS 2R/3R* on susceptibility to *de novo* leukemia and to analyze their possible relationships with gender.

## Design and Methods

### Patients and subjects

We performed a case-control study including 443 patients with AL (302 with AML and 141 with ALL) and a control group composed of 454 individuals without leukemia. The AL samples were from the *La Fe* hospital and from other Spanish hospitals. The samples from *La Fe* hospital were collected sequentially between 1992 and 2005 from patients at the time of diagnosis. Samples from the other Spanish hospitals were not sequential (stored DNA or cellular samples kept frozen). The diagnosis of AML was made in accordance with morphological and cytochemical criteria of the French-American-British (FAB) classification.<sup>10</sup> The diagnosis of ALL was based on immunophenotypic criteria. The main characteristics of the patients are shown in Table 1. Here we studied AML and ALL separately, but grouped together all cases of infant, childhood, and adult AL because we did not find any statistical differences in the incidence of any the polymorphisms between patients aged 16 years or younger (infant and childhood AL) and those older than 16 (adult AL).

The control group consisted of volunteers who had attended the hospital for blood sampling for biochemistry and/or hematologic analyses and who were willing to participate in the study. Subjects with any hematologic or other malignancy were excluded. Informed consent was obtained from all patients and controls in accordance with the recommendations of the Declaration of Human Rights, at the Conference of Helsinki, and also in compliance with institutional regulations (the hospital ethics committee).

### Samples and DNA extraction

Venous blood samples were collected from control subjects, or from patients at diagnosis or in complete hematologic remission, into vacuum tubes containing EDTA.K3. The DNA was extracted directly from 500  $\mu$ L aliquots of whole blood using large volume MagNA Pure LC DNA Isolation kits (Roche, Mannheim, Germany) automatically in the MagNA Pure LC System (Roche).

### Cytogenetic analysis

Karyotype analysis was performed using unstimulated short-term cultures and described in accordance with the recommendations of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1995).<sup>11</sup> Whenever possible, at least 20 metaphases were evaluated. Cytogenetic risk groups were defined by karyotype as follows: *high risk*,  $-5/\text{del}(5q)$ ,  $-7/\text{del}(7q)$ ,  $\text{abn } 3q$ , complex aberrations ( $\geq 3$  independent aberrations),  $t(9;22)$ , and  $t(6;9)$ ; *low risk*,  $t(8;21)$ ,  $t(15;17)$ , and  $\text{inv}(16)$ ; *intermediate risk*, all other karyotypic aberrations or a normal karyotype.

### Genotyping of polymorphisms

We studied the genetic polymorphisms *CYP1A1\*2A*, *CYP2E1\*5B*, *CYP3A4\*1B*, *del{GSTT1}*, *del{GSTM1}*, *NQO1\*2*, *MTHFR C677T*, and *TYMS 2R/3R*. Most detection methods used were based on real-time polymerase chain reaction (PCR) performed in a LightCycler (Roche) using primers and fluorescence-labeled hybridization probes, as described below. Genotyping was based on different melting temperatures achieved by the hybridization probes for wild-type and polymorphic alleles. Thus, *CYP1A1\*2A* was detected as described by Harth *et al.*,<sup>12</sup> *CYP3A4\*1B* as described by Von Ahnen *et al.*,<sup>13</sup> *CYP2E1\*5B* as described by Choi *et al.*,<sup>14</sup> and *NQO1\*2* as described by Harth *et al.*<sup>15</sup> For the detection of *MTHFR C677T* we followed the method recommended by Roche (Applied Science), using the primers *MTHFR\_s* (cgaagcaggagccttgaggctg) and *MTHFR\_as* (aggacgggtcggtgagagtg) and the hybridization probes *MTHFR\_LC* labeled with Red640 at the 5' end (*LC Red640-cgggagccgattcatcat-ph*) and *MTHFR\_3FL* (tgacctgaagcactgaaggagaaggtgctc X) labeled with fluorescein. The *del{GSTT1}* and *del{GSTM1}* polymorphisms were detected following the conventional PCR method of Naoe *et al.*,<sup>16</sup> comprising a multiplex PCR that co-amplifies the target genes simultaneously with the  $\beta$ -globin gene used as a reference control gene. The *TYMS 2R/3R* polymorphism was detected using the conventional PCR method described by Villafranca *et al.*<sup>17</sup>

### Statistical procedures

$\chi^2$  analysis with two-way contingency tables was used to test the association of polymorphisms with other qualitative variables or to check for Hardy–Weinberg equilibrium for each polymorphism in the control group. The influence of each polymorphism on the risk of AL was estimated by applying univariate or multivariate binary logistic regression, including gender and the genotypes of cases (AML or ALL) and controls and estimating the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) of the parameters included in the model. Errors generated by multiple testing were corrected using a sharpened step-up Hochberg's procedure to control the experimental error

**Table 1.** Characteristics of the study groups.

Variables	Cases			
	AML (n=302) n (%)	ALL (n=141) n (%)	Control Group (n=454) n (%)	
Age*				
n;median (range)				
≤ 1 year	3; 3(0.8-1)	2; 2(1-1)	3; 1(1-1)	
>1 year and ≤ 16 years	32; 9(1.1-16)	46; 7.5(2-16)	48; 9(2-16)	
>16 years and ≤ 60 years	187; 42(17-60)	76; 33(17-59)	336; 37(17-60)	
> 60 years	80; 67(61-84)	17; 66(61-82)	67; 68(61-85)	
Gender				
Men	166 (54.9)	87 (61.7)	223 (49.1)	
Women	136 (45.0)	54 (38.2)	231 (50.8)	
FAB type			Immunophenotype	
Undifferentiated	3 (0.95)		B-ALL	92 (65.2)
Mixed	1 (0.33)		T-ALL	23 (16.3)
Biphenotypic	1 (0.33)		PreB-ALL	18 (12.7)
M0	11 (3.7)		Ph <sup>+</sup> -ALL	8 (5.6)
M1	48 (15.9)			
M2	48 (15.9)			
M3	107 (35.4)			
M4	37 (12.3)			
M5	29 (9.6)			
M6	10 (3.3)			
M7	4 (1.3)			
Not classified	3 (1.0)			
Cytogenetic risk				
high	19 (6.3)	9 (6.3)		
intermediate	119 (39.4)	56 (39.7)		
low	67 (22.2)			
not available	97 (32.1)	76 (53.9)		

ALL: acute lymphoblastic leukemia; AML: acute myeloblastic leukemia; \*at diagnosis of AML or ALL. B-ALL and T-ALL: patients with ALL who showed B antigens or T antigens, respectively. PreB-ALL: patients with ALL who showed B antigens and  $\mu$  chains. Ph<sup>+</sup>-ALL: patients with ALL who harbored the Philadelphia chromosome.

rate,<sup>18</sup> which fixed the limit of significance for two-sided *p*-values at 0.038. To eliminate the effects of empty cells, we computed the OR adding 0.5 to each cell according to Cox *et al.*<sup>19</sup> All analyses were performed using the software package Statistical Program for Social Sciences (SPSS) version 12.0 (Chicago, IL, USA).

## Results

### Polymorphisms and demographic characteristics

We verified that the genotypic frequencies of polymorphisms in the control group complied with the Hardy–Weinberg equilibrium. We did not find any statistical differences in the incidence of genotypes among defined age groups (<18, 18–40, 41–50, 51–60 and >60 years). We did not find any statistical differences in the genotypic frequencies when stratified by gender for the three study groups (controls, ALL, and AML).

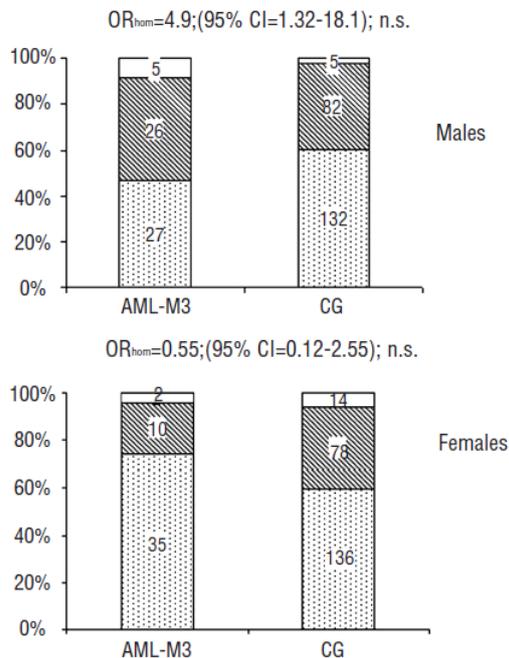
**Polymorphisms and characteristics of the AML group**

Stratification of the AML group by age at diagnosis, gender, FAB subtype, or cytogenetic risk revealed no differences in genotype frequencies. Females with the M2 FAB subtype showed twice the incidence of the *del(GSTM1)* polymorphism compared with males with the same FAB subtype (59.1% and 21.7%, respectively,  $\chi^2=6.5$ ,  $p=0.01$ ). We also observed that the *CYP2E1\*5B* polymorphism was significantly more frequent in patients with the M3 FAB subtype than in those with non-M3 FAB subtypes (11.2% vs. 2.8%,  $\chi^2=9.0$ ,  $p=0.01$ ).

**Polymorphisms and risk of AML**

The *del(GSTT1)* polymorphism was more prevalent in patients with AML than in the control group (25.6% vs. 13.7%, OR=2.2, 95% CI=1.5–3.2,  $p<0.001$ ; Table 2).

We did not find any statistical difference in the incidence of the *NQO1\*2* polymorphism between AML patients and the control group. However, we found a higher incidence of the homozygous (*hom.*) genotype in males with the M3 FAB subtype than in males of the control group [8.6% (5/58) vs. 2.2% (5/219), OR<sub>hom.</sub>=4.9, 95% CI=1.3–18.1,  $p=0.02$ ; Figure 1]. Conversely, there was no significant statistical difference in the incidence of the *NQO1\*2* polymorphism for the M3 FAB subtype among females. This difference in the pattern of inci-



**Figure 1.** The *NQO1\*2* polymorphism in patients with acute myeloid leukemia (AML) subtype M3 of the French-American-British (FAB) classification and the control group (CG). Blank area, homozygous genotypes; dashed area, heterozygous genotypes; dotted area, negative. OR<sub>hom.</sub> shows the odds ratio for homozygous genotypes; CI: confidence interval; n.s.: not significant.

dence of the *NQO1\*2* polymorphism between the sexes showed statistically significant interactions (OR<sub>het.\*male</sub>=3.1, 95% CI=1.2–8.2,  $p=0.02$  and OR<sub>hom.\*male</sub>=8.8, 95% CI=1.2–65.7,  $p=0.03$ ). When all statistically significant parameters detected in the univariate logistic regression (*del(GSTT1)*, *NQO1\*2*, sex and *NQO1\*2\*sex*) were included in the multivariate logistic regression model for the entire group of patients with AML (n=274) and the control group (n=438), the *del(GSTT1)* (OR=1.9, 95% CI=1.3–2.9,  $p=0.001$ ) and the

**Table 2.** Genotype frequencies of the polymorphisms and odds ratio for acute myeloblastic and lymphoblastic leukemia.

Polymorphisms Genotypes	Control group n/total (%)	AML n/total (%)	OR (95% CI)	p value	ALL n/total (%)	OR (95% CI)	p value
<i>CYP1A1*2A</i>							
Heterozygous	84/403 (20.8)	31/199 (15.6)	0.69 (0.43-1.09)	n.s.	13/92 (14.1)	0.62 (0.32-1.17)	n.s.
Homozygous	2/403 (0.5)	0/199 (0.0)	0.40* (0.02-8.42)	n.s.	0/92 (0.0)	0.87* (0.04-18.23)	n.s.
<i>CYP2E1*5B</i>							
Heterozygous	23/390 (5.9)	13/225 (5.8)	0.96 (0.48-1.98)	n.s.	8/118 (6.8)	0.86 (0.37-1.98)	n.s.
Homozygous	0/390 (0.0)	1/225 (0.4)	5.21* (0.21-128.5)	n.s.	0/118 (0.0)	Undefined (0.0)	n.s.
<i>CYP3A4*1B</i>							
Heterozygous	29/357 (8.1)	14/222 (6.3)	0.77 (0.39-1.48)	n.s.	6/128 (4.7)	0.56 (0.23-1.38)	n.s.
Homozygous	0/357 (0.0)	1/222 (0.5)	4.84* (0.20-119.3)	n.s.	1/128 (0.8)	8.41* (0.34-207.68)	n.s.
<i>del(GSTM1)</i>							
Homozygous	232/451 (51.4)	143/295 (48.5)	0.88 (0.66-1.191)	n.s.	64/140 (45.7)	0.79 (0.54-1.16)	n.s.
<i>del(GSTT1)</i>							
Homozygous	61/455 (13.7)	74/289 (25.6)	2.17 (1.48-3.16)	<0.001	36/141 (25.5)	2.15 (1.35-3.43)	0.001
<i>NQO1*2</i>							
Heterozygous	160/447 (35.8)	94/273 (34.4)	0.96 (0.71-1.33)	n.s.	41/120 (34.2)	1.05 (0.68-1.63)	n.s.
Homozygous	19/447 (4.3)	16/273 (5.9)	1.38 (0.69-2.77)	n.s.	14/120 (11.7)	3.03 (1.44-6.37)	0.003
<i>MTHFR C677T</i>							
Heterozygous	160/331 (48.3)	80/163 (49.1)	0.98 (0.64-1.50)	n.s.	53/117 (45.3)	0.72 (0.45-1.13)	n.s.
Homozygous	65/331 (19.6)	29/163 (17.8)	0.87 (0.51-1.51)	n.s.	15/117 (12.8)	0.49 (0.26-0.96)	(n.s.)
<i>TYMS</i>							
2R3R	162/347 (46.7)	94/169 (55.6)	1.19 (0.73-1.94)	n.s.	42/108 (38.9)	0.77 (0.43-1.37)	n.s.
3R3R	117/347 (33.7)	42/169 (24.9)	0.74 (0.43-1.27)	n.s.	43/108 (39.8)	1.08 (0.60-1.95)	n.s.

ALL: acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloblastic leukemia; n.s.: not significant. (n.s.) limit of significance. \*The adjusted odds ratio (OR) was computed by adding 0.5 to each cell to eliminate empty cells.

interaction  $NQO1*2_{het/male}$  (OR=3.6, 95% CI=1.2–10.9,  $p=0.02$ ) were the only independent parameters that conferred an increased risk of leukemia.

When we introduced polymorphisms stratified by gender into the multivariate logistic regression, we found that  $NQO1*2_{hom}$  (OR=3.4, 95% CI=1.1–10.2,  $p=0.03$ ) was the only independent risk factor among males (control group=214 and AML=151), whereas  $del\{GSTT1\}$  (OR=2.3, 95% CI=1.3–3.9,  $p=0.005$ ) was the only independent risk factor for females (control group=224 and AML=123).

**Polymorphisms and susceptibility to ALL**

Stratification of patients with ALL by age at diagnosis, gender, B- or T-cell lineage, or cytogenetic risk revealed no statistically significant differences in genotype frequencies. We found a higher incidence of the  $del\{GSTT1\}$  in patients with ALL than in the control group (25.5% vs. 13.7%, OR=2.2,  $p=0.001$ ; Table 2). This difference was mainly because of males with ALL, who showed a 24.5% (24/87) incidence of the polymorphism compared with a 13.7% (30/218) incidence among the males in the control group (OR=2.4,  $p=0.005$ ; Figure 2). Likewise, we observed a higher incidence of the  $NQO1*2_{hom}$  in patients with ALL than in the control group (11.7% vs. 4.3%, OR<sub>hom</sub>=3.0,  $p=0.003$ ; Table 2). This statistical difference was because 12.5% (9/72) of the males with ALL were homozygous for this polymorphism compared to only 2.2% (5/219) of the control group (OR<sub>hom</sub>=6.1,  $p=0.002$ ; Figure 3). This difference was not, however, observed in females.

For  $MTHFR C677T$ , we observed a lower incidence of homozygosity among the ALL patients than among the control group (12.8% vs. 19.6%, OR=0.5,  $p=0.038$ ), although this difference only just reached statistical significance.

When polymorphisms found to have statistical significance by univariate logistic regression, ( $del\{GSTT1\}$  and  $NQO1*2$ ), were introduced into a multivariate logistic model,  $NQO1*2$  was the only independent risk factor for ALL (OR <sub>$NQO1*2_{hom}$</sub> =3.2, 95% CI=1.5–6.7,  $p=0.003$ ). When these polymorphisms were stratified by gender, the  $NQO1*2_{hom}$  genotype was the only independent risk factor for ALL in males (72 ALL and 214 control group; OR=5.9, 95% CI=1.8–18.8,  $p=0.002$ ). However, we could not find any polymorphism with statistical significance for risk among females (48 ALL and 224 control group).

**Discussion**

We found a higher incidence of the  $del\{GSTT1\}$  polymorphism among patients with AML than among controls, which is consistent with previous reports.<sup>20,21</sup> In contrast to Smith *et al.*,<sup>22</sup> in the present study we found

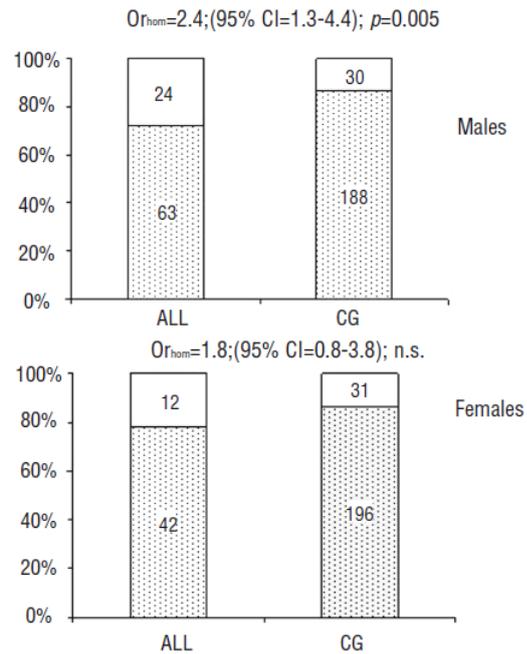


Figure 2. The  $del\{GSTT1\}$  polymorphism in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and the control group (CG). Blank area, homozygous genotypes; dotted area, negative genotypes. OR<sub>hom</sub>, odds ratio for homozygous genotypes; CI: confidence interval; n.s.: not significant.

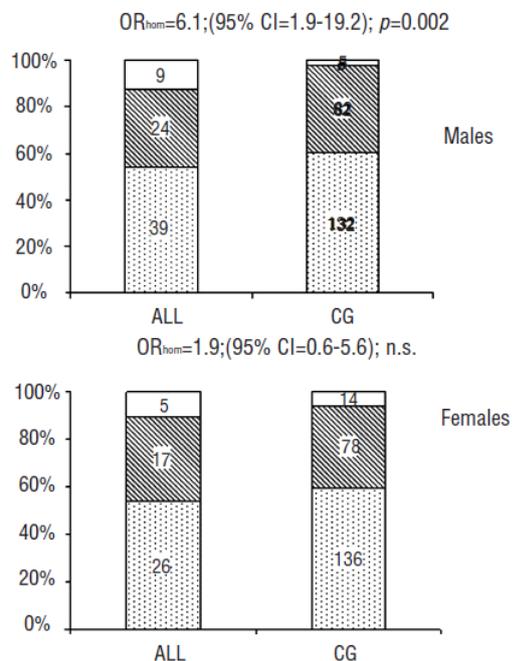


Figure 3. The  $NQO1*2$  polymorphism in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and the control group (CG). Blank area, homozygous genotypes; dashed area heterozygous genotypes; dotted area, negative. OR<sub>hom</sub>, odds ratio for homozygous genotypes; CI: confidence interval; n.s.: not significant.

no association of the *NQO1\*2* polymorphism with an increased risk of AML. However, males with the M3 FAB subtype who were homozygous for the *NQO1\*2* polymorphism showed an increased risk of AML, an effect not manifest in females. Although as far as we know this association has not been reported previously, there are supporting data. Reynolds *et al.*<sup>23</sup> reported that the myeloperoxidase (*MPO*) polymorphism *MPO\*2*, consisting of a G-642A variation in the promoter region of *MPO*, was overrepresented in patients with the AML-M3 and M4 FAB subtypes. Furthermore, the *MPO\*2* genotype enhances *MPO* expression and cooperates with *NQO1\*2* homozygosity, increasing susceptibility to benzene poisoning.<sup>24</sup>

The statistical results obtained here for patients with AML mainly represent the two thirds of patients who were under 30 or over 50 years of age. Cartwright *et al.*<sup>25</sup> reported a clear predominance of AML among males in these age ranges, whereas the disease was more prevalent among women aged between 30 and 50 years. Thus, the greater susceptibility to AML conferred by *NQO1\*2* in males and the interaction between genders for the incidence of *NQO1\*2* in M3 FAB that we found here may help explain the higher male-linked risk of leukemia.

In contrast with other reports,<sup>26-30</sup> we found here that the *del(GSTT1)* genotype was associated with an increased risk of ALL. This discrepancy could be explained in part by differences in the age of the study populations: the subjects in the present study were mostly adults whereas in the other studies they were mostly children. Moreover, the higher incidence of the *del(GSTT1)* polymorphism we found in our study was mainly among males with ALL. Our results for the *NQO1\*2* polymorphism in patients with ALL were concordant with the data for patients with the M3 FAB subtype. Thus, the presence of the *NQO1\*2* polymorphism increased the risk of ALL only in males, but did not modify it in females. The increased risk of ALL conferred by *NQO1\*2* homozygosity found in this study is in agreement with some studies carried out in children with ALL,<sup>31-33</sup> however, other reports did not support these results.<sup>34,35</sup>

The statistical results obtained here for patients with ALL are based mainly on subjects older than 10 years (100/141; 71%). For this age group, Cartwright *et al.*<sup>25</sup> reported a clear predominance of ALL among males, whereas the incidence of ALL in children was similar in

the two series. In this regard, our findings of the increased risk of ALL in males conferred by the *del(GSTT1)* polymorphism and, in particular, by the *NQO1\*2* polymorphism, provides a genetic basis for the higher incidence of ALL reported in males. Because there is no current environmental hypothesis to explain the higher incidence of AL in males, it could be hypothesized that females are genetically better protected than males against environmental and toxic agents that cause AL. In this regard, a study carried out among Malaysians<sup>36</sup> suggested the presence of a gene located near the ABO locus on chromosome 9, which could protect women with a group O blood type against AL. Additionally, several results suggest a possible role of sex steroids in the control of the proliferation of leukemic cells. For example, it has been reported that the antiproliferative effect of 17- $\beta$  estradiol on the human monoblastic cell line U937 is more powerful than that of testosterone.<sup>37</sup> Furthermore, the distinct effects of the polymorphism in the sexes might also explain the poorer treatment response observed in boys with ALL than in girls with ALL.<sup>38</sup>

Our data also support the importance of *NQO1\*2* homozygosity and the *del(GSTT1)* genotype in increased susceptibility to AL, which is particularly evident in males. This association suggests that gender might influence the risk of AL when associated with genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. Furthermore, the interaction of gender with such polymorphisms could contribute to a better understanding of the higher incidence of AL in males. However, the relevance of gender as a modifier of the risk of developing leukemia clearly requires further experimental study.

#### Authors' Contributions

*PB was the principal investigator and takes primary responsibility for the paper. MC performed the laboratory assays. MAS and MJC contributed to the conception and design of the study, and to the statistical analysis. EB performed the statistical analysis and interpreted the results. PB and MAS wrote the manuscript. DC, JC and JRG contributed to the revision and scientific review of the manuscript. The order of the authorship was a joint decision by the authors. All authors approved the final version of this article. JC and MJC prepared Table 1, and MC prepared Table 2; the figures were prepared by EB.*

#### Conflict of Interest

*The authors reported no potential conflicts of interest.*

## References

- Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;341:1051-61.
- Ross JA, Davies SM, Potter JD, Robison LL. Epidemiology of childhood leukemia, with focus on infants. *Epidemiol Rev* 1994; 16:243-72.
- Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Opin Oncol* 2000;12:3-12.
- Henderson ES. Acute leukemia: general considerations. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, eds. *Hematology*, 4<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 237.
- Bowen DT, Frew ME, Rollinson S, Roddam PL, Dring A, Smith MT, et al. CYP1A1\*2B (Val) allele is overrepresented in a subgroup of acute myeloid leukemia patients with poor-risk karyotype associated with NRAS mutation, but not associated with FLT3 internal tandem duplication. *Blood* 2003;101:2770-4.
- Birch JM. Genes and cancer. *Arch Dis Child* 1999;80:1-6.
- Ingelman-Sundberg M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res* 2001;482:11-9.
- Traver RD, Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Danenberg PV, Ross D, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res* 1992;52:797-802.
- Bolufer P, Barragan E, Collado M, Cervera J, Lopez JA, Sanz MA. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. *Leuk Res* 2006;30:1471-91.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative group. *Br J Haematol* 1976;33:451-8.
- Mitelman F, ed. *ISCN 1995: An international System for Human Cytogenetic Nomenclature* 1995. Basel, Switzerland: S. Karger. 1995.
- Harth V, Bruning T, Abel J, Koch B, Berg I, Sachinidis A, et al. Real-time genotyping of cytochrome P4501A1 A4889G and T6235C polymorphisms. *Mol Cell Probes* 2001; 15: 937.
- von Ahnen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V Allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 2001; 47:1048-52.
- Choi JY, Abel J, Neuhaus T, Ko Y, Harth V, Hamajima N, et al. Role of alcohol and genetic polymorphisms of CYP2E1 and ALDH2 in breast cancer development. *Pharmacogenetics* 2003;13:67-72.
- Harth V, Donat S, Ko Y, Abel J, Vetter H, Bruning T. NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 codon 609 polymorphism and its association to colorectal cancer. *Arch Toxicol* 2000; 73: 528-31.
- Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, et al. Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1 and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:4091-5.
- Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, Garcia-Foncillas J, Azinovic I, Martinez E, et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1779-86.
- Hochberg Y, Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing? *Stat Med* 1990; 9: 811-8.
- Cox DR, Snell EJ. *Analysis of binary data*. 2<sup>nd</sup> edition; London: Chapman and Hall. 1989.
- Rollinson S, Roddam P, Kane E, Roman E, Cartwright R, Jack A, et al. Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia. *Carcinogenesis* 2000;21:43-7.
- D'Alo F, Voso MT, Guidi F, Massini G, Scardocci A, Sica S, et al. Polymorphisms of CYP1A1 and glutathione S-transferase and susceptibility to adult acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004; 89: 664-70.
- Smith MT, Wang Y, Kane E, Rollinson S, Wiemels JL, Roman E, et al. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood* 2001;97:1422-6.
- Reynolds WF, Chang E, Douer D, Ball ED, Kanda V. An allelic association implicates myeloperoxidase in the etiology of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1997;90:2730-7.
- Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Traver RD, Hoener B, Campleman S, et al. Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with NQO1 609C→T variation and rapid functional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res* 1997;57:2839-42.
- Cartwright RA, Gurney KA, Moorman AV. Sex ratios and the risks of haematological malignancies. *Br J Haematol* 2002;118:1071-7.
- Chen CL, Liu Q, Pui CH, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro R, et al. Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;99:1701-7.
- Krajcinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnott D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: Influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood* 1999; 93: 1496-501.
- Balta G, Yuksek N, Ozyurek E, Ertem U, Hicsonmez G, Altay C, et al. Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematol* 2003; 73:154-60.
- Alves S, Amorim A, Ferreira F, Norton L, Prata MJ. The GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children from north Portugal. *Leukemia* 2002;16:1565-7.
- Davies SM, Bhatia S, Ross JA, Kiffmeyer WR, Gaynon PS, Radloff GA, et al. Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100:67-71.
- Smith MT, Wang Y, Skibola CF, Slater DJ, Lo Nigro L, Nowell PC, et al. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children. *Blood* 2002;100:4590-3.
- Wiemels JL, Pagnamenta A, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. *Cancer Res* 1999;59:4095-9.
- Lanciotti M, Dufour C, Corral L, Di Michele P, Pigullo S, De Rossi G, et al. Genetic polymorphism of NAD(P)H:quinone oxidoreductase is associated with an increased risk of infant acute lymphoblastic leukemia without MLL gene rearrangements. *Leukemia* 2005;19:214-6.
- Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, Knight D, Sadakane Y, Isoyama K, et al. The association of a distinctive allele of NAD(P)H:quinone oxidoreductase with pediatric acute lymphoblastic leukemias with MLL fusion genes in Japan. *Haematologica* 2005;90:1511-5.
- Kracht T, Schrappe M, Strehl S, Reiter A, Elsner H-A, Trka J, et al. NQO1 C609T polymorphism in distinct entities of pediatric hematologic neoplasms. *Haematologica* 2004; 89:1492-7.
- Jackson N, Menon BS, Zarina W, Zawawi N, Naing NN. Why is acute leukemia more common in males? A possible sex-determined risk linked to the ABO blood group genes. *Ann Hematol* 1999;78:233-6.
- Mossuz P, Cousin F, Castinel A, Chauvet M, Sotto MF, Polack B, et al. Effects of two sex steroids (17 beta estradiol and testosterone) on proliferation and clonal growth of the human monoblastic leukemia cell line, U937. *Leuk Res* 1998; 22:1063-72.
- Shuster JJ, Wacker P, Pullen J, Humbert J, Land VJ, Mahoney DH, et al. Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1998;16:2854-63.



## Profile of polymorphisms of drug-metabolising enzymes and the risk of therapy-related leukaemia

Pascual Bolufer,<sup>1</sup> Maria Collado,<sup>1</sup>  
Eva Barragan,<sup>1</sup> María-José Calasanz,<sup>2</sup>  
Dolors Colomer,<sup>3</sup> Mar Tormo,<sup>4</sup>  
Marcos González,<sup>5</sup> Salut Brunet,<sup>6</sup>  
Montserrat Batlle,<sup>7</sup> José Cervera<sup>8</sup> and  
Miguel-Angel Sanz<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biology (Medical Biopathology), Hospital Universitario La Fe, <sup>2</sup>Department of Genetics, University of Navarra, <sup>3</sup>Department of Haematology, Hospital Clínic de Barcelona, <sup>4</sup>Department of Haematology, Hospital Clínic de Valencia, <sup>5</sup>Department of Haematology, Hospital Clínic de Salamanca, <sup>6</sup>Department of Haematology, Hospital Sant Pau, <sup>7</sup>Department of Haematology, Hospital Germans Trias i Pujol, and <sup>8</sup>Department of Haematology, Hospital La Fe, Valencia, Spain

Received 15 September 2006; accepted for publication 22 November 2006; first published online 8 January 2007

Correspondence: Pascual Bolufer, Laboratory of Molecular Biology, Service of Medical Biopathology, Hospital Universitario La Fe, Avd. Campanar 21, Valencia 46009, Spain.  
E-mail: bolufer\_pas@gva.es

Interest in the risk of therapy-associated secondary malignancies is growing because of the increased survival of cancer patients (Kollmannsberger *et al*, 1998). Secondary cancers occur in about 7% of survivors of primary malignant (PM) neoplasms (Flannery *et al*, 1985). Therapy-related acute myeloid leukaemia (t-AML) or therapy-related myelodysplasia (t-MDS) are the most serious long-term complications of cancer chemotherapy (Levine & Bloomfield, 1992; Donaldson & Hancock, 1997; Wolden *et al*, 1998). The cumulative risks of developing t-AML/t-MDS at 10 years after the start of chemotherapy for breast cancer, non-Hodgkin lymphoma, ovarian cancer, or Hodgkin disease are 1.5%, 7.9%, 8.5%, and 3.8% respectively (Radjendirane *et al*, 1998; Larson *et al*, 1999; Moran *et al*, 1999; Naoe *et al*, 2000).

The risk of developing secondary leukaemia after a PM neoplasm is determined by the type of chemotherapeutic

### Summary

Therapy-related acute myeloid leukaemia/myelodysplastic syndrome (t-AML/t-MDS) results from an impaired ability to detoxify chemotherapeutic drugs or repair drug-induced genetic damage caused by genetic polymorphisms in enzymes involved in the metabolism of drugs. We analysed the prevalence of genetic polymorphisms of *CYP1A1\*2A(T6235C)*, *CYP2E1\*5B(C-1019T)*, *CYP3A4\*1B(A-290G)*, *del{GSTT1}*, *del{GSTM1}*, *NQO1\*2(C609T)*, *MTHFR(C677T)* and *TYMS 2R/3R* in 78 t-AML/t-MDS and 458 normal individuals (control group, CG) using real-time and conventional polymerase chain reaction (PCR)-based methods. The incidences of polymorphisms among t-AML/t-MDS patients and CG individuals were similar. However, a polymorphism profile consisting of *CYP1A1\*2A*, *del{GSTT1}* and *NQO1\*2* strongly modified the risk of t-AML/t-MDS. The absence of all three polymorphisms decreased the risk of t-AML/t-MDS 18-fold (odds ratio (OR) = 0.054, 95% confidence interval (CI) = 0.005–0.63, *P* = 0.02), whereas the presence of only *NQO1\*2* or all three polymorphisms enhanced the risk of t-AML/t-MDS (OR = 2.09, 95% CI = 1.08–4.03, *P* = 0.03 and OR = 18.42, 95% CI = 1.59–212.76, *P* = 0.02 respectively). Thus, the profiles of genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes might explain the increased risk to t-AML/t-MDS observed in some patients treated with polychemotherapy.

**Keywords:** polymorphisms, drug-metabolising enzymes, therapy-related leukaemia, therapy-related myelodysplastic syndrome.

agents administered and the dose intensity. t-AML/t-MDS is frequently caused by alkylating agents and DNA topoisomerase II inhibitors (Kelly & Perentesis, 2002).

Because only a minority of patients develop leukaemia after chemotherapy, it has been suggested that differences in host-drug interactions may predispose certain individuals to t-AML/t-MDS. Some patients may have increased susceptibility to t-AML/t-MDS because of genetic polymorphisms in drug-metabolising enzymes, which result in impaired detoxification of chemotherapeutic drugs or inefficient repair of drug-induced genetic damage (Perentesis, 2001). Such polymorphisms would explain differences in the ways that individuals metabolise chemical agents (Birch, 1999). Polymorphisms are not generally associated with a substantially increased risk of developing leukaemia when considered in isolation from other etiological factors or exposure to chemotherapy, but may

constitute risk factors of low penetrance for the development of secondary malignancies (Kelly & Perentesis, 2002).

CYP1A1 is a member of the cytochrome P450 family and is a phase I enzyme involved in the bioactivation of several chemical carcinogens, including polycyclic aromatic hydrocarbons (Ingelman-Sundberg, 2001). The CYP1A1\*2A polymorphism consists in the change T > C at nt. 6235 (T6235C) of the gene located in the 3' untranslated region of exon 7. It has been shown that this polymorphism increases CYP expression (Kawajiri *et al*, 1990). The CYP3A4 gene encodes an abundant hepatic P450 protein involved in the metabolism of corticosteroids, cyclophosphamide, vinca alkaloids and some anthracycline agents. The A(-290)G polymorphism, also known as CYP3A4-V, has been reported in the promoter region of the CYP3A4 gene (Felix *et al*, 1998). The role of this polymorphism is controversial, but it has been suggested (Felix *et al*, 1998) that it could reduce transcription. CYP2E1 plays a role in the production of reactive oxygen species (the superoxide anion and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which can cause tissue damage. The CYP2E1\*5B polymorphism, consisting of a C-1019T substitution in the 5' promoter region of the gene, increases transcriptional expression (Hayashi *et al*, 1991).

The enzymes, GSTT1 and GSTM1, are involved in phase II metabolism and mediate the conjugation of electrophilic compounds to glutathione, resulting in the detoxification of some chemotherapeutic drugs including alkylating agents, doxorubicin and vincristine (Rocha *et al*, 2005). *del{GSTT1}* and *del{GSTM1}* are widespread polymorphisms in human GSTT1 and GSTM1 genes and result in complete deletion of the gene and consequent loss of enzymatic activity (Seidegard *et al*, 1988).

Quinone-oxoreductase, NQO1, is a two-electron reducing enzyme that is important for detoxification of some chemotherapy metabolites and is an activator of bioreductive anti-tumour agents, such mitomycin-C (Traver *et al*, 1992). The NQO1\*2 polymorphism occurs in the NQO1 gene and consists of a C609T substitution, which results in P187S acid replacement and causes a complete loss of enzyme activity (Krajinovic, 2005).

Variation in activity of the methylene tetrahydrofolate reductase gene (*MTHFR*) (Krajinovic *et al*, 2004), which participates in folic acid metabolism, and that of thymidylate synthase gene (*TYMS*) (Skibola *et al*, 2002), which plays an indirect role in accurate DNA synthesis, could be relevant to t-AML/t-MDS leukaemia susceptibility. In the *MTHFR* gene, the C677T polymorphism leads to an A222V substitution. This polymorphism produces a thermolabile enzyme that causes hyperhomocysteinemia in carriers with low plasma levels of folic acid (Engbersen *et al*, 1995).

*TYMS* possesses a unique site of internal tandem repetition at a 5' UTR, upstream of the ATG start codon (Marsh *et al*, 2000). This polymorphism consists of 28 bp tandem repeats in multiples of two (2R) or three (3R). The 3R polymorphism enhances gene expression.

Past studies of genetic polymorphisms in t-AML/t-MDS patients were limited by small numbers of subjects and

polymorphisms. Moreover, there are few reports of interactions between polymorphisms of genes involved in genotoxic metabolism.

In our study, we used a series of 78 cases and 454 controls to examine the effects and interactions of eight common genetic polymorphisms associated with genes expressing drug-metabolising enzymes on the risk of contracting t-AML/t-MDS.

## Materials and methods

### Patients and subjects

We performed a retrospective study including samples of 78 t-AML/t-MDS patients from 13 Spanish hospitals. The inclusion criteria were patients with PM treated with antineoplastic drugs who developed AML or MDS within 14 years from the start of treatment. The present study included 23 t-AML/t-MDS patients who were the subjects of a previous report concerning the CYP3A4-V polymorphism (Collado *et al*, 2005).

The demographic characteristics, types of PM neoplasm and secondary haematological malignancies are detailed in Table I. Non-Hodgkin lymphoma (NHL) (31%) and breast cancer (BC, 27%) were by far the most frequent PM neoplasms (Table II).

Table I. Type of primary malignancies and secondary leukaemias in relation to the latency time from the start of treatment.

Primary malignancies t-AML/t-MDS	No. patients (%)	Time latency [years; Median (range)]
All patients	78 (100)	3.9 (0.5–13.7)
Primary malignancy		
NHL	24 (30.7)	4.2 (1.4–12.6)
BC	21 (26.9)	3.6 (1–11.6)
HD	5 (6.4)	7.4 (6.2–12.1)
CC	3 (3.9)	6.8 (1.8–6.9)
LC	3 (3.9)	1.16 (1.1–3.6)
AL	3 (3.9)	2.9 (0.6–7.7)
ES	2 (2.6)	5.0 (3.1–6.9)
OC	2 (2.6)	2.2 (1.6–2.8)
MM	3 (3.9)	4.2 (2.2–9.9)
Other malignancies	12 (15.4)	4.3 (0.5–13.7)
t-AML/t-MDS		
AML	53 (67.9)	3.9 (0.5–12.6)
MDS	20 (25.6)	5.7 (1.1–13.7)
Other AL	5 (6.4)	2.5 (1.0–9.9)

AL, acute leukaemia; BC, breast cancer; CC, colon cancer; ES, Ewing sarcoma; HD, Hodgkin disease; LC, lung cancer; MM, multiple myeloma; NHL, non Hodgkin lymphoma; OC, ovarian cancer. Other malignancies: cancer of the larynx, chronic lymphocytic leukaemia, extragonadal seminoma, Fallopian tube carcinoma, gastric cancer, sarcoma and carcinoma of the bowel, cavum carcinoma, germinal carcinoma, carcinoma of the cervix, Waldenström macroglobulinemia.

Table II. Types of t-AML/t-MDS and cytogenetic risk groups of 78 patients.

Characteristics	t-AML/t-MDS <i>n</i> (%)	Controls <i>n</i> (%)
Total	78 (100)	454 (100)
Age at diagnosis (years)		
Median (range)	55.9 (7–87)	38.0 (1–85)
Sex		
M	39 (50.0)	223 (49.1)
F	39 (50.0)	231 (50.8)
t-MDS	20 (25.6)	
MDS	2 (2.6)	
RAEB	2 (2.6)	
RAEB-t	16 (20.5)	
t-AML /FAB subtypes	53 (67.9)	
AML n.c.	3 (3.8)	
M0	6 (7.7)	
M1	6 (7.7)	
M2	6 (7.7)	
M3	12 (15.38)	
M4	4 (5.1)	
M4Eo	2 (2.5)	
M5	5 (6.41)	
M6	7 (8.97)	
M7	2 (2.56)	
t-ALL	3 (3.9)	
B-ALL	3 (3.85)	
Others	2 (2.6)	
Biphenotypic leukaemia	1 (1.28)	
Undifferentiated AL	1 (1.28)	
Cytogenetic risk group		
High	14 (17.9)	
Intermediate	33 (42.3)	
Low	12 (15.4)	
n.a.	19 (24.4)	

AL, acute leukaemia; ALL, acute lymphoblastic leukaemia; AML, acute myeloid leukaemia; F, females; FAB, French–American–British (FAB) classification; MDS, myelodysplastic syndrome; M, males; n.a., not available; n.c., not classified; RAEB, refractory anaemia with excess blasts; RAEB-t, refractory anaemia with excess blasts in transformation; t-ALL, therapy related acute lymphoblastic leukaemia; t-AML, therapy-related acute myeloblastic leukaemia; t-MDS, therapy-related myelodysplastic syndrome.

Diagnosis of t-AML was made in accordance with morphological and cytochemical criteria of the French–American–British (FAB) classification (Bennett *et al*, 1976). The diagnosis of therapy related acute lymphoblastic leukaemia (t-ALL) was based on immunophenotypic criteria. The characteristics of treatment-related haematological malignancies are detailed in Table II. The most common haematological malignancy was t-AML, which represented 69% of cases, and among them, M3 was by far the most common FAB subtype with 15% incidence.

The control group (CG) consisted of volunteers who attended the hospital for blood sampling for biochemistry and/or haematological analysis and were willing to participate in the study. Subjects with haematological or any other malignancy were excluded.

Informed consent was obtained from all patients and controls in accordance with the recommendations of the Declaration of Human Rights, the Conference of Helsinki and institutional regulations.

### Treatment of primary malignancy

In most patients (69/78; 88%), the PM neoplasm was treated with polychemotherapy, which consisted of a median of three and a maximum of seven anti-neoplastic agents. The most frequently used anti-neoplastic agents were alkylating agents (71%, 55/78), anti-metabolites (63%, 49/78), anti-neoplastic antibiotics, mostly anthracyclines, (60%, 47/78) and *Vinca rosacea* alkaloids (40%, 31/78), followed by platinum agents and topoisomerase II inhibitors, which constituted about 28% of the total (22/78). The taxanes and folic acid metabolites constituted a small minority of the total. Twelve patients received chemoradiotherapy (four NHL, four BC, two Ewing's sarcoma, one HD and one lung cancer).

### Samples and DNA extraction

Venous blood samples were collected into a vacuum tube containing potassium EDTA at diagnosis or when they were in complete remission. The DNA was extracted directly from 500 µl whole blood using MagNA Pure LC DNA Isolation Kit, large volume (Roche, Mannheim, Germany) automated in the MagNA Pure LC System (Roche). We also included DNA or cellular samples stored deeply frozen.

### Cytogenetic analysis

Karyotype analysis was performed using unstimulated short-term cultures in accordance with the recommendations of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (Mitelman, 1995). Whenever possible, at least 20 metaphases were evaluated. The cytogenetic risk groups for t-AML were established following modified criteria of Grimwade *et al*, 1998 including in the high risk group t(6;9),7q- and t(9;22) as follows: *high risk*, -5/del(5q), -7/del(7q), abn 3q, complex aberrations ( $\geq 3$  independent aberrations), t(9;22) and t(6;9); *low risk*, t(8;21), t(15;17), inv(16) and t(16;16); *intermediate risk*, all other karyotypic aberrations or a normal karyotype.

### Genotyping of polymorphisms

The following genetic polymorphisms were studied: CYP1A1\*2A(T6235C), CYP2E1\*5B(C-1019T), CYP3A4\*1B(A-290G), del{GSTM1}, del{GSTM1}, NQO1\*2(C609T), MTHFR (C677T) and TYMS 2R/3R.

We used previously reported methods to detect polymorphisms. Most methods used were based on the real-time polymerase chain reaction (PCR) performed in the LightCycler (Roche) using primers and fluorescence-labelled hybridisation

probes. Genotyping was based on different melting temperatures achieved by the hybridisation probes for wild-type and polymorphic alleles. Thus, the detection of *CYP1A1\*2A* was performed according to Harth *et al* (2001), *CYP3A4\*1B* according to von Ahsen *et al* (2001), *CYP2E1\*5B* according to Choi *et al* (2003), and *NQO1\*2* according to Harth *et al* (2000). For the detection of *MTHFR C677T*, we followed the method recommended by Roche Applied Science, using the primers MTHFR\_s (cgaagcaggagctttgaggctg) and MTHFR\_as (aggacgggtcggtgagagtg), probes MTHFR\_LC labelled with Red640 at the 5' end (LC Red640-cgggagccgattcatcat-Ph) and MTHFR\_3FL (tgacctgaagcacttgaaggagaaggtgctc X) labelled with fluorescein.

Detection of polymorphisms *del{GSTT1}* and *del{GSTM1}* was performed according to a conventional PCR method (Naoe *et al*, 2000), consisting of a multiplex PCR that coamplifies the target genes simultaneously with the  $\beta$ -globin gene, which is used as a reference control gene.

Detection of the *TYMS 2R/3R* polymorphism was done according to the conventional PCR method of Villafranca *et al* (2001).

### Statistical procedures

The influence of each polymorphism on the risk of t-MDS/t-AML was studied by univariate and multivariate binary logistic regression, which included estimation of the genotype frequencies of cases (t-MDS/t-AML, dependent variable = 1) and controls (CG, dependent variable = 0), odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) for the parameters included in the model.

A two-sided *P*-value < 0.05 was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Program for Social Sciences (SPSS) software, version 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

### Results

The median time for all patients from the commencement of treatment for PM neoplasm until presentation of t-AML/t-MDS was 3.9 years (range: 0.5–13.7 years), which was very close to intervals of 4.2 years and 3.6 years for NHL and BC, respectively (Table I); HD had a median latency of 7.4 years. t-AML showed median latency of 3.9 years (Table I) and t-MDS presented at a median of 5.7 years, but this difference was not statistically significant.

There were 12 M3 FAB subtypes among the t-AML patients (Table II) (10 females: nine BC and one NHL; and two males: one NHL and one sigmoid colon cancer). We found a significantly higher incidence of M3 among the patients who had BC compared with NHL [9/21 (43%) vs. 2/24 (8%), respectively;  $\chi^2 = 8.44$ ; *P* = 0.030].

No association of the polymorphisms with FAB subtypes, cytogenetic risk groups or genetic abnormalities were detected.

There were no statistical differences between t-AML/t-MDS patients and the CG for any of the polymorphisms studied (Table III). However, we observed a greater incidence for *del{GSTT1}* and heterozygosity for *NQO1\*2* in the t-MDS/t-AML group than in the CG (20.5 vs. 13.7 and 47.3 vs. 35.8, respectively, Table III).

When the two polymorphisms that showed major differences in the incidence between t-AML/t-MDS and CG,

Table III. Polymorphisms and susceptibility to t-MDS/t-AML.

Polymorphism genotype	t-MDS/t-AML n/total (%)	CG n/total (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> -value
<i>CYP1A1*2A</i>				
Heterozygous	15/69 (21.7)	84/403 (20.8)	1.05 (0.6–1.95)	0.88
Homozygous	0/69 (0.0)	2/403 (0.5)	0.00 (0.00)	0.99
<i>CYP2E1*5B</i>				
Heterozygous	4/67 (6.0)	23/390 (5.9)	1.01 (0.34–3.03)	0.98
<i>CYP3A4*1B</i>				
Heterozygous	6/73 (8.2)	29/357 (8.1)	1.01 (0.41–2.53)	0.98
<i>del{GSTM1}</i>				
Homozygous	42/76 (55.3)	232/451 (51.4)	1.16 (0.72–1.90)	0.54
<i>del{GSTT1}</i>				
Homozygous	16/78 (20.5)	61/455 (13.7)	1.63 (0.88–2.99)	0.12
<i>NQO1*2</i>				
Heterozygous	35/74 (47.3)	160/447 (35.8)	1.58 (0.96–2.62)	0.07
Homozygous	2/74 (2.7)	19/447 (4.3)	0.76 (0.17–3.41)	0.72
<i>MTHFR C677T</i>				
Heterozygous	25/65 (38.5)	160/331 (48.3)	0.72 (0.38–1.33)	0.29
Homozygous	17/65 (26.2)	65/331 (19.6)	1.21 (0.59–2.42)	0.60
<i>TYMS</i>				
2R/3R	35/62 (56.5)	162/347 (46.7)	1.47 (0.69–3.13)	0.32
3R/3R	17/62 (27.4)	117/347 (33.7)	0.98 (0.43–2.28)	0.98

n.s., not statistically significant (*P* ≤ 0.05).

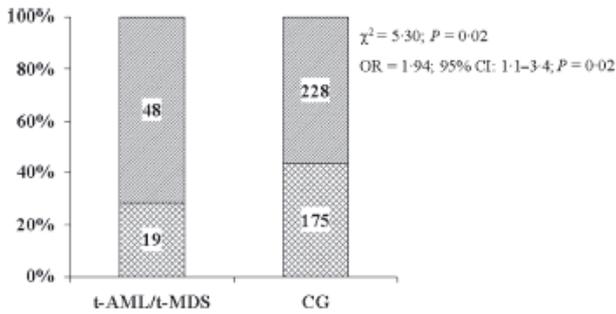


Fig 1. Bar histograms representing the incidence of the combined polymorphisms *CY1A1\*2*, *del[GSTT1]* and *NQO1\*2* in therapy-related acute myeloid leukaemia/myelodysplastic syndrome (t-AML/t-MDS) and the control group (CG). Hatched areas indicate the presence of at least one of the three polymorphisms. Criss-cross area indicates negative for the three polymorphisms. The figures inside the bars indicate the number of subjects.

*del[GSTT1]* and *NQO1\*2*, were combined with the rest of polymorphisms, the haplotype *CY1A1\*2A*, *del[GSTT1]* and *NQO1\*2* better differentiated cases and controls. Thus, the presence of one or more of these polymorphisms was greater in t-AML/t-MDS patients than in CG subjects [48/67 (72%) vs. 228/403 (57%)], Fig 1). And therefore, in contrast, the incidence of patients in whom the three polymorphisms were absent was significantly greater in the CG than in the t-AML/t-MDS group [175/403 (43%) for CG vs. 19/67 (28%) for t-AML/t-MDS].

A comparison between haplotypes negative for all three polymorphisms ( $n = 175$  and  $19$  for CG and t-AML/t-MDS respectively), positive for *NQO1\*2* only ( $n = 101$  and  $23$  for CG and t-AML/t-MDS respectively) and positive for all three polymorphisms ( $n = 1$  and  $2$  for CG and t-AML/t-MDS respectively), showed a wide statistical difference between the t-AML/t-MDS and CG subjects ( $\chi^2 = 12.08$ ,  $P = 0.002$ ). The haplotype that was negative for the three polymorphisms decreased the risk of t-AML/t-MDS 18-fold (OR = 0.054, 95% CI = 0.005–0.63,  $P = 0.02$ ), due to the greater incidence of the haplotype in the CG in comparison to t-AML/t-MDS [175/277 (63%) vs. 19/44 (43%)]. In contrast, positivity for only for *NQO1\*2* and positivity for all the three polymorphisms increased the risk of t-AML/t-MDS (OR = 2.09, 95% CI: 1.08–4.03;  $P = 0.027$  and OR = 18.42, 95% CI = 1.59–212,  $P = 0.02$  respectively) as consequence of the greater incidence shown in t-AML/t-MDS in relation to the CG [23/44 (52%) and 101/277 (36%) respectively].

## Discussion

This study found that the profile of polymorphisms *CY1A1\*2A*, *del[GSTT1]* and *NQO1\*2* strongly modified the risk of t-AML/t-MDS. Thus, the absence of the three polymorphisms decreased the risk of t-AML/t-MDS 18-fold, whereas the presence of only *NQO1\*2* or all three polymorphisms considerably enhanced the risk of t-AML/t-MDS. However, an association was not detected between individual polymor-

phisms and t-AML/t-MDS. Neither was there a statistical association between the polymorphisms and the cytogenetics or other biological characteristics of t-AML/t-MDS.

The lack of association between *CYP3A4-V* and t-AML/t-MDS is in agreement with the report of Blanco *et al* (2002) and with our previous report (Collado *et al*, 2005), but it is in disagreement with the study of Felix *et al* (1998). This is probably because of the higher incidence of the V polymorphism in the *de novo* acute leukaemia patients studied by Felix *et al*, 1998) than in our patients (19% vs. 8% respectively), which was probably caused by the inclusion of non-Caucasians in the earlier study.

With regard to the involvement of *CYP1A1\*2A* with the risk of leukaemia, a recent report (D'Alo *et al*, 2004) indicated that the *CYP1A1\*4* allele had a higher incidence in AML than in controls, but there was no association between *CYP1A1\*2A* and AML, although the incidence of *CYP1A1\*2A* was greater in AML cases than in controls. However, another study (Voso *et al*, 2005) pointed out that the presence of the *CYP1A1\*2A* polymorphism confers an unfavourable prognosis for failure-free survival and overall survival. In the present study, the incidence of the *CYP1A1\*2A* polymorphism in t-AML/t-MDS cases and the CG was similar (about 21%). Our data do not indicate why an increased risk of t-AML/t-MDS was conferred by the combination of *CYP1A1\*2A* and the *del[GSTT1]* and *NQO1\*2* polymorphisms. A possible explanation may be a linkage disequilibrium of *CYP1A1\*2A* with other unknown genetic polymorphisms.

In agreement with two previous reports (Naoe *et al*, 2000; Allan *et al*, 2001), we observed no association between the *GSTT1*-null genotype and the risk of developing t-AML/t-MDS; however, we found a greater incidence of the *GSTT1*-null genotype in t-AML/t-MDS patients than in the CG (20.5% vs. 13.7%, Table III). Conversely, Sasai *et al* (1999), in a study of Japanese patients (18 t-AML and 43 controls) reported a significant association between the *GSTT1*-null genotype and t-AML/t-MDS (OR = 4.62; 95% CI: 1.48–14.4). In a case-control study with 92 adults with MDS and 190 controls, Chen *et al* (1996) showed that the individuals of the *GSTT1*-null genotype had an increased risk of MDS (OR = 4.3; 95% CI: 2.5–7.4).

Several studies carried out on adults of different ethnic groups have found an association between *NQO1\*2* polymorphism and t-AML/t-MDS (Larson *et al*, 1999; Naoe *et al*, 2000). Hence, it was reported that t-AML/t-MDS patients had a significantly higher proportion of individuals homozygous and heterozygous for the *NQO1\*2* allele compared with the control population (52% and 72% in t-AML/t-MDS vs. 22% or 58% in controls respectively). Moreover, homozygosity for *NQO1\*2* conferred a 2.6-fold increase in the risk of t-AML/t-MDS compared with the wild type allele (Naoe *et al*, 2000). Additionally, it was observed that this polymorphism was strongly associated with t-AML/t-MDS abnormalities on chromosomes 5 and/or 7 (Larson *et al*, 1999). However, Blanco *et al* (2002), in a study of 224 children with ALL, did

not find differences in the incidence of *NQO1\*2* between the 53 cases of t-AML/t-MDS (patients treated for ALL who develop t-AML/t-MDS) and the 215 controls (patients treated for ALL who did not develop t-AML/t-MDS). We did not observe a statistical association between the polymorphism and t-AML/t-MDS, but the incidence of *NQO1\*2* was clearly greater in the t-AML/t-MDS cases than in the CG (47.3% vs. 35.8%, respectively, Table III).

The CG of our study was composed of healthy volunteers, however the statistical differences found between cases and controls should be attributed, with all likelihood, to t-AML/t-MDS more than to the PM. Thus, it is very unlikely that they could be related to a heterogeneous spectra of more than 13 PMs (Table I). Moreover, we found a similar incidence of the polymorphisms studied in t-AML/t-MDS and *de novo* AML (data not shown). Furthermore, to our knowledge, no report has confirmed the relevance of genetic polymorphisms in the risk of cancer, except as modifiers of the risk conferred by mutations in genes that predispose to cancer, such as the polymorphisms of *RAD51* in subjects with *BRCA2* mutations (Levy-Lahad *et al*, 2001).

In conclusion, our results indicate that the profile of *CY1A1\*2A*, *del{GSTT1}* and *NQO1\*2* polymorphisms is associated with a genetic predisposition to t-AML/t-MDS. The absence of any of these polymorphisms minimizes the risk of t-AML/t-MDS, and the presence of *NQO1\*2* or any of the three polymorphisms will increase the risk of t-AML/t-MDS. However, the reduced size of the t-AML/t-MDS group makes it difficult to obtain firm statistical conclusions. Therefore, our conclusions should be considered as preliminary until they are confirmed by future studies.

## Acknowledgements

This study was performed with financial support of the Spanish 'Instituto de Salud Carlos III' (grant PI 02/0180).

## References

- von Ahnen, N., Richter, M., Grupp, C., Ringe, B., Oellerich, M. & Armstrong, V.W. (2001) No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V Allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clinical Chemistry*, **47**, 1048–1052.
- Allan, J.M., Wild, Ch.P., Rollinson, S., Willett, E.V., Moorman, A.V., Dovey, G.J., Roddam, P.L., Roman, E., Cartwright, R.A. & Morgan, G.J. (2001) Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy induced leukemia. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 11592–11597.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1976) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative group. *British Journal of Haematology*, **33**, 451–458.
- Birch, J.M. (1999) Genes and cancer. *Archives of Diseases of Children*, **80**, 1–6.
- Blanco, J.G., Edick, M.J., Hancock, M.L., Winick, N.J., Dervieux, T., Amylon, M.D., Bash, R.O., Behm, F.G., Camitta, B.M., Pui, C.H., Raimondi, S.C. & Relling, M.V. (2002) Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics*, **12**, 605–611.
- Chen, H., Sandler, D.P., Taylor, J.A., Shore, D.L., Liu, E., Bloomfield, C.D. & Bell, D.A. (1996) Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (*GSTT1*) gene defect. *Lancet*, **347**, 295–297.
- Choi, J.Y., Abel, J., Neuhaus, T., Ko, Y., Harth, V., Hamajima, N., Tajima, K., Yoo, K.Y., Park, S.K., Noh, D.Y., Han, W., Choe, K.J., Ahn, S.H., Kim, S.U., Hirvonen, A. & Kang, D. (2003) Role of alcohol and genetic polymorphisms of CYP2E1 and ALDH2 in breast cancer development. *Pharmacogenetics*, **13**, 67–72.
- Collado, M., Barragán, E., Calasanz, M.J., Larrayoz, M.J., Colomer, D., Munarriz, B., Verdeguer, A., Gutierrez, A., Batlle, M., Sanz, M.A. & Bolufer, P. (2005) Lack of association of CYP3A4-V polymorphism with the risk of treatment-related leukemia [letter]. *Leukemia Research*, **29**, 595–597.
- D'Alo, F., Voso, M.T., Guidi, F., Massini, G., Scardocci, A., Sica, S., Pagano, L., Hohaus, S. & Leone, G. (2004) Polymorphisms of CYP1A1 and glutathione S-transferase and susceptibility to adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **89**, 664–670.
- Donaldson, S.S. & Hancock, S.L. (1997) Second cancers after Hodgkin's disease in childhood. *New England Journal of Medicine* **334**, 792–793.
- Engbersen, A.M., Franken, D.G., Boers, G.H., Stevens, E.M., Trijbels, F.J. & Blom, H.J. (1995) Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *American Journal of Human Genetics*, **56**, 142–150.
- Felix, C.A., Walker, A.H., Lange, B.J., Williams, T.M., Winicki, N.J., Cheung, N.K.V., Lovett, B.D., Nowell, P.C., Blair, I.A. & Rebbeck, T.R. (1998) Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, **95**, 13176–13181.
- Flannery, J.T., Boice, J.D., Devesa, S.S., Kleinerman, R.A., Curtis, R.E. & Fraumeni, J.F. (1985) Cancer registration in Connecticut and the study of multiple primary cancers, 1935–82. *National Cancer Institute Monograph*, **68**, 13–24.
- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, Ch., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A., Goldstone, A. & On behalf of the Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 Trial. *Blood*, **92**, 2322–2333.
- Harth, V., Donat, S., Ko, Y., Abel, J., Vetter, H. & Bruning, T. (2000) NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 codon 609 polymorphism and its association to colorectal cancer. *Archives of Toxicology*, **73**, 528–531.
- Harth, V., Bruning, T., Abel, J., Koch, B., Berg, I., Sachinidis, A., Bolt, H.M., Vetter, H. & Ko, Y. (2001) Real-time genotyping of cytochrome P4501A1 A4889G and T6235C polymorphisms. *Molecular and cellular probes*, **15**, 93–97.
- Hayashi, S., Watanabe, J., Nakachi, K. & Kawajiri, K. (1991) Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, **110**, 559–565.

- Ingelman-Sundberg, M. (2001) Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutation Research*, **482**, 11–19.
- Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Yoshū, A., Shinada, N. & Watanabe, J. (1990) Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS Letters*, **263**, 131–133.
- Kelly, K.M. & Perentesis, J.P. (2002) Polymorphisms of drug metabolizing enzymes and markers of genotoxicity to identify patients with Hodgkin's lymphoma at risk of treatment-related complications. *Annals of Oncology*, **13**(Suppl. 1), 34–39.
- Kollmannsberger, C., Hartmann, J.T., Kanz, L. & Bokemeyer, C. (1998) Risk of secondary myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome following standard-dose chemotherapy or high-dose chemotherapy with stem cell support in patients with potentially curable malignancies.(Review). *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **124**, 207–214.
- Krajinovic, M. (2005) Further insight into the role of NQO1 in childhood leukemia. *Haematologica*, **90**, 1445.
- Krajinovic, M., Lamothe, S., Labuda, D., Lemieux-Blanchard, M., Théorêt, Y., Moghrabi, A. & Sinnett, D. (2004) Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **103**, 252–257.
- Larson, R.A., Wang, Y., Banerjee, M., Wiemels, J., Hartford, C., Le Beau, M.M. & Smith, M.T. (1999) Prevalence of the inactivating 609C → T polymorphism in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood*, **94**, 803–807.
- Levine, E.G. & Bloomfield, C.D. (1992) Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation and environmental exposure. *Seminars in Oncology*, **19**, 47–84.
- Levy-Lahad, E., Lahad, A., Eisenberg, S., Dagan, E., Paperna, T., Kasinetz, L., Catane, R., Kaufman, B., Beller, U., Renbaum, P. & Gershoni-Baruch, R. (2001). A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, **6**, 3232–3236.
- Marsh, S., Ameyaw, M.M., Githang'a, J., Indalo, A., Ofori-Adjei, D. & McLeod, H.L. (2000) Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Human Mutation*, **16**, 528.
- Mitelman, F. ed. (1995) *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995*. S Karger, Basel, Switzerland.
- Moran, J.L., Siegel, D. & Ross, D. (1999) A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, **96**, 8150–8155.
- Naoto, T., Takeyama, K., Yokozawa, T., Kiyoi, H., Seto, M., Uike, N., Ino, T., Utsunomiya, A., Maruta, A., Jin-nai, I., Kamada, N., Kubota, Y., Nakamura, H., Shimazaki, C., Horiike, S., Kodera, Y., Saito, H., Ueda, R., Wiemels, J. & Ohno, R. (2000) Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*, **6**, 4091–4095.
- Perentesis, J.P. (2001) Genetic predisposition and treatment-related leukemia. *Medical and Pediatric Oncology*, **36**, 541–548.
- Radjendirane, V., Joseph, P., Lee, Y., Kimura, S., Klein-Szantoi, A.J.P., Gonzalez, F.J. & Jaiswal, A.K. (1998) Disruption of the DT diaphorase (NQO1) gene in mice leads to increased menadione toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 7382–7389.
- Rocha, J.C., Cheng, C., Liu, W., Kishi, S., Das, S., Cook, E.H., Sandlund, J.T., Rubnitz, J., Ribeiro, R., Campana, D., Pui, C.H., Evans, W.E. & Relling, M.V. (2005) Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **105**, 4752–4758.
- Sasai, Y., Horiike, S., Misawa, S., Kaneko, H., Kobayashi, M., Fujii, H., Kashima, K. & Taniwaki, M. (1999) Genotype of glutathione S-transferase and other configurations in myelodysplasia. *Leukemia Research*, **23**, 975–981.
- Seidegard, J., Vorachek, W.R., Pero, R.W., Pearson, W.R. (1988) Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are because of a gene deletion. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of the America*, **85**, 7293–7297.
- Skibola, C.F., Smith, M.T., Hubbard, A., Shane, B., Roberts, A.C., Law, G.R., Rollinson, S., Roman, E., Cartwright, R.A. & Morgan, G.J. (2002) Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*, **99**, 3786–3791.
- Traver, R.D., Horikoshi, T., Danenberg, K.D., Stadlbauer, T.H., Danenberg, P.V., Ross, D. & Gibson, N.W. (1992) NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Research*, **52**, 797–802.
- Villafranca, E., Okruzhnov, Y., Dominguez, M.A., Garcia-Foncillas, J., Azinovic, I., Martinez, E., Illarramendi, J.J., Arias, F., Martinez, M.R., Salgado, E., Angeletti, S. & Brugarolas, A. (2001) Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **19**, 1779–1786.
- Voso, M.T., D'Alò, F., Gumiero, D., Guidi, F., Hohaus, S. & Leone, G. (2005) The CYP1A1\*2a allele is an independent prognostic factor for acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **90**, 982–984.
- Wolden, S.L., Lamborn, K.L., Clearly, S.F., Tate, D.J. & Donalson, S. (1998) Second cancers following pediatric Hodgkin's disease. *Journal of Clinical Oncology*, **16**, 536–544.