

Avaliação de polimorfismos dos genes *NFE2L2* e *KEAP1* na Leucemia linfocítica crónica

Joselina Reis Antunes^a, Raquel Alves^{b,c,d}, Joana Jorge^{b,c}, Ana Pires^{b,c}, José Pedro Carda^{b,f},
Gilberto Marques^e, Lénia Jorge^e, Ana Cristina Gonçalves^{b,c,d}, Ana Bela Sarmiento-Ribeiro^{b,c,d,f}

- a. Estudante de medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra (FMUC), Portugal;
- b. Laboratório de Oncobiologia e Hematologia (LOH), Clínica Universitária de Hematologia e Unidade de Biologia Molecular Aplicada, FMUC, Coimbra, Portugal;
- c. Centro de Investigação em Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO), FMUC, Coimbra, Portugal;
- d. Centro de Neurociência e Biologia Celular e Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (CNC.IBILI), Coimbra, Portugal
- e. Departamento de Patologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário e Coimbra, EPE (CHUC, EPE), Coimbra Portugal
- f. Departamento de Hematologia Clínica, CHUC, EPE, Coimbra, Portugal

RESUMO

A Leucemia linfocítica crónica (LLC) é uma neoplasia hematológica que representa a leucemia mais prevalente na população adulta Ocidental. Um dos mecanismos associados ao desenvolvimento desta patologia está relacionado com o stresse oxidativo resultante do desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a sua eliminação pelas defesas antioxidantes. O gene *factor nuclear (derivado dos eritrócitos) - 2 tipo 2 (NFE2L2)* e o seu supressor *Kelch-like ECH – associated protein 1 (KEAP1)*, desempenham um papel central no equilíbrio das ROS. Alterações nestes genes, quer devidas a mutações somáticas quer devidas a *single nucleotide polymorphisms* (SNP), têm sido associadas com diversas patologias, nomeadamente neoplasias hematológicas. Neste sentido, efectuou-se um estudo caso-controlo de base hospitalar, que relacionou a presença de dois SNPs nos genes *NFE2L2* (rs13001694) e *KEAP1* (rs11085735) com a susceptibilidade e prognóstico da LLC. Para este efeito genotiparam-se estes SNPs em 199 doentes com LLC e 261 controlos. Os resultados revelaram uma associação entre a LLC e os genes em estudo, observando-se um risco aumentado de desenvolver LLC nos indivíduos com o genótipo *NFE2L2* GG e perfil genotípico: GG/CC (*NFE2L2/KEAP1*) e um menor risco de desenvolvimento da doença em indivíduos com o perfil genotípico AA/CC (*NFE2L2/KEAP1*). Não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas na sobrevivência dos doentes com LLC quando comparados genótipos e perfis genotípicos para os SNPs seleccionados. Este estudo sugere que polimorfismos genéticos nos genes *NFE2L2* e *KEAP1* influenciam a susceptibilidade dos indivíduos de desenvolver LLC.

PALAVRAS-CHAVE: Leucemia linfocítica crónica; stresse oxidativo; susceptibilidade; SNP; *NFE2L2*; *KEAP1*

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a hematologic malignancy that represents the most prevalent leukemia in Western adult population. One of CLL causative mechanisms is related with oxidative stress caused by an imbalance between reactive oxygen species and its elimination by antioxidant defenses. *Nuclear factor erythroid derived 2 like 2 (NFE2L2)* and its suppressor *Kelch-like ECH – associated protein 1 (KEAP1)* have a nuclear function in stress oxidative stability. Changes in this genes, caused by somatic mutations or single nucleotide polymorphisms (SNPs), have been associated with several diseases, namely hematologic malignancies. For this, a hospital-based case-control study was carried out, that related two SNPs in *NFE2L2* (rs13001694) and *KEAP1* (rs11085735) genes with CLL susceptibility and prognosis. The SNPs were genotyped in 199 patients with CLL and 261 controls. The results showed a relation between CLL and the selected genes. It was observed an increased risk of development of CLL in patients with *NFE2L2* GG genotype and with the genotypic profile GG/CC (*NFE2L2/KEAP1*), and a decreased risk of development of the disease in patients with the genotypic profile AA/CC (*NFE2L2/KEAP1*). The results didn't show significant survival differences of CLL patients, when genotypes and genotypic profiles of selected SNPs were compared. This study suggests that genetic polymorphisms influence individual susceptibility for development of CLL.

KEYWORDS: Chronic lymphocytic leukemia; oxidative stress; susceptibility; single nucleotide polymorphism; *NFE2L2*; *KEAP1*

ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARE – *Antioxidant response elements*

ARMS-PCR – *Amplification-refractory mutation system-polymerase chain reaction*

CHUC – Centro hospitalar e universitário de Coimbra

CIMAGO - Centro de Investigação no Ambiente, Genética e Oncobiologia

CNC – *cap 'n' collar*

CNC.IBILI - Centro de Neurociências e Biologia Celular e Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida

CUL3 – Culina 3

dbSNP – *Single nucleotide polymorphism database*

Del - Delecção

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EPE – Entidade pública empresarial

FMUC – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

FS – *Functional score*

Hb - Hemoglobina

HDFP – Hospital distrital da Figueira da Foz

HR – *Hazard ratio*

HuGE – *Human genome epidemiology*

IC – Intervalo de confiança

KEAP1 – *Kelch-like ECH – associated protein 1*

LLC – Leucemia linfocítica crónica

LMA – Leucemia mieloide aguda

LOH - Laboratório de Oncobiologia e Hematologia

MAF – *Minimum allele frequency*

mARN – Ácido ribonucleico mensageiro

NFE2L2 – *Nuclear factor erythroid derived 2 like 2*

OMS – Organização mundial de saúde

OR – *Odds ratio*

p – Braço curto do cromossoma

q – Braço longo do cromossoma

ROS – *Reactive oxygen species*

SMD – Síndrome mielodisplásica

SNP – *Single nucleotide polymorphisms*

Tris - Trissomia

ZAP-70 - *zeta associated protein 70*

INTRODUÇÃO

A Leucemia linfocítica crónica (LLC) é uma neoplasia hematológica linfoproliferativa. Esta neoplasia representa a forma de leucemia mais prevalente nos adultos dos países Ocidentais, surgindo mais frequentemente no sexo masculino, em caucasianos e na população idosa, estando a idade média do diagnóstico entre os 67 e 72 anos [1,2]. A LLC resulta da resistência à apoptose de linfócitos B monoclonais, funcionalmente incompetentes e morfológicamente maduros, mas imunologicamente imaturos [3,4]. No entanto, a etiologia exacta da doença permanece desconhecida. As suas manifestações clínicas resultam da acumulação destas células na medula óssea, sangue e tecidos linfáticos [5].

O diagnóstico da LLC é geralmente realizado através da contagem diferencial de células sanguíneas, esfregaço de sangue periférico e imunofenotipagem dos linfócitos B circulantes. Para o diagnóstico de LLC é necessária a presença de linfocitose (linfócitos B monoclonais no sangue periférico $\geq 5000/\mu\text{L}$) por um período mínimo de três meses [2]. Estão descritos alguns critérios clínico-analíticos, agrupados no sistema de estadiamento clínico de Rai e Binet [2,6,7], permitindo dividir os doentes em grupos prognósticos. A presença de outros marcadores, como a expressão da *zeta associated protein 70* (ZAP-70) ou de CD38⁺, ou ainda alguns marcadores citogenéticos, nomeadamente alterações cromossómicas (deleções dos braços longos dos cromossomas 13 e 11 (del 13q e del 11q respectivamente), deleção do braço curto do cromossoma 17 (del 17p) e trissomia do braço longo do cromossoma 12 (tris 12q)), podem ajudar a prever o prognóstico [8-11]. Os doentes com doença activa, sintomática ou em estadios de Rai e Binet avançados, requerem quimioterapia, enquanto que os restantes necessitam apenas de vigilância. Na Tabela 1 é possível observar os estadios clínicos de acordo com o estadiamento de Rai e os correspondentes grupos de prognóstico, assim como as indicações para início do tratamento de acordo com o referido sistema de estadiamento [2].

Tabela 1 – Estádios clínicos de acordo com o estadiamento de Rai e os correspondentes grupos de prognóstico e indicações para o início do tratamento de acordo com o referido sistema de estadiamento.

Rai	Binet	Grupos de prognóstico	Indicações para início de tratamento
0 - Linfocitose	A - ≤ 2 regiões ganglionares aumentadas	Baixo risco	Vigilância
I – Linfocitose e linfadenopatia	B - ≥ 3 regiões ganglionares aumentadas	Risco intermédio	Vigilância/ Quimioterapia
II – Linfocitose, esplenomegália e/ hepatomegália	C - Anemia (Hb < 10 mg/dL) ou trombocitopenia (plaquetas < $100 \times 10^9/L$)	Alto risco	Quimioterapia
III – Linfocitose e anemia (Hb < 11 mg/dL)			
IV – Linfocitose e trombocitopenia (plaquetas < $100 \times 10^9/L$)			

Hb - Hemoglobina

O stresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre espécies reativas de oxigénio (ROS) e as defesas antioxidantes. Um aumento das ROS está associado a lesões do ADN, peroxidação lipídica e oxidação proteica, alterando, desta forma, a homeostasia celular. Sabe-se que estas alterações induzidas pelo stresse oxidativo têm um papel central na carcinogénese [12,13]. As células têm diversos mecanismos de defesa antioxidante que previnem a lesão oxidativa das macromoléculas celulares. Em resposta ao stresse oxidativo e eletrofílico, a família de factores de transcrição *cap'n'collar* (CNC) regula vários genes que codificam enzimas antioxidantes e do metabolismo de fase II [14-16].

O factor de transcrição NRF2, codificado pelo gene - factor nuclear (derivado dos eritrócitos) - 2 tipo 2 (*NFE2L2*) - é um dos membros da família CNC. Este factor constitui um

dos principais mecanismos reguladores de genes alvo antioxidantes, com sequências que contenham *antioxidant response elements* (ARE) nos seus promotores. Em condições basais, o NRF2 mantém-se no citoplasma ligado ao seu supressor *Kelch-like ECH – associated protein 1* (KEAP1). Nestas condições, o NRF2 é transportado pelo KEAP1 até à Culina 3 (CUL3), uma E3 ligase, para sofrer poliubiquitinação e posterior degradação proteossômica [17]. Estímulos oxidativos ou eletrofílicos induzem alterações nas cisteínas da KEAP1, modificando a afinidade entre este factor supressor, a NRF2 e a CUL3. Desta forma, o efeito inibitório do KEAP1 sobre o NRF2 é eliminando, e este último migra para o núcleo, promovendo a activação dos genes que contêm o domínio ARE [18-24].

Foram atribuídos papéis diametralmente opostos ao factor de transcrição NRF2. Por um lado, a presença deste factor de transcrição em tecidos normais é fundamental na protecção da célula contra a lesão oxidativa das suas macromoléculas. Neste sentido, o NRF2, é essencial na homeostasia e prevenção da carcinogénese [25-27]. Por outro lado, vários estudos identificaram sobreexpressão deste factor de transcrição em células tumorais de diferentes neoplasias, atribuir-lhes uma vantagem de sobrevivência e proliferação [28]. Vários estudos identificaram polimorfismos, mutações somáticas ou hiperexpressão do gene do NRF2 em células neoplásicas, isoladamente ou em associação com alterações genéticas com perda de função do KEAP1. Estas alterações estão correlacionadas com a proliferação celular e resistência ao tratamento antineoplásico [28-33].

Alterações no gene *NFE2L2* ou na sua regulação, conferem uma maior susceptibilidade a várias doenças, nomeadamente aquelas devidas a mutações genéticas ou somáticas, ou ainda as menos estudadas, associadas a *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Entre estas doenças encontram-se as neoplasias do pulmão, laringe, cavidade oral, cabeça e pescoço, pele ou fígado [34]. Os genes *NFE2L2* e *KEAP1* são polimórficos, apresentando diversos SNPs, alguns deles associados a alterações funcionais das proteínas que estes codificam. Vários estudos relacionam

os SNPs do *NFE2L2* e do *KEAP1* com um aumento da susceptibilidade ou diminuição da sobrevivência a algumas doenças do foro respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, neurodegenerativo e oncológico (nomeadamente leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásico, carcinoma da mama, adenocarcinoma pulmonar, cancro da bexiga, adenocarcinoma endometriode e adenocarcinoma do pulmão em mulheres não fumadoras) [19,20,34-37].

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da LLC são múltiplos e muitos deles ainda desconhecidos. No entanto, um dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento desta neoplasia está relacionado com o stresse oxidativo. Foi sugerido que as células de LLC apresentam níveis mais elevados de ROS quando comparadas com as células de indivíduos saudáveis, o que poderá ser explicado pela ativação constitutiva do NRF2 nestas células, observada em alguns estudos [38,39].

Pelo que foi anteriormente dito, o NRF2 parece desempenhar um papel central no equilíbrio das ROS na LLC. Alterações quantitativas ou qualitativas neste fator de transcrição estão já associadas a algumas neoplasias. Neste sentido, o presente estudo propõem-se a avaliar a influência de dois polimorfismos na via do factor de transcrição NRF2 na susceptibilidade e prognóstico da LLC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Declaração de ética

O presente estudo foi conduzido de acordo com a declaração de Helsínquia. Todos os doentes e controlos assinaram um consentimento informado e a comissão de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Coimbra, Portugal) aprovou o protocolo de estudo.

Grupo de estudo

Desenvolveu-se um estudo caso-controlo de base hospitalar, que incluiu um total de 199 doentes, diagnosticados com LLC de acordo com os critérios adoptados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008 [40], e um grupo controlo constituído por 261 indivíduos. Todos os casos e controlos foram seguidos em dois hospitais da região centro de Portugal – “Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE” (CHUC, EPE) e “Hospital Distrital da Figueira da Foz, EPE” (HDFE, EPE) – desde Junho de 2010 até Dezembro de 2015. Os controlos foram seleccionados a partir de dadores de sangue saudáveis e de indivíduos sem evidência de neoplasia, seguidos nos mesmos hospitais, durante o mesmo período de tempo.

O grupo de doentes com LLC ($n=199$) é constituído por 115 homens (57.8%) e 84 mulheres (42.2%). No entanto apenas foi possível reunir os dados clínico-laboratoriais de um subgrupo composto por 70 doentes. As características demográficas deste subgrupo e do grupo controlo encontram-se resumidas na Tabela 2, assim como os grupos de prognóstico obtido através do sistema de estadiamento de Rai e alguns marcadores prognósticos para o subgrupo de doentes.

Tabela 2. Características demográficas básicas dos doentes e controlos, grupos de prognóstico obtidos através do sistema de estadiamento de Rai e outros marcadores de prognóstico do subgrupo de doentes com LLC.

Dados demográficos	Casos (<i>n</i> =70)		Controlos (<i>n</i> =261)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Género				
Masculino	47	67.1	135	51.7
Feminino	23	32.9	126	48.3
Idade				
Mediana	74		68	
Intervalo	48-94		19-85	
Grupos de prognóstico (Estadiamento de Rai)				
Baixo risco	49	70		
Risco intermédio	18	25.7		
Alto risco	3	4.3		
ZAP-70 positivo	7	10.0		
CD38 ⁺ positivo	8	11.4		
Citogenética (≥1 marcador positivo)				
Del 13q (positivo)	31	44.3		
Del 17p (positivo)	9	12.9		
Del 11q (positivo)	8	11.4		
Tris 12q (positivo)	9	12.9		

Del – deleção; p – braço curto do cromossoma; q – braço longo do cromossoma; Tris – trissomia; ZAP-70 - *zeta associated protein 70*

Genes e SNPs

Para concretizar o presente estudo foram selecionados dois genes (*NFE2L2* e *KEAP1*) devido ao papel central que estes assumem na homeostasia do stresse oxidativo e sua relação já estabelecida com algumas neoplasias hematológicas. Nestes genes, foram posteriormente

escolhidos dois SNPs, um para o gene *NFE2L2* (rs13001694) e outro para o gene *KEAP1* (rs11085735). A selecção dos SNPs baseou-se nos seguintes critérios: 1. frequência do alelo menos comum (MAF) $\geq 5\%$ em caucasianos (descrita em literatura publicada); 2. SNPs validados; 3. SNPs com repercussões funcionais já publicadas anteriormente; 4. associação já descrita com maior suscetibilidade a neoplasias, nomeadamente hematológicas. Os detalhes dos polimorfismos genéticos analisados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Detalhes dos dois SNPs seleccionados.

Gene (Símbolo)		<i>NFE2L2</i>	<i>KEAP1</i>
Via de sinalização		KEAP1-NRF2	KEAP1-NRF2
dbSNP		rs13001694	rs11085735
Posição cromossómica		2:177254262	19:10491504
Variantes		c.-4+9141T>C	c.1325+73T>G
Posição no mARN		Intrão	Intrão
Efeito funcional do SNP	SF	0.101	-
	Categoria	Regulação da transcrição	-
	Patogenicidade	Alterada	-
MAF Global		0.430 (G)	0.051 (A)
Associações publicadas	Tipo de neoplasia	SMD	-
	OR	1.63	-
	95% IC	1.17-2.26	-
	Referências	[37]	-

dbSNP, *single nucleotide polymorphism database*; IC, Intervalo de confiança; FS, *functional score*; *KEAP1*, *Kelch-like ECH-associated protein 1*; MAF, frequência do alelo menos comum; mARN, ácido ribonucleico mensageiro; *NFE2L2/Nrf2*, *Nuclear factor, erythroid 2-like 2*; OR, *odds ratio*; SMD, síndrome mielodisplásica; SNP, *single nucleotide polymorphism*

Genotipagem

O ADN genómico foi isolado de leucócitos de sangue venoso periférico de doentes com LLC e de controlos saudáveis, colhido em tubos de EDTA, através do protocolo descrito por Bartlett e White [41]. Algumas das amostras dos doentes com LLC foram preservadas e armazenadas em metanol e ácido acético, a -80°C , até à extracção do ADN. Posteriormente foi realizada a quantificação do ADN através do espectrofotómetro *NanoDrop ND-100* (*NanoDrop Technologies, Wilmington, DE*).

A genotipagem dos SNPs foi realizada por tetra-*primers*-ARMS-PCR, utilizando *primers* previamente descritos [37]. De forma a confirmar a eficácia da técnica de PCR utilizada, foram utilizados simultaneamente três controlos positivos e um negativo em cada ensaio. Como controlos positivos foram utilizadas três amostras anteriormente sequenciadas, contendo os três genótipos possíveis. Como controlo negativo foi utilizada água. Para finalizar a genotipagem foi realizada eletroforese em gel de agarose a 4%, com o corante *Green Safe* (Figura 1).

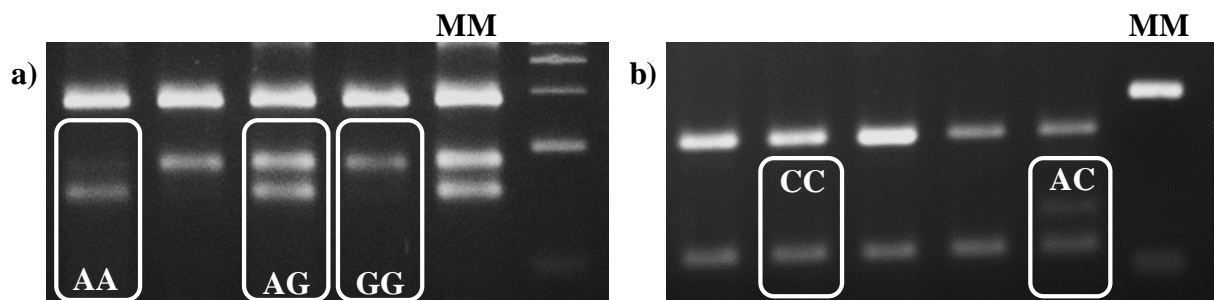


Figura 1. Exemplos representativos da análise dos polimorfismos por tetra-*primers*-ARMS-PCR. A análise dos polimorfismos dos genes *NFE2L2* (Figura 1a) e *KEAP1* (Figura 1b) foi efectuada pelo recurso a tetra-*primers*-ARMS-PCR. As sequências destes genes foram amplificadas por PCR e sujeitas a electroforese em gel de agarose a 4%, corado com *GreenSafe*. Na Figura 1a é possível observar os diversos genótipos obtidos para o gene *NFE2L2*. Foi utilizado um fragmento controlo com 294 pb, e o genótipo GG corresponde ao fragmento de

ADN com 191 pb, o genótipo AG os fragmentos de 157 pb e 191 pb e o genótipo AA os fragmentos com 157 pb. Na Figura 1b observam-se os genótipos obtidos através do gene *KEAP1*. Foi utilizado um fragmento controlo com 169 pb, o genótipo CC corresponde ao fragmento de ADN com 103 pb e o genótipo AC aos fragmentos de 119 pb e 103 pb.

MM – Marcador de peso molecular; pb – pares de bases

Análise estatística

A normalidade das variáveis género e idade entre controlos e doentes com LLC foi determinada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. De acordo com os resultados obtidos, utilizaram-se testes paramétricos nas variáveis com distribuição normal e testes não paramétricos nas outras variáveis. A comparação do género entre doentes e controlos foi realizado através do teste exacto de *Fisher*, na plataforma *online* <http://statpages.info/ctab2x2.html> e a comparação da idade foi efectuada pelo teste *Mann-Whitney U*, utilizando o *IBM SPSS Statistics 22*.

As frequências alélicas, genótípicas e dos perfis genotípicos foram calculadas por contagem directa. A análise da associação entre os alelos, genótipos e os perfis genotípicos e o desenvolvimento de LLC foi efectuada através do teste exacto de *Fisher*, na plataforma *online* <http://statpages.info/ctab2x2.html>. Esta ferramenta informática permite o cálculo do *odds ratio* (OR) e do seu intervalo de confiança a 95% (IC). A sobrevivência dos doentes, estratificados de acordo com o seu genótipo, foi analisada pelo método de *Kaplan-Meier*. O *hazard ratio* (HR), com um IC de 95%, foi calculado através do modelo *Cox proportional hazard*, utilizando o *GraphPad Prism* versão 6.0.

Foi considerado como valor estatisticamente significativo um valor de $p < 0.05$ em todas as análises estatísticas.

RESULTADOS

O presente estudo envolveu um grupo de doentes com LLC ($n = 199$) e um grupo de controlos saudáveis ($n = 261$). O grupo de doentes com LLC era constituído por 115 homens (57.8%) e 84 mulheres (42.2%). Destes, foi selecionado um subgrupo de doentes dos quais estavam disponíveis dados clínico-laboratoriais ($n = 70$), constituído por 47 homens (67.1%) e 23 mulheres (32.9%), com idade mediana de 74 anos (intervalo de 48-94 anos). O grupo de controlos era constituído por 135 homens (51.7%) e 126 mulheres (48.3%), com idade mediana de 68 anos (intervalo de 19-85 anos). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na variável género entre grupo controlo e grupo total de doentes com LLC ($p=0.220$). Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na variável idade, entre grupos controlo e doentes com LLC ($p<0.001$). De forma a eliminar estas diferenças deverão ser analisados mais controlos.

Na actualidade, numa tentativa de prever o prognóstico da LLC, a cada doente é inserido num grupo prognóstico de acordo com o estadiamento de Rai ou Binet e investigado quanto à presença dos marcadores ZAP-70, CD38⁺ e marcadores citogenéticos. No entanto, apenas foi possível obter dados prognósticos do subgrupo de doentes com LLC anteriormente descrito ($n = 70$). De acordo com o estadiamento de Rai, 49 destes doentes (70.0%) pertenciam ao grupo de baixo risco, 18 doentes (25.7%) ao grupo de risco intermédio e 3 doentes (4.3%) ao de alto risco. Apenas 7 doentes (10.0%) apresentavam ZAP-70 positivo e 8 doentes (11.4%) apresentavam CD38⁺ positivo. Quanto aos marcadores citogenéticos, 49 doentes (70%) apresentavam pelo menos uma das alterações cromossómicas avaliadas, sendo que destes, 31 doentes (44.3%) apresentavam deleção do 13q, 9 doentes (12.9%) apresentavam deleção do 17p, 8 doentes (11.4%) apresentavam deleção do 11q e 9 doentes (12.9%) apresentavam trissomia do 12q.

Inicialmente testou-se se as frequências genotípicas dos polimorfismos no gene *NFE2L2* e no gene *KEAP1* estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, verificando que as frequências genotípicas observadas não apresentavam desvio a este equilíbrio.

De modo a determinar a influência dos polimorfismos dos genes reguladores do stresse oxidativo seleccionados com o risco de desenvolvimento de LLC, foram comparadas as frequências alélicas, genotípicas e perfis genotípicos dos SNPs entre os grupos controlo e doentes com LLC. As frequências alélicas dos SNPs seleccionados nos grupos controlo e estudo, e o seu risco associado ao desenvolvimento de LLC encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição alélica dos SNPs seleccionados nos grupos controlo e doente, e o risco associado ao desenvolvimento da LLC.

Gene: dbSNP	Alelos	LLC			Controlos
		Frequência alélica	OR (95% IC)	valor <i>p</i>	Frequência alélica
<i>NFE2L2</i> : rs13001694					
	G	0.492	1.488 (1.134-1.954)	0.003	0.395
	A	0.507	0.672 (0.512-0.882)	0.003	0.605
<i>KEAP1</i> : rs11085735					
	C	0.937	0.974 (0.550-1.730)	1.000	0.939
	A	0.063	1.026 (0.578-1.818)	1.000	0.961

dbSNP, *single nucleotide polymorphism database*; IC, Intervalo de confiança; *KEAP1*, *Kelch-like ECH-associated protein 1*; LLC, leucemia linfocítica crónica; *NFE2L2*, *Nuclear factor, erythroid 2-like 2*; OR, *odds ratio*; SNP, *single nucleotide polymorphism*.

A frequência do alelo menos comum (MAF) dos controlos é equivalente àquela verificada na população Espanhola da Península Ibérica para ambos os polimorfismos. No presente estudo observou-se uma maior frequência do alelo G do *NFE2L2* nos doentes com LLC (OR 1.488, IC a 95% 1.134-1.954, $p=0.003$). De forma inversa, o alelo A, do mesmo gene,

surge com menos frequência nos doentes com LLC (OR 0.672, IC a 95% 0.512-0.882, $p=0.003$). A frequência dos alelos do gene *KEAP1* para o grupo de doentes com LLC é similar à encontrada no grupo controle.

A frequência genotípica dos SNPs dos grupos controle e estudo, e seu correspondente risco associado ao desenvolvimento de LLC, encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição genotípica dos SNPs seleccionados nos doentes com LLC e nos controles e a sua associação com risco de desenvolvimento de LLC.

Gene: dbSNP	LLC				Controlos	
	<i>n</i>	%	OR (95% IC)	valor <i>p</i>	<i>n</i>	%
<i>NFE2L2</i> : rs13001694						
AA	53	26.7	0.667 (0.436-1.019)	0.054	92	35.2
AG	96	48.2	0.911 (0.619-1.340)	0.639	132	50.6
GG	50	25.1	2.032 (1.234-3.351)	0.004	37	14.2
<i>KEAP1</i> : rs11085735						
AA	1	0.5	0.654 (0.023-9.241)	1.000	2	0.8
AC	23	11.6	1.087 (0.582-2.028)	0.881	28	10.7
CC	175	87.9	0.947 (0.516-1.743)	0.884	231	88.5

dbSNP, *single nucleotide polymorphism database*; IC, Intervalo de confiança; *KEAP1*, *Kelch-like ECH-associated protein 1*; LLC, leucemia linfocítica crônica; *NFE2L2*, *Nuclear factor, erythroid 2-like 2*; OR, *odds ratio*; SNP, *single nucleotide polymorphism*.

Observou-se uma maior frequência do genótipo GG no gene *NFE2L2* nos doentes com LLC quando comparados com os controlos saudáveis (OR 2.032, IC a 95% 1.234-3.351, $p=0.004$). Não foram observadas mais diferenças estatisticamente significativas nas frequências dos restantes genótipos entre os grupos em estudo, para os SNP dos genes *NFE2L2* e *KEAP1*.

Foram também analisadas as potenciais associações entre as frequências alélicas e genóticas dos SNPs seleccionados com os três grupos prognósticos obtidos através do estadiamento de Rai dos doentes com LLC (risco baixo *versus* risco intermédio e alto; risco alto *versus* risco baixo e intermédio e risco baixo *versus* risco alto), assim como com a positividade para os marcadores citogenéticos de prognóstico. No entanto não foram encontradas associações estatisticamente significativas nesta análise (resultados omitidos).

Dada a importância assumida pelas interações entre os dois genes estudados na regulação do stresse oxidativo, foram analisados os perfis genóticos e sua associação com o desenvolvimento da LLC no grupo de estudo, encontrando-se os resultados desta análise na Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição dos perfis genéticos dos SNPs seleccionados nos doentes com LLC e controlos, e a sua associação com risco de desenvolvimento de LLC.

Perfil genético	LLC				Controlos	
	<i>n</i>	%	OR (95% IC)	valor <i>p</i>	<i>n</i>	%
<i>NFE2L2/KEAP1</i>						
AA/AA	0	0.0	-	-	2	0.8
AA/AC	7	3.6	1.549 (0.459-5.293)	0.572	6	2.3
AA/CC	46	23.1	0.634 (0.407-0.984)	0.037	84	32.2
AG/AA	1	0.5	-	-	0	0.0
AG/AC	10	5.0	0.868 (0.353-2.104)	0.837	15	5.7
AG/CC	85	42.7	0.918 (0.622-1.355)	0.705	117	44.8
GG/AC	6	3.0	1.128 (0.330-3.805)	1.000	7	2.7
GG/CC	44	22.1	2.186 (1.279-3.744)	0.003	30	11.5

dbSNP, *single nucleotide polymorphism database*; IC, Intervalo de confiança; *KEAP1*, *Kelch-like ECH-associated protein 1*; LLC, leucemia linfocítica crónica; *NFE2L2*, *Nuclear factor, erythroid 2-like 2*; OR, *odds ratio*; SNP, *single nucleotide polymorphism*

A análise dos perfis genotípicos permitiu verificar que o perfil genotípico GG/AA (*NFE2L2/KEAP1*) estava ausente nos doentes com LLC e nos controlos saudáveis. Além disso, observou-se que o perfil AA/AA (*NFE2L2/KEAP1*) apenas estava presente nos controlos e o perfil AG/AA (*NFE2L2/KEAP1*) apenas estava presente nos doentes. Esta análise permitiu também determinar dois perfis genotípicos de susceptibilidade. O perfil AA/CC (*NFE2L2/KEAP1*) surge com uma menor frequência nos doentes com LLC quando comparados com os controlos saudáveis (OR 0.634, IC 95% 0.407-0.984, $p=0.037$). Um segundo perfil, GG/CC (*NFE2L2/KEAP1*), mostrou uma maior frequência nos doentes com LLC (OR 2.186, IC 95% 1.279-3.744, $p=0.03$). Os restantes perfis genotípicos não apresentam variação da frequência de forma estatisticamente significativa entre os grupos em estudo.

Por último, foi avaliado o impacto dos SNPs seleccionados na sobrevivência global do subgrupo de doentes cujos dados relativos ao *follow-up* estavam disponíveis. O subgrupo era constituído por 67 indivíduos, e o tempo médio de *follow-up* foi de 5.114 anos (intervalo 0.178-18.485 anos). Não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas na sobrevivência deste subgrupo, quando comparados genótipos ou perfis genotípicos para os SNPs seleccionados. No entanto, como se pode observar pela Figura 2, existe uma diferença, apesar desta não ter significância estatística, na sobrevivência dos doentes deste subgrupo quando são comparados os genótipos dos SNPs dos genes *NFE2L2* e *KEAP1* (Figura 2a e 2b respectivamente) e perfis genotípicos (Figura 2c). Como se pode observar na Figura 2a os doentes com genótipos *NFE2L2* GG apresentam menor sobrevivência global que os doentes homocigotos ou heterocigotos para o alelo A. Não foi observada uma diferença significativa entre as sobrevivências dos doentes homocigotos e heterocigotos para o alelo A do gene *NFE2L2* (resultados omitidos). Como se pode observar na Figura 2b os doentes com genótipo *KEAP1* CC apresentam uma menor sobrevivência global que os doentes heterocigotos. Não foi

possível fazer a avaliação comparativa da sobrevivência dos doentes com genótipo *KEAP1* AA, uma vez que este não foi observado na população em estudo.

A combinação dos dois genótipos, anteriormente descritos, que parecem conferir menor sobrevivência (perfil genotípico GG/CC - *NFE2L2/KEAP1*), está também ela associada a uma menor sobrevivência dos doentes, quando comparados com os restantes perfis genotípicos, como é possível observar-se na Figura 2c. Mais nenhum perfil genotípico parece estar associado a uma menor sobrevivência do subgrupo dos doentes com LLC.

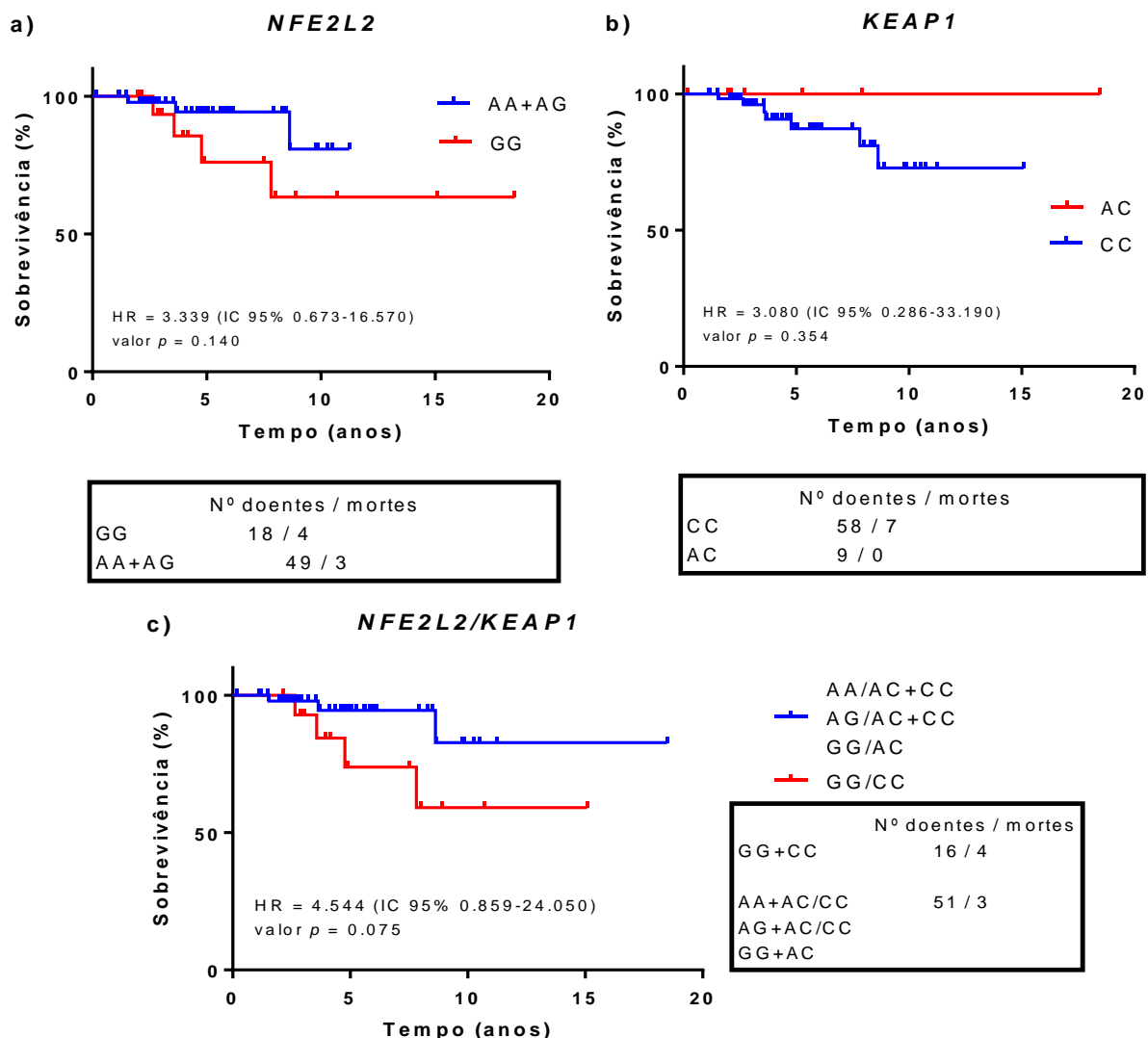


Figura 2. Gráficos de sobrevivência dos doentes com LLC de acordo com os genótipos dos genes *NFE2L2* (a) e *KEAP1* (b); e perfis genotípicos *NFE2L2*+*KEAP1* (c).

HR, hazard ratio; IC, intervalo de confiança; *KEAP1*, Kelch-like ECH-associated protein 1; *NFE2L2*, Nuclear factor, erythroid 2-like 2.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A LLC apresenta uma elevada prevalência na população adulta, tratando-se de uma doença de evolução indolente e incurável. Continua, na actualidade, como uma doença de etiologia obscura. Com base em dados epidemiológicos da doença, nomeadamente o seu risco três vezes superior em familiares de 1º grau [42-44], a maior incidência em homens e a sua distribuição geográfica (maior incidência na Europa e América do Norte) [45], foram implicados factores de risco genéticos no seu desenvolvimento. Importa agora identificar estes factores, de forma a esclarecer os mecanismos genéticos que estão na base da leucemogénese, para evidenciar genes de susceptibilidade à doença, potenciais alvos terapêuticos assim como preditores de resposta à terapêutica.

Conhece-se o papel central desempenhado pelo stresse oxidativo na carcinogénese de diversas neoplasias, nomeadamente nas hematológicas [37,46]. O stresse oxidativo surge por um desequilíbrio entre a produção de ROS e disponibilidade de agentes antioxidantes capazes de as neutralizar. A identificação das causas deste desequilíbrio pode ajudar a explicar a origem de diversas neoplasias.

O factor de transcrição NRF2 e o seu supressor KEAP1, são importantes peças na defesa antioxidante [26,27]. Alterações nos genes que codificam estes factores (*NFE2L2* e *KEAP1*, respectivamente), que condicionem uma diminuição da função do factor NRF2 ou aumento da função supressora do KEAP1, tornam a célula susceptível às alterações das macromoléculas induzidas pelas ROS, que se sabem ser carcinogénicas [13,28].

Foram descritos diversos SNPs para os genes *NFE2L2* e *KEAP1*, alguns deles com repercussões na função das proteínas que estes codificam. Vários estudos têm-se dedicado a investigar as consequências fisiopatológicas destes SNPs funcionais. Alguns destes já foram associados a diversas patologias multiorgânicas, mas poucos foram implicados na alteração da susceptibilidade ou prognóstico de neoplasias [34]. Até à actualidade, alguns polimorfismos no

gene *NFE2L2* foram associados a alterações na susceptibilidade a algumas neoplasias não hematológicas, nomeadamente adenocarcinoma do pulmão (rs6721961), carcinoma da mama (rs6721961 e rs2706110) e colangiocarcinoma (rs6726395) [48-50]. Menos impacto foi dado aos polimorfismos no gene *KEAP1*, não surgindo em bibliografia publicada associado a nenhuma neoplasia não hematológica.

Este estudo caso-controlo de base hospitalar propôs-se a determinar a relevância dos SNPs rs13001694 (gene *NFE2L2*) e rs11085735 (gene *KEAP1*) na suscetibilidade e prognóstico da LLC. Estes polimorfismos são validados, e têm repercussões funcionais e capazes de alterar a suscetibilidade ou prognóstico de neoplasias hematológicas. O polimorfismo rs13001694 (*NFE2L2*) foi associado a um maior risco de desenvolvimento da síndrome mielodisplásica (SMD) e o rs11085735 (*KEAP*) foi implicado num pior prognóstico na leucemia mieloide aguda (LMA) [37].

De forma isolada, o polimorfismo do gene *NFE2L2* parece influenciar o desenvolvimento da LLC. A presença do alelo G do *NFE2L2* constitui um factor de risco para o desenvolvimento de LLC, quando comparado com portadores do alelo A para o mesmo gene. A presença do alelo de risco G em homozigotia (*NFE2L2* GG) aumenta aproximadamente duas vezes o risco de desenvolvimento de LLC nos indivíduos com este genótipo, comparativamente com aqueles que possuem o alelo A em heterozigotia ou homozigotia.

Isoladamente, o impacto que os SNPs têm na susceptibilidade à LLC poderá ser pequeno. No entanto, a prevenção do stresse oxidativo depende da integridade da via de sinalização celular do NRF2-KEAP1. Assim, a acção combinada dos polimorfismos nos genes *NFE2L2* e *KEAP1* poderá ter um maior impacto na susceptibilidade à doença [48]. Os perfis genotípicos dos polimorfismos *NFE2L2/KEAP1* permitiram a análise do efeito conjunto destas variações.

Dois perfis genotípicos parecem influenciar a suscetibilidade à LLC: GG/CC e AA/CC (*NFE2L2/KEAP1*). O perfil genotípico GG/CC (*NFE2L2/KEAP1*) aumenta mais de duas vezes o risco de desenvolvimento da LLC. Importa considerar que isoladamente o genótipo *NFE2L2* GG já constituía um factor de risco para o desenvolvimento da doença, e este risco mantém-se quando surge combinado com o genótipo *KEAP1* CC. O mesmo não se verifica no outro perfil observado (GG/AC - *NFE2L2/KEAP1*), no qual o risco associado ao polimorfismo *NFE2L2* GG desaparece quando este surge combinado com o *KEAP1* AC. A presença do alelo protector A do gene *NFE2L2* em homozigotia (genótipo AA) não altera, com significado estatisticamente relevante, a susceptibilidade para LLC. Mas o seu papel parece ser potenciado quando conjugado com o genótipo *KEAP1* CC, uma vez que o perfil AA/CC (*NFE2L2/KEAP1*) constitui um factor protetor para a LLC. O mesmo não se verifica quando o genótipo *NFE2L2* AA surge conjugado com o genótipo *KEAP1* AC (perfil AA/AC - *NFE2L2/KEAP1*). Foram descritos resultados idênticos relativamente à influência dos mesmos SNPs na síndrome mielodisplásica (SMD) [37]. No entanto, mais estudos serão necessários para determinar o impacto destes polimorfismos noutras neoplasias hematológicas.

Importa considerar que a prevalência do alelo *KEAP1* C na população em geral é muito maior comparativamente com o alelo *KEAP1* A. Este facto condiciona uma redução marcada da população em estudo com este alelo, o que dificulta a obtenção de resultados conclusivos. Esta situação reflectiu-se no presente estudo, uma vez que não foi possível realizar a análise da influência do genótipo *KEAP1* AA nos genótipos do *NFE2L2*, pela sua ausência em perfis homólogos dos grupos controlo e doente.

Os resultados do presente estudo vêm reforçar a importância da via de sinalização celular do NRF2-KEAP1, e da relevância que as alterações nas interações entre estes dois factores têm na suscetibilidade e prognóstico da doença. Observou-se que a ação combinada dos polimorfismos nos genes *NFE2L2* e *KEAP1*, quando comparada com o seu efeito isolado,

teve um maior impacto na susceptibilidade à LLC. Importa compreender a consequência que cada polimorfismo tem na via de sinalização NRF2-KEAP1, e de que forma os perfis genéticos resultantes destes polimorfismos podem amplificar ou atenuar o risco a doenças. Isto permitiria compreender a etiopatogenia dessas doenças, e conseqüentemente a descoberta de possíveis biomarcadores de prognóstico e alvos terapêuticos.

Apesar de não terem sido obtidas diferenças estatisticamente significativas na sobrevivência dos doentes com LLC, de acordo com os genótipos e perfis genotípicos dos SNPs estudados, mais estudos serão necessários para clarificar estes dados. Importa considerar que a subpopulação de doentes com informação clínica disponível era de dimensões reduzidas, tendo ficado excluídos desta avaliação alguns genótipos e perfis genotípicos (nomeadamente *KEAP1* AA e perfis genotípicos que o englobariam). Isto poderá ter impossibilitado a obtenção de resultados conclusivos. O alelo A do *KEAP1* já foi associado a uma menor sobrevivência em doentes com LMA [37]. Mais estudos serão necessários para avaliar a possível influência deste polimorfismo no desenvolvimento e prognóstico da LLC.

Em conclusão, o presente estudo permite inferir que o genótipo *NFE2L2* GG e o perfil genotípico GG/CC (*NFE2L2/KEAP1*) constituem factores de risco para o desenvolvimento de LLC, e que o perfil genotípico AA/CC (*NFE2L2/KEAP1*) constitui um factor protector para o desenvolvimento desta doença. Futuramente estes polimorfismos podem vir a desempenhar um importante papel na clínica, podendo a sua detecção ser um importante indicador de susceptibilidade à doença, assim como indicador de prognóstico.

Posteriormente serão obtidos os dados clínicos dos restantes 129 doentes para que sejam reavaliadas as associações entre estadiamento da doença, de acordo com o estadiamento de Rai ou Binet, positividade dos marcadores ZAP-70, CD38+, marcadores citogenéticos e o prognóstico da LLC.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de aproveitar esta oportunidade para deixar uma palavra de agradecimento a todos aqueles que me apoiaram na realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmã por todo o apoio e compreensão incondicionais.

À minha orientadora, a Professora Doutora Ana Bela Sarmento-Ribeiro, deixo uma palavra de apreço por toda a sua orientação.

À Doutora Ana Cristina Gonçalves, minha co-orientadora, pelo apoio que me deu em todas as etapas da realização deste trabalho, desde os procedimentos laboratoriais, análise estatística, até ao aconselhamento, e sem a qual, este trabalho não teria sido, certamente, possível.

Deixo também uma palavra de agradecimento à Dra. Joana Jorge, Dra. Ana Pires e Dra. Raquel Alves, pela disponibilidade e ajuda determinantes para a execução de todo o trabalho laboratorial.

Ao Dr. José Pedro Carda, Dr. Gilberto Marques e Dra. Lénia Jorge pelo apoio fornecido durante a recolha das amostras e dados clinico-laboratoriais da população estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, et al. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2004; 13:279.
- [2] Hallek M. CME Information: Chronic lymphocytic leukemia: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American Journal of Hematology*. 2015; 446-460.
- [3] Halle M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines, *Blood*. 2008; 111 (12): 5446-56.
- [4] Baldini L, Cro L, Cortelezzi A, et al. Immunophenotypes in "classical" B-cell chronic lymphocytic leukemia. Correlation with normal cellular counterpart and clinical findings. *Cancer*. 1990; 66: 1738.
- [5] Shanafelt TD, Kay NE, Jenkins G, et al. B-cell count and survival: differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-cell lymphocytosis based on clinical outcome. *Blood*. 2009; 113 (18): 4188-96.
- [6] Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48:198.
- [7] Rai KR. A critical analysis of staging in CLL in Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Direction, edited by RP Gale, KR Rai, p 253. Alan R Liss, New York. 1987
- [8] Dürig J, Naschar M, Schmucker U, et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2002; 16:30.

- [9] Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2004; 351:893.
- [10] Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2002; 343:1910.
- [11] Shaw GR, Kronberger DL. TP53 deletions but not trisomy 12 are adverse in B-cell lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000; 119:146.
- [12] Dighiero G, Hamblin TJ, Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2008; 371 (9617): 1017-29.
- [13] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39:44–84.
- [14] Sosa V, Moline T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, Leonart ME. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res Rev.* 2013; 12:376–390.
- [15] Hayes JD, McMahon M. Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett.* 2001; 174:103-113.
- [16] Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36:1199-1207.
- [17] Motohashi H, Yamamoto M. Carcinogenesis and transcriptional regulation through Maf recognition elements. *Cancer Sci.* 2007; 98:135-139.
- [18] Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 2004; 24:7130–7139.

- [19] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1 - Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2011; 16:123–140.
- [20] Okano Y, Nezu U, Enokida Y, Lee MT, Kinoshita H, et al. SNP (-617C4A) in ARE - like loci of the Nrf2 gene: a new biomarker for prognosis of lung adenocarcinoma in Japanese non-smoking women. *PloS one* 8. 2013; e73794.
- [21] Hartikainen JM, Tengstrom M, Kosma VM, Kinnula VL, Mannermaa A, et al. Genetic polymorphisms and protein expression of Nrf2 and Sulfiredoxin predict survival outcomes in breast cancer. *Cancer research*. 2012; 72:5537–5546.
- [22] Itoh K, Ishii T, Wakabayashi N, Yamamoto M. Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic. Res*. 1999; 31:319–324.
- [23] Blank V. Small Maf proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators? *J. Mol Biol*. 2008; 376:913–925.
- [24] Eychene A, Rocques N, Pouponnot C. MAFia in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8:683–693.
- [25] Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1 – dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol*. 2003; 23:8137–8151.
- [26] Satoh H, Moriguchi T, Taguchi K, et al. Nrf2 - deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung. *Carcinogenesis*. 2010; 31:1833–1843.
- [27] Moon EJ, Giaccia A. Dual roles of Nrf2 in tumor prevention and progression: Possible implications in cancer treatment. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015; 79:292-299.
- [28] Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacological Research*. 2008; 58:262-270.

- [29] Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med.* 2006; 3:e420.
- [30] Solis LM, Behrens C, Dong W, et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16:3743–3753.
- [31] Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, et al. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2012; 103:760–766.
- [32] Park JY, Kim YW, Park YK. Nrf2 expression is associated with poor outcome in osteosarcoma. *Pathology.* 2012; 44:617–621.
- [33] Hayden A, Douglas J, Sommerlad Metal. The Nrf2 transcription factor contributes to resistance to cisplatin bladder cancer. *Urol.Oncol.* 2014.
- [34] Cho HY, Marzec J, Kleeberger SR. Functional polymorphisms in Nrf2: implications for human disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 2015; 88:362-372,
- [35] Hong CC, Ambrosone CB, Ahn J, Choi JY, McCullough ML, et al. Genetic variability in iron-related oxidative stress pathways (Nrf2, NQO1, NOS3, and HO-1), iron intake, and risk of postmenopausal breast cancer, *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention. American Association for Cancer Research.* 2007; 16:1784–1794.
- [36] Reszka E, Jablonowski Z, Wiczorek E, Jablonska E, et al. Polymorphisms of Nrf2 and Nrf2 target genes in urinary bladder cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014; 140:1723-1731.
- [37] Gonçalves AC, *et al.* Genetic variants involved in oxidative stress, base excision repair, DNA methylation, and folate metabolism pathways influence myeloid neoplasias susceptibility and prognosis. *Wiley Periodicals, INC.* 2016.

- [38] Trachootham D, Zhang H, Zhang W, et al. Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through a redox-mediated mechanism. *Blood*. 2008; vol. 112, no. 5, pp. 1912–1922.
- [39] Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*. 2009; vol. 34, no. 4, pp. 176–188.
- [40] Campo E, *et al.* The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011; 117(19): 5019-5032.
- [41] Bartlett JMS, White A. Extraction of DNA from whole blood methods. *Mol Biol*. 2003; 226:29–32.
- [42] Shah AR, Maeda K, Deegan MJ, et al. A clinicopathologic study of familial chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 1999; 97:184 8.
- [43] Yuille MR, Houlston RS, Catovsky D. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 1998; 12:1696 9.
- [44] Goldin LR, Pfeiffer RM, Li X, Hemminki K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: Results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood*. 2004; 104:1850.
- [45] Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, et al. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2004; 13:279.
- [46] Abdul-Aziz A, MacEwan DJ, Bowles KM, Rushworth SA. Oxidative stress responses and NRF2 in human leukaemia. Hindawi Publishing Corporation. 2015.
- [47] Jin L, Zuo X-Y, Su W-Y, et al. Pathway-based analysis tools for complex diseases: a review. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2014; 12:210-220.

- [48] Okano Y, Nezu U, Enokida Y, Lee MT, Kinoshita H, et al. SNP (-617C>A) in ARE-like loci of the Nrf2 gene: a new biomarker for prognosis of lung adenocarcinoma in Japanese non-smoking women. *Plos one* 8. 2013: e73794.
- [49] Thunluck T, Kukongviriyapan V, Puapairoj A, Khuntikeo N, Senggunprai L, et al. Association of Nrf2 polymorphism with cholangiocarcinoma prognosis in Thai patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 15. 2014; 299-304.
- [50] Hartikainen JM, Tengstrom M, Kosma VM, Kinnula VL, Mannermaa A, et al. Genetic polymorphisms and protein expression of Nrf2 and Sulfiredoxin predict survival outcomes in breast cancer. *Cancer research* 72. 2012; 5537-5546.