UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Expressão dos genes *ABCG2* e *SCLO1A2* e sua relação com a
resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia
mieloide crônica**

Luciene Terezina de Lima

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientadora:

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara

São Paulo

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Expressão dos genes *ABCG2* e *SCLO1A2* e sua relação com a
resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia
mieloide crônica**

Luciene Terezina de Lima

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientadora:

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L732e Lima, Luciene Terezina de
Expressão dos genes *ABCG2* e *SCLO1A2* e sua relação com a resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica / Luciene Terezina de Lima. -- São Paulo, 2012.
85p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Guerra-Shinohara, Elvira Maria

1. Farmacogenética 2. Expressão gênica 3. Leucemia mieloide crônica I. T. II. Guerra-Shinohara, Elvira Maria, orientador.

615.766 CDD

Luciene Terezina de Lima

**Expressão dos genes *ABCG2* e *SCLO1A2* e sua relação com a resposta ao
mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Orientadora/Presidente

1°.examinador

2°.examinador

São Paulo ,___de_____ de _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus Pais e ao meu irmão Euler
pelo apoio incondicional em todas as
etapas da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me iluminar e guiar o meu caminho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em nome do seu diretor, Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo em nome de sua chefe, Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em nome de sua coordenadora Profa. Dra. Primavera Borelli.

À querida Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara pela oportunidade de desenvolver este projeto, por sua orientação e pelo incentivo que sempre me deu. Obrigada pelos conselhos pela amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão dos recursos financeiros para a execução deste projeto de pesquisa.

À Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata, por seus conselhos e ensinamentos.

Aos médicos e funcionários do Hospital Brigadeiro, especialmente à Dra. Maria Aparecida Zanichelli, Dra. Maria Dulce Collassanti, pela colaboração na seleção dos pacientes deste estudo.

À toda equipe do hemocentro da Santa Casa de São Paulo, em especial ao Dr. Carlos Sérgio Chiattoni, pelo espaço e liberdade que nos deram para a seleção semanal dos pacientes e à querida enfermeira Nilva que me ajudou nas coletas.

Aos pacientes que contribuíram de forma anônima para este estudo.

Às professoras Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata, Dra. Fabiola Attié de Castro e Dra Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille pelas sugestões na minha banca de qualificação.

Ao meu anjo da guarda Adriana Maciel pela amizade e apoio que me deu quando cheguei a São Paulo.

Ao amigo Douglas Vivona, pelo incentivo e por praticamente ser meu co-orientador.

Às amigas especiais que fiz ao longo desta caminhada, Carolina Tosin Bueno e Kelma Cordeiro da Silva. Obrigada por tudo!

Aos queridos Vitório Bueno e Cleide Tosin Bueno pelo apoio.

Ao querido Alexandre Froes Marchi, pelo carinho, companheirismo e apoio irrestrito. Não há palavras para agradecer tudo o que fez por mim.

Aos queridos Amauri Marchi e Débora Marchi pelo apoio.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela convivência tão divertida e pelo companheirismo.

Aos professores Dra. Rosário Domiguez Crespo Hirata e Mário Hiroyuki Hirata por cederem seu laboratório para execução dos experimentos e aos alunos André Luchessi, Patrícia de Cássia Salgado, Álvaro Danilo Cerda Maureira, e Débora Cavichioli pelos ensinamentos que me passaram.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em especial Ana Maria Dantas e a Claudinha que sempre me atenderam com muita prontidão.

Ao amigo Paulo Caleb Júnior de Lima Santos, pelos conselhos e por me ajudar sempre que preciso.

À toda minha família e amigos sempre presentes e maravilhosos.

Às amigas Marcela Bach Prieto, Juliana Martinez Chiozzo e Stella Célio Junqueira pela amizade e por tudo o que aprendo com vocês diariamente.

Aos meus Pais e meu irmão Euler pelo incentivo e amor!

SUMÁRIO	Pág.
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Fisiopatologia	01
1.1.2 Sinalização via BCR-ABL1	03
1.2 Fases da LMC	04
1.2.1 Fase Crônica	04
1.2.2 Fase Acelerada	04
1.2.3 Crise Blástica	05
1.3 Diagnóstico laboratorial	06
1.4 Fatores prognósticos	06
1.5 Tratamento	06
1.5.1 Mesilato de Imatinibe	08
1.5.2 Mecanismo de ação do MI	09
1.5.3 Falhas no tratamento com MI: causas	10
1.5.3.1 Mecanismos <i>BCR-ABL1</i> dependentes	11
1.5.3.2 Mecanismos <i>BCR-ABL1</i> independentes	12
1.5.4 Relação do MI com os transportadores de membrana	13
1.5.4.1 Transportadores de influxo (captação)	13
1.5.4.2 Transportadores de efluxo	14
2. OBJETIVO GERAL	17
2.1 Objetivos Específicos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Casuística	18
3.1.1 Pacientes com LMC	18
3.1.2 Indivíduos saudáveis	20
3.2 Aspectos Éticos	20

3.3 Amostras Biológicas	20
3.4 Metodologia Laboratorial	21
3.4.1 Determinação do Hemograma	21
3.4.2 Análise citogenética para pesquisa de alterações cromossômicas	21
3.4.3 Quantificação do transcrito <i>BCR-ABL 1</i> por PCR em tempo real....	22
3.4.4 Extração do RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)	24
3.4.5 Escolha do gene de referência	24
3.4.6 Avaliação da eficiência dos ensaios.....	26
3.4.7 Determinação da expressão dos genes <i>SLCO1A2</i> e <i>ABCG2</i>	26
3.4.8 Extração e avaliação do DNA genômico.....	27
3.4.9 Avaliação de polimorfismos no gene <i>ABCG2</i>	28
3.5. Análises Estatísticas	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Dados dos pacientes com LMC	30
4.2. Resposta ao tratamento com MI	33
4.3. Testes de expressão gênica	34
4.3.1. Escolha do gene endógeno	34
4.3.2. Eficiência.....	35
4.3.3 Expressão dos genes <i>ABCG2</i> e <i>SLCO1A2</i>	37
4.3.3.1 Comparação da expressão do gene <i>ABCG2</i> entre os pacientes com LMC e os indivíduos saudáveis	37
4.3.3.2 Comparação da expressão do gene <i>ABCG2</i> nos grupos de respondedores e não respondedores a dose padrão de MI	38
4.3.3.3 Expressão do gene <i>ABCG2</i> nos grupos com resistência primária e resistência secundária.....	39
4.3.3.4 Expressão do gene <i>ABCG2</i> nos grupos com resposta	

molecular maior (RMM).....	41
4.3.3.5 Análise da expressão do gene <i>ABCG2</i> segundo a resposta	
molecular completa (RMC).....	42
4.3.3.6 Correlação entre a expressão de <i>ABCG2</i> e o número de	
transcritos <i>BCR-ABL 1</i>	43
4.3.3.7 Expressão gênica de <i>SLCO1A2</i>	43
4.4. Análises dos polimorfismos do gene <i>ABCG2</i>	44
4.4.1. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos no gene	
<i>ABCG2</i>	44
4.4.2 Associação entre os polimorfismos e a resposta MI.....	45
4.4.3 Associação entre os polimorfismos e a resposta molecular maior	
e resposta molecular completa	46
4.4.4 Análise dos haplótipos	48
4.4.5 Efeito dos polimorfismos na expressão gênica	50
5. DISCUSSÃO	52
5.1. Estudos de expressão gênica.....	53
5.2. Estudos farmacogenéticos.....	55
6. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	71

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Pág.

Figura 1. Fusão dos genes <i>BCR-ABL1</i> com conseqüente produção da proteína BCR-ABL1 com atividade tirosinoquinase alterada	02
Figura 2. Estrutura dos genes <i>BCR</i> , <i>ABL1</i> e do gene quimérico <i>BCR-ABL1</i> . Os genes quiméricos formados a partir destas fusões são os genes e1a2, b2a2, b3a2 e e19a2	03
Figura 3. Curva de sobrevida dos pacientes com LMC em várias terapias durante o período de 1983 a 2009, conforme observado pelo Grupo Alemão de Estudos em LMC	07
Figura 4. Estrutura química do MI	09
Figura 5. Mecanismo de ação do MI	09
Figura 6: Mapa das mutações no domínio quinase do gene <i>BCR-ABL1</i> relacionadas a resistência ao MI	12
Figura 7. Posição dos genes de referência, como determinado pelo software GeNorm TM	34
Figura 8. Representação da curva-padrão de qPCR para a medida da expressão de <i>GAPDH</i> e <i>ABCG2</i> . A eficiência foi estimada pela análise de regressão linear do gráfico obtido pela relação C_T versus concentração de cDNA (ng)	36
Figura 9. Expressão gênica de <i>ABCG2</i> entre os indivíduos saudáveis, respondedores e não respondedores a dose padrão de 400mg/dia de MI.	37
Figura 10. Expressão gênica de <i>ABCG2</i> entre os respondedores e não respondedores a dose padrão de 400mg/dia de MI	38
Figura 11. Expressão gênica de <i>ABCG2</i> entre os respondedores e não respondedores com resistência primária ao MI.	39
Figura 12. Expressão gênica de <i>ABCG2</i> entre os respondedores e não respondedores com resistência secundária ao MI	40
Figura 13. Expressão gênica de <i>ABCG2</i> em pacientes com resposta molecular maior (RMM).	41
Figura 14. Expressão gênica de <i>ABCG2</i> em pacientes com resposta	

molecular completa (RMC). 42

Figura 15. Expressão gênica segundo os genótipos do polimorfismo c.421C>A nos grupos total, de respondedores e não respondedores ao MI ... 50

Figura 16. Expressão gênica segundo os genótipos do polimorfismo c.-19-99G>A nos grupos total, de respondedores e não respondedores ao MI..... 51

LISTA DE TABELAS	Pág.
Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos e sondas dos genes de referência	25
Tabela 2. Características dos ensaios Taqman® utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real	27
Tabela 3. Descrição dos polimorfismos estudados	28
Tabela 4. Distribuição da idade, cor de pele, IMC, tempo de tratamento com MI, tratamento prévio com outros medicamentos e tempo de diagnóstico dos pacientes com LMC incluídos no estudo segundo o gênero	31
Tabela 5. Distribuição da idade, cor de pele, IMC, tempo de tratamento com MI, tratamento prévio com outros medicamentos e tempo de diagnóstico dos pacientes respondedores e não respondedores ao MI	32
Tabela 6. Avaliação da resposta ao tratamento ao MI dos pacientes incluídos no estudo segundo critérios da <i>European Leukemianet</i>	33
Tabela 7. Eficiência da reação de PCR quantitativa para os genes estudados	35
Tabela 8. Expressão gênica de <i>ABCG2</i> e o número de transcritos <i>BCR-ABL1</i> entre os grupos de resposta a dose padrão de MI	39
Tabela 9. Expressão gênica de <i>ABCG2</i> entre os grupos de respondedor, resistência primária e resistência secundária ao MI	40
Tabela 10- Distribuição de genótipos e de alelos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene <i>ABCG2</i> entre pacientes com LMC e controles saudáveis	44
Tabela 11 – Frequência de genótipos e de alelos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene <i>ABCG2</i> em pacientes respondedores e não respondedores ao MI.	45
Tabela 12 – Frequência de genótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene <i>ABCG2</i> segundo a resposta molecular maior e resposta molecular completa no grupo total de pacientes com LMC.....	46

Tabela 13 – Frequência de genótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene <i>ABCG2</i> segundo a resposta molecular maior nos pacientes respondedores e não respondedores ao MI.	47
Tabela 14 – Frequência de genótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene <i>ABCG2</i> segundo a resposta molecular completa nos pacientes respondedores e não respondedores ao MI.	47
Tabela 15. Frequência dos haplótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene <i>ABCG2</i> em pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento com MI	48
Tabela 16. Frequência dos haplótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene <i>ABCG2</i> em pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento com MI segundo a resposta molecular maior (RMM)	49
Tabela 17. Frequência dos haplótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene <i>ABCG2</i> em pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento com MI segundo a resposta molecular completa.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: *ATP binding cassette*

ABCB1: ATP-binding cassette, sub- family B (M DR/TAP), member 1

ABCC2: ATP-binding cassette, sub- family C(CFTR/MRP) , member 2

ABCG2: ATP-binding cassette, sub- family G, member 2

ABL: *Abelson murine oncogene*

ATP: Adenosina trifosfato

B2M: Beta-2-microglobulina

BCR: *Gene break point cluster region*

CT: Ciclo de threshold

CYP3A4: Citocromo P 450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 4

CYP450: Citocromo P 450

FAM: 6-carboxifluoresceína

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HMBS: Hidroximetilbilane sintase

hOCT: Transportador de cátions orgânicos humano

HPRT1: Hipoxantina fosforibosiltransferase 1

IRIS: *Internacional Study of Interferon versus STI571*

JAK: Janus quinase

LLA leucemia linfoblástica aguda

LMA leucemia mieloide aguda

LMC: leucemia mieloide crônica

MAPK: proteínas quinases oncogênicas ativadas

MDR: Resistência a múltiplas drogas

MI: mesilato de imatinibe

PCR: Reação em cadeia da polimerase

P-gp: Glicoproteína P

Ph: Philadelphia

PI3K: Fosfoinositol 3-fosfato quinase

RCC: resposta citogenética completa

RHC: resposta hematológica completa

RMC: resposta molecular completa

RMM: resposta molecular maior

RNAm: RNA mensageiro

RT-PCR transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

SAPK: proteína quinase ativada por stress

SDHA: Complexo da succinato desidrogenase, subunidade A, flavoproteína (Fp)

SLC: Solute like carrier

SLCO1A2: Solute carrier organic anion transporter family, member 1A2

SRC: SRC-kinase Homology

STAT: Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição

t: translocação

TKI inibidor de tirosinoquinase

UBC: Ubiquitina C

LIMA, L.T. **Expressão dos genes *ABCG2* e *SLCO1A2* e sua relação com a resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica** 2012. 85p. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Farmácia-Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

RESUMO

A introdução do Mesilato de Imatinibe (MI) como primeiro inibidor específico de BCR-ABL1 na prática clínica revolucionou o tratamento da Leucemia Mieloide Crônica (LMC), tornando-se a terapia padrão para o tratamento desta doença. Porém, cerca de 30% dos pacientes com LMC não respondem à terapia com MI e um número substancial destes casos de resistência não tem causa conhecida. O MI interage com transportadores de membrana ABCG2 e SLCO1A2. Este estudo teve como objetivo investigar a relação da expressão gênica de *ABCG2* e de *SLCO1A2* com marcadores de resposta ao tratamento com MI, em indivíduos com LMC e avaliar a influência dos polimorfismos ABCG2 c.421C>A e ABCG2 c.-19-99G>A na resposta ao MI. Foram incluídos 118 pacientes com LMC os quais foram classificados em dois grupos: Grupo Respondedor, constituído por 70 pacientes com resposta citogenética completa com a dose padrão de MI (400 mg/dia) por até 18 meses e, Grupo não Respondedor constituído por 48 pacientes sem resposta citogenética completa à dose inicial de 400 mg/dia de MI ou que perderam esta resposta ao longo do tratamento e foram reescalados para doses de 600 ou 800 mg/dia. A resposta ao tratamento foi avaliada segundo os critérios da *European LeukemiaNet*. Foram excluídos pacientes com alterações citogenéticas diferentes do cromossomo Ph e mutações no gene *BCR-ABL1*. Amostras de sangue periférico foram utilizadas para: extração do RNA total para quantificação dos transcritos *BCR-ABL1* e expressão gênica de *ABCG2* e *SLCO1A2*; extração de DNA e análise citogenética de banda G. A expressão do gene *ABCG2* e *SLCO1A2* e as análises dos polimorfismos foram feitas por PCR em tempo real. A expressão de *ABCG2* foi maior no grupo de não respondedores ao MI ($P=0,028$). Este resultado foi influenciado pelos pacientes com resistência primária ($N=34$ $P=0,029$), mas não pelos que apresentaram resistência secundária ($N=14$ $P=0,249$) quando comparado com respondedores ($N=70$). A elevada expressão do gene *ABCG2* foi também associada àqueles pacientes que não tiveram resposta molecular maior (número de transcritos *BCR-ABL1* $\leq 0,1\%$) ($P=0,027$) quando todos os pacientes foram analisados. O gene estudado não foi associado com a resposta molecular completa (número de transcritos *BCR-ABL1* $\leq 0,032\%$). Com relação ao gene *SLCO1A2* não foi possível determinar sua expressão devido à baixa concentração do RNA obtido. Os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99G>A não foram associados com a expressão do gene *ABCG2* e a resposta ao MI. A RMC (no grupo de respondedores) foi associada com o genótipo 421CC e houve tendência a maior frequência de portadores do genótipo -19-99GG neste mesmo grupo. Portadores do genótipo -19-99AA apresentaram tendência ao risco de ter LMC. Os resultados deste estudo nos permitem concluir que a maior expressão de *ABCG2* está associada com a resistência primária ao MI podendo então ser um mediador da resistência ao MI. Os polimorfismos do gene *ABCG2* não influenciaram na expressão gênica de *ABCG2*, mas impactaram na RMC no grupo respondedor ao MI.

Palavras Chave: ABCG2, Leucemia Mieloide Crônica, Mesilato de imatinibe, expressão gênica.

LIMA, L.T. **Gene Expression of ABCG2 and SLCO1A2 and its relationship with response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia** 2012. 85p. Dissertation of Masters [Program of Post-graduation in Pharmacy - Clinical Analysis of The Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo.

ABSTRACT

The introduction of imatinib mesylate (IM) as the first specific inhibitor of BCR-ABL1 in clinical practice has revolutionized the treatment of chronic myeloid leukemia (CML), becoming the standard therapy for this disease. However, about 20% of CML patients do not respond to therapy with IM and a substantial number of these cases of resistance have no known cause. The IM interacts with membrane transporters ABCG2 and SLCO1A2. The aim of this study was to investigate the relationship of *ABCG2* and *SLCO1A2* gene expression with markers of response to IM in individuals with CML and evaluate the influence of polymorphisms *ABCG2* c.421C>A and c. *ABCG2*-19-99G>A in response to the IM. One hundred and eighteen patients in chronic phase of CML were studied and classified in two groups: Responder Group comprised 70 patients who had a complete cytogenetic response within 18 months of treatment. The non-responder group comprised 48 patients who did not have a complete cytogenetic response with the initial dose (400 mg/day) of IM or who relapsed during treatment and were submitted to higher doses of 600 or 800 mg/day. Criteria of failed response to treatment were established by European LeukemiaNet. Patients with cytogenetic patterns other than the Philadelphia chromosome and patients with mutations in the BCR-ABL1 gene were excluded from this study. Blood samples were obtained for: total RNA extraction for quantification of BCR-ABL1 and gene expression of ABCG2 and SLCO1A2; genomic DNA extraction and band G cytogenetic analysis. The gene expression and the analysis of the polymorphisms were performed by real time PCR. Expression of ABCG2 in non-responder group was higher than in responder group ($P=0.028$). This result was influenced by patients with primary resistance ($n=34$ $P=0.029$) but not secondary resistance ($n=14$ $P=0.249$) when compared with responders ($n=70$). The higher expression of ABCG2 gene was also associated with those patients who had major molecular response (number of BCR-ABL1 $\leq 0.1\%$) ($P=0.027$) when all patients were analyzed. The studied gene was not associated with the complete molecular response (number of BCR-ABL1 ≤ 0.0032). Regarding to the gene SLCO1A2 was not possible to determine its expression due to low concentration of RNA obtained. The c.421C>A e c.-19-99G>A were not associated neither with the ABCG2 gene expression and IM response. CMR in responders group was associated with the 421CC genotype and there was a trend for higher frequency of carriers of genotype -19-99GG in the same group. Carriers of 19-99AA genotype tended to the risk of having CML. The results of this study allow us to conclude that the higher expression of ABCG2 is associated with primary resistance to IM and may be a mediator of resistance to IM. The ABCG2 polymorphisms did not influence the gene expression of ABCG2 but impacted in CMR of the responders to IM.

Key words: ABCG2, chronic myeloid leukemia, imatinib mesylate, gene expression.

1. INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença geralmente insidiosa. A idade média de diagnóstico é em torno dos 50 anos de idade, com menos de 10% dos casos em pacientes com menos de 20 anos (BORTOLHEIRO, CHIATTONE, 2008). Estudos nacionais mostram que a mediana de idade é, no mínimo, dez anos mais baixa que a encontrada na literatura internacional (BORTOLHEIRO, 2007; CAMPOS, 2010).

A incidência mundial da LMC é de 1 a 2 casos para cada 100 mil habitantes por ano e representa aproximadamente 15% de todas as leucemias (KUJAWSKI, TALPAZ, 2007). A LMC é ligeiramente mais freqüente nos homens do que nas mulheres, com taxa de incidência de 1,4 a 2,2 :1 (CORTES, 2006).

A exposição à radiação é um fator que pode predispor à LMC. Pacientes que receberam irradiação terapêutica para o tratamento de algumas doenças como câncer de mama e linfoma possuem pequeno, mas significativo risco de desenvolverem leucemia. Não há influência familiar ou étnica. Os vírus, substâncias químicas e outros fatores ambientais não têm sido associados a esta patologia (GOLDMAN, 2008).

1.1 Fisiopatologia

A LMC caracteriza-se, pela proliferação de células granulocíticas que mantêm sua capacidade de diferenciação e maturação. Como é uma doença de origem clonal, surge em decorrência de uma anomalia na célula primordial pluripotente. O clone anômalo proveniente desta se expande e infiltra o parênquima medular, de modo lento e progressivo, em detrimento da proliferação das células normais. (KANTARJIAN et al., 2006).

A anomalia citada ocorre devido a uma mutação genética que gera um cromossomo atípico: o cromossomo *Philadelphia* (Ph). A presença do cromossomo Ph é característica da LMC por estar presente em cerca de 95% dos casos diagnosticados, sendo esses pacientes denominados de Ph+ (positivos). No entanto, o cromossomo Ph pode ser encontrado em outros tipos de leucemia, tais como em 5% de pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil, 15% a

30% com LLA adulta e cerca de 2% dos casos de leucemia mieloide aguda (LMA) (DRUKER et al., 2006; APPERLEY, 2007).

A translocação cromossômica que gera o cromossomo Ph ocorre entre o cromossomo 22 e o cromossomo 9 (**Figura 1**). Tal fusão resulta em um gene anormal híbrido, denominado *BCR-ABL1*, que codifica uma proteína de fusão BCR-ABL1 com elevada atividade tirosinoquinase. A expressão dessa proteína estimula a proliferação celular, diminui a apoptose, aumenta o crescimento independente de citocinas, diminui a adesão ao estroma medular e produz anormalidades do citoesqueleto (SIMPSON et al, 1998; SAWYERS, 1999; BAIN, 2002; JABBOUR et al 2009).

Figura 1. Fusão dos genes *BCR-ABL1* com conseqüente produção da proteína BCR-ABL1 com atividade tirosinoquinase alterada (adaptado de WINSLOW, 2011).

Dependendo da região do ponto de quebra no gene BCR (M-bcr, m-bcr ou μ -bcr) os produtos de fusão do gene podem ter tamanhos variados, que são indicados por seu peso molecular em kilodaltons (Kd). Na LMC, a clássica fusão dos genes *BCR-ABL1* é a b2a2 ou a b3a3, na qual se funde o *exon 2* (b2) ou o *exon 3* (b3) do BCR ao *exon 2* (a2) do ABL gerando uma oncoproteína de peso molecular de 210

kd (p210). Cerca de 20% a 30% dos casos de LLA Ph⁺ ocorre uma fusão que gera uma proteína de peso molecular p190 (fusão e1a2). Um terceiro tipo de translocação gera a proteína p230 (fusão e19a2), que é observada apenas em um subgrupo de pacientes com leucemia neutrofílica crônica (BAIN, 2002; ADVANI, PENDERGAST, 2002). A **Figura 2** ilustra estes pontos de quebra e os respectivos produtos de fusão dos genes.

Figura 2. Estrutura dos genes *BCR*, *ABL1* e do gene quimérico *BCR-ABL1*. Os genes quiméricos formados a partir destas fusões são os genes e1a2, b2a2, b3a2 e e19a2 (DEININGER et al, 2000)

1.1.2 Sinalização via BCR-ABL1

A ativação constante da tirosinoquinase por meio da onco-proteína BCR-ABL1, causa a ativação constante de várias vias de sinalização. Dentre estas vias estão Myc, Ras, c-Raf, MAPK/ERK, SAPK/JNK, Stat, NFκB, PI-3 quinase, e c-jun (ADVANI, PENDERGAST, 2002).

Estruturalmente, *BCR-ABL1* contém vários domínios. As seqüências *ABL1* codificam domínios homólogos Src (SH3 e SH2), o domínio da tirosinoquinase, o domínio de ligação ao DNA, domínio de ligação de actina, os sinais de localização nuclear e o sinal de exportação nuclear. O domínio SH2 de *BCR-ABL1* recruta proteínas da sinalização como p62dok, c-Cbl, e Rin1. A ligação e fosforilação destas moléculas podem ser funcionalmente importantes assim como mutações na região

SH2 *BCR-ABL1* podem afetar o curso da doença em modelos biológicos (ROUMIANTSEV et al., 2001).

1.2 Fases da LMC

Quanto ao curso clínico da LMC, a doença compreende três fases clinicamente reconhecidas: crônica, acelerada e blástica, embora nem todos os pacientes sigam estas três fases (JABBOUR et al 2009).

1.2.1 Fase Crônica

Na fase crônica, o sangue periférico apresenta leucocitose, comumente acima de 25.000/ μ L, raramente atingindo valores superiores a 400.000/ μ L. Na contagem diferencial das células encontram-se granulócitos em todas as fases de maturação, predominando os mielócitos e as formas maduras, enquanto os mieloblastos e promielócitos representam menos de 10%. A basofilia é um achado comum, a eosinofilia pode estar presente e pode ser encontrada monocitose absoluta. A contagem das plaquetas é normal ou aumentada; 30% dos pacientes exibem trombocitose e menos de 10% trombocitopenia. A medula óssea mostra intensa hiperplasia granulocítica, exibindo morfologia normal com exceção de ocasionais elementos mostrando sinais displásicos (SAWYERS, 1999).

1.2.2 Fase Acelerada

Na maioria dos casos há progressão da doença para uma fase de transição entre as fases crônica e a blástica. Cerca de 15 a 20% podem evoluir diretamente para a crise blástica. É característico uma progressiva resistência da doença ao tratamento já instituído, geralmente associado com maior intensidade dos sintomas constitucionais e aumento do baço. Do ponto de vista clínico, pode ocorrer febre sem causa aparente, dor óssea, astenia, perda de peso, artralguas e dor abdominal relacionadas ao aumento do baço ou infarto esplênico (SAWYERS, 1999).

As principais características laboratoriais são aumento da porcentagem de blastos, promielócitos e basófilos na medula óssea e sangue periférico. Pode ocorrer aumento de fibras de reticulina na medula óssea ou mesmo se estabelecer quadro

severo de mielofibrose. Anormalidades clonais citogenéticas adicionais ocorrem em torno da metade dos pacientes, sendo as alterações mais comuns a duplicação do Ph, isocromossomo 17, trissomia do cromossomo 8 e trissomia do cromossomo 19 (SAWYERS, 1999).

Há diferentes critérios prognósticos para fase acelerada (SOKAL et al., 1988; KANTARJIAN et al., 1996), mas segundo uma revisão de publicações a respeito de LMC, realizada por um painel de especialistas representantes da Rede Européia de Leucemia, os critérios mais utilizados por diferentes autores foram: blastos no sangue periférico ou medula óssea igual a 15 a 29%; blastos somados a promielócitos no sangue periférico ou medula óssea, superior a 30% e blastos inferior a 30%; basófilos no sangue periférico maior ou igual do que 20% e persistente trombocitopenia ($<100.000/\text{mm}^3$) não relacionada à terapia (BACCARANI et al., 2006).

1.2.3 Crise Blástica

Após um período de agravo progressivo da doença ou, excepcionalmente, de forma abrupta como manifestação inicial da LMC, se estabelece a crise blástica com pelo menos 20% de blastos na medula óssea ou sangue periférico, ou pela presença de doença blástica extramedular em cerca de 10% dos pacientes. Os sinais e sintomas podem incluir febre, hemorragias, dores ósseas e linfadenopatia. Os blastos podem apresentar fenótipo mieloide em 60 a 70% dos casos, geralmente como leucemia mieloblástica ou mielomonocítica. É rara a transformação eritroblástica, megacarioblástica e basofílica (BACCARANI et al., 2006).

A transformação para leucemia linfoblástica ocorre em cerca de 30% dos pacientes, geralmente com fenótipo B. Outra possibilidade, menos frequente, é a leucemia bifenotípica. A crise blástica apresenta um prognóstico extremamente reservado, mas de forma geral, a média de remissão e a sobrevida são discretamente melhores na crise linfoide (CORTES et al., 1996).

Quando a crise blástica ocorre de forma extramedular, uma variedade de sintomas e sinais podem se estabelecer, dependentes dos sítios envolvidos. Os mais frequentes são linfonodos, superfície de serosas, pele, tecidos moles, mamas,

gastrointestinal ou genitourinário, esqueleto e sistema nervoso central (CORTES et al., 1996).

1.3 Diagnóstico laboratorial

Na fase crônica da doença, o diagnóstico laboratorial consiste no achado da leucocitose neutrofílica, associada a basofilia e inexistência de doença infecciosa ou evidencia neoplásica sistêmica. A identificação do cromossomo Ph ou identificação do gene híbrido *BCR-ABL1* em leucócitos por técnicas de biologia molecular definem o diagnóstico. Ocasionalmente outras doenças mieloproliferativas podem se assemelhar ao quadro clínico e laboratorial da LMC, porém a identificação da translocação t(9;22) facilita a conclusão diagnóstica. Já na fase acelerada é encontrada aumento do número de basófilos e blastos. E a fase aguda caracteriza-se por presença de 20% ou mais de blastos no sangue periférico ou medula óssea (CORTES, 2006).

1.4 Fatores prognósticos

O prognóstico da LMC varia de acordo com a fase evolutiva da doença. Na fase crônica existem várias classificações visando individualizar grupos de risco em baixo, médio e alto; as mais utilizadas são as propostas por Sokal e por Hasford, que levam em conta a idade, o grau de esplenomegalia, a porcentagem de blastos e o número de plaquetas ao diagnóstico (SUREDA et al., 2003).

1.5 Tratamento

Por muitos anos, a quimioterapia foi o tratamento de escolha para a LMC. A Hidroxicarbamida (um inibidor da enzima ribonucleotídeo-redutase antigamente chamada de hidroxiuréia) e o Bussulfan (um agente alquilante do DNA que impede a duplicação celular) funcionavam de maneira paliativa, pois controlavam o crescimento das células cancerígenas, mas nunca removiam a anomalia causativa ou evitavam que a doença progredisse para a fase aguda. Na década de 1980, o interferon-alfa (IFN- α) tornou-se uma nova terapia importante para LMC porque era o único agente conhecido que poderia induzir remissão hematológica e citogenética. O

IFN- α podia ser associado a outras terapias, mas não era capaz de evitar a eventual progressão fatal da doença, uma vez que, mesmo sendo capaz de provocar remissões citogenéticas, estas não eram suficientes para levar o paciente à cura. Novos agentes que poderiam eliminar seletivamente o clone Ph+ e suficientemente prolongar a sobrevida dos pacientes foram, portanto, pesquisados por um longo tempo (YOKOTA, KIMURA, 2008). No final da década de 1990 o Mesilato de Imatinibe (MI) foi desenvolvido. Dentro de poucos anos após a sua introdução à clínica, MI tornou-se a terapia de primeira linha para a LMC, devido a sua alta eficácia e relativamente poucos efeitos adversos. No entanto, o MI apresenta menor eficácia na crise blástica, na fase acelerada e na LLA (Leucemia Linfoblástica Aguda) Ph+ (GOLDMAN et al., 2003).

Antes do desenvolvimento do MI, a sobrevida dos pacientes era de 5 a 6 anos após o diagnóstico (AGRAWAL et al., 2010). Desse modo, o MI mudou a história natural da LMC aumentando consideravelmente a sobrevida dos pacientes (**Figura 3**).

Figura 3. Curva de sobrevida dos pacientes com LMC em várias terapias durante o período de 1983 a 2009, conforme observado pelo Grupo Alemão de Estudos em LMC (HEHLMANN, 2009 adaptado). IFN: interferon α , SCT: *allogeneic stem cell transplantation*.

É importante ressaltar que a única terapia disponível e reconhecidamente curativa para a LMC é o transplante de medula óssea alogênico, cujas células são compatíveis com as do paciente, o que reduz consideravelmente o risco de rejeição. Somente com esse tratamento as células pluripotentes cancerígenas podem ser realmente eliminadas do corpo do paciente. Porém, é um procedimento difícil, pois os resultados do transplante dependem de múltiplos fatores como: o paciente (idade e fase da doença); o tipo de doador (singênico - gêmeos monozigóticos ou alogênico HLA compatível); o esquema preparatório; e o tratamento pós-transplante (YOKOTA, KIMURA, 2008).

1.5.1 Mesilato de Imatinibe

O MI, comercialmente conhecido como Glivec® é um agente antileucêmico que tem por característica marcante a atuação direta na proteína tirosinoquinase BCR-ABL1.

A introdução de inibidores de tirosinoquinase (TKIs) para o tratamento da LMC mudou a abordagem terapêutica para tratar a doença. O MI foi o primeiro TKI introduzido na prática clínica. O tratamento proporciona uma impressionante taxa de resposta hematológica completa (95%) e completa remissão citogenética (94%), redução do tamanho do baço, e finalmente, a constatação da remissão molecular, quando não é mais detectado o rearranjo *BCR-ABL1* pela técnica de RT-PCR quantitativa (GOLDMAN et al., 2003, DRUKER et al., 2006; VOLPE et al., 2009). No entanto, uma minoria dos pacientes (cerca de 16%) apresenta refratariedade ao MI nos primeiros cinco anos de tratamento (DRUKER et al., 2006).

No Brasil, o Glivec® foi aprovado em 2001 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sob a portaria SAS/MS 431, de 03/10/2001. As condições de aprovação foram as mesmas impostas pelo *Food and Drug Administration* (FDA): medicamento de primeira linha de tratamento para doentes de LMC em fase acelerada ou em fase blástica e medicamento de segunda linha para doentes de LMC em fase crônica.

Atualmente, o MI é amplamente aceito como a terapia padrão para tratamento de pacientes com LMC em fase crônica e de todos os pacientes que falharam no transplante de células-tronco ou na terapia com IFN- α (GILES, 2009).

1.5.2 Mecanismo de ação do MI

O MI é um derivado da substância denominada 2-fenilamino- pirimidina (**Figura 4**). Seu metabolismo ocorre no fígado, através da enzima CYP3A4, cujo tempo de permanência no organismo é de, aproximadamente, 18 horas, sendo então eliminado pela bile ou pela urina. Atua como inibidor seletivo das proteínas da família da tirosinoquinase, incluindo a proteína BCR-ABL1, o receptor do fator de crescimento plaquetário e o receptor c-kit. Porém, o MI é específico para as classes citadas acima. A droga liga-se competitivamente ao receptor da BCR-ABL1, dependente de ATP, e inibe a fosforilação da tirosinoquinase, sendo assim um medicamento seletivo para inibir o clone Ph da LMC (DOBBIN, GADELHA, 2002). A **Figura 5** representa o mecanismo de ação deste TKI.

Figura 4. Estrutura química do MI (BENDE et al. 2010).

Figura 5. Mecanismo de ação do MI (NOVARTIS PHARMA AG, 2007).

Embora este medicamento não atue diretamente na base da patogênese da LMC, impedindo a codificação do gene *BCR-ABL1*, age competindo pelo sítio de ligação do ATP da tirosinoquinase, restaurando, assim, o mecanismo de morte celular. Em estudos realizados *in vitro* verificou-se que o MI reduzia entre 92 e 98% o número de colônias *BCR-ABL1* de sangue periférico ou de medula óssea dos pacientes com LMC, mas sem inibir a formação de colônias normais. Além disso, o MI atua evitando a formação de fenótipos malignos restaurando o mecanismo de morte celular (DRUKER, LYDON, 2000); promovendo a modulação de genes envolvidos no controle do ciclo celular; regenerando a adesão e organização do citoesqueleto e promovendo a apoptose das células positivas para o cromossomo Ph (MELLO, 1999).

Apesar do MI ter revolucionado o tratamento da LMC, aproximadamente 35% dos pacientes em fase crônica tratados com MI desenvolvem resistência ou intolerância ao fármaco (SANTOS, et al., 2011). Com a identificação destas falhas ao tratamento foram desenvolvidos inibidores de tirosinoquinase de segunda geração como nilotinibe, dasatinibe e busotinibe. O Ponatinibe representa atualmente o TKI de última geração e é o único que atua contra a mutação T315I (EIRING et al., 2011).

Paralelo ao avanço destes fármacos, maiores avanços foram alcançados no que diz respeito ao monitoramento e padronização dos critérios de resposta ao MI (SANTOS, et al., 2011).

1.5.3 Falha no tratamento com MI: causas

Os critérios para definição de falha de tratamento e resposta subótima foram recentemente publicados pelo grupo de especialistas do *LeukemiaNet*, baseado nos resultados do estudo IRIS (*International Randomized Study of Interferon and STI-571*) (DEININGER et al., 2009).

Os critérios atuais definem como falha de tratamento a ausência de alguma resposta hematológica aos três meses, ausência de resposta hematológica completa (RHC) ou qualquer resposta citogenética aos seis meses, ausência de resposta citogenética maior aos 12 meses e resposta citogenética completa (RCC) aos 18 meses, além de perda da resposta hematológica e RCC e mutações com alto grau

de insensibilidade ao MI (BACCARANI et al, 2009). Nesses casos, deve ser feita alguma intervenção terapêutica, como aumento de dose, mudança para outro TKI ou encaminhamento para transplante de medula óssea.

Os pacientes com LMC apresentam uma resposta variada ao MI. Clinicamente, a resistência ao MI pode ser dividida em resistência primária e secundária. A resistência primária (ou refratariedade) é definida como a incapacidade de alcançar RHC por três meses, resposta citogenética por seis meses, resposta citogenética parcial por 12 meses, ou RCC por 18 meses (BACCARANI et al, 2006). Resistência secundária é caracterizada pela perda da resposta citogenética ao longo do tratamento com MI (BACCARANI et al, 2006; QUINTÁS-CARDAMA, KANTARJIAN e CORTES 2009).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a resistência ao MI. Estes mecanismos podem ser divididos em: *BCR-ABL1* dependentes e *BCR-ABL1* independentes (QUINTÁS-CARDAMA, KANTARJIAN e CORTES 2009).

1.5.3.1 Mecanismos *BCR-ABL1* dependentes

Cerca de 55% dos casos de resistência podem ser explicados por mutações no gene *BCR-ABL1* (HUGHES et al, 2009). O mecanismo melhor caracterizado é a aquisição de mutações pontuais (**Figura 6**) no domínio quinase do gene *BCR-ABL1*, levando à mudanças na conformação da proteína BCR-ABL1, o que altera a interação BCR-ABL1/MI. (MELO, CHUAH, 2007).

Mais de 100 mutações foram identificadas em amostras clínicas de pacientes que não responderam ao tratamento com MI na fase crônica (**Figura 6**). Estas mutações podem dificultar a atividade do TKI devido a alterações na conformação da tirosinoquinase o que leva ao rompimento de pontos de contato TKI com a proteína. As mutações encontradas com mais frequência são Y253, E255 e T315I (BRANFORD, 2007, BIXBY e TALPAZ, 2009).

Figura 6: Mapa das mutações no domínio quinase do gene *BCR-ABL1* relacionadas a resistência ao MI (MELO e CHUAH, 2007). P=alça de fosfato, B= sítio de ligação do MI, C= domínio catalítico, A= alça de ativação, Verde = mutações detectadas em 2 a 10% Vermelho = mutações detectadas em mais de 10% dos indivíduos com mutação.

Estudos em modelos celulares mostraram que outro mecanismo de resistência ao MI pode ser a superexpressão do gene *BCR-ABL1* (MAHON et al, 2000).

1.5.3.2. Mecanismos *BCR-ABL1* independentes

Embora sejam menos freqüentes e caracterizados, há evidências de que mecanismos *BCR-ABL1* independentes estejam envolvidos na resistência (APPERLEY, 2007). A resistência a um fármaco em particular é um processo multifatorial. O MI é administrado por via oral e, assim como outros medicamentos pode estar sujeito a não aderência ao tratamento, a variações na metabolização, seja por inativação enzimática ou até mesmo por indução da expressão das isoenzimas do citocromo P450 CYP3A4/A5, bem como na ligação a proteínas plasmáticas a alfa1 glicoproteína ácida 1 (AGP1), falhas nos mecanismos apoptóticos por a superexpressão da família SRC quinases, tal como *Lyn* quinase, persistência de células-tronco quiescentes leucêmicas que exibem a refratariedade aos TKIs, evolução clonal que se caracteriza por alterações

cromossômicas adicionais ao Ph, mecanismos epigenéticos ou variações na expressão dos transportadores de membrana que fazem o influxo e efluxo do fármaco (GAMBACORTI-PASSERINI et al., 2000; PENG et al., 2004; APPERLEY, 2007, WANG et al, 2008; JELINEK et al., 2010; DIAMOND e MELO, 2011 e IBRAHIM et al., 2011).

1.5.4 Relação do MI com os transportadores de membrana

A análise do perfil de expressão gênica tem se demonstrado capaz de elucidar os mecanismos de resistência a medicamentos. Por outro lado, também tem sido utilizada para a classificação de subgrupos de doenças malignas, resultando em novos parâmetros prognósticos para pacientes com estas doenças (HOFFMAN et al, 2004). Uma estratégia para prever resistência antes do tratamento com MI poderia ter profundas implicações clínicas, uma vez que permitiria a seleção de pacientes susceptíveis à resposta ao MI ao passo que pacientes com perfil de expressão gênica resistente ao MI poderiam ser tratados com outros medicamentos.

Antes da era imatinibe, as metas do tratamento farmacológico eram obter uma completa resposta hematológica (normalização das contagens de células sanguíneas) e a completa remissão citogenética (ausência de cromossomo Ph+ nas células da medula). Após a introdução do MI na prática clínica, a resposta molecular se tornou o novo objetivo. Assim, os métodos moleculares tornaram-se essenciais para a avaliação da resposta à terapêutica em pacientes com LMC devido ao fato da frequência de RCC nestes pacientes que fazem uso de MI ser muito elevada (87% após 5 anos de tratamento) (DRUKER et al. 2006).

1.5.4.1 Transportadores de influxo (captação)

A família de transportadores de influxo SLC (solute carrier) compreende cerca de 300 proteínas e são organizadas em 43 famílias (FRANKE, SCHERKENBAH e SPARREBOOM, 2009). Estas proteínas podem transportar cátions orgânicos, como, a proteína hOCT1 ou ânions orgânicos, como proteínas OATP1A2 e OATP1B3.

OATP1A2 também conhecido como OATP humana ou OATP1-A, é codificada pelo gene *SLCO1A2* localizado no cromossomo 12 (12p12) (LEE et al, 2005). Substratos da OATP1A2 incluem compostos endógenos, tais como ácidos biliares,

hormônios esteróides, e seus conjugados, hormônios tireoidianos bem como medicamentos, incluindo fexofenadina, ouabaína e peptídeos. O OATP1A2 está presente nos túbulos distais dos néfrons sugerindo um papel importante deste transportador na reabsorção de fármacos que são filtrados ou secretados ao nível do túbulo proximal (TIRONA e KIM, 2002).

Dada a extensão da sua especificidade de substrato e expressão nos órgãos de importância para captação de fármacos, as variações genéticas em *SLCO1A2* podem ter efeitos farmacológicos e toxicológicos significativos (TIRONA e KIM, 2002).

Variações no gene *SLCO1A2* podem contribuir para a variabilidade inter-individual de resposta aos medicamentos. Hu e colaboradores, 2008 sugeriram que a captação intracelular de MI está associada com a expressão do *OATP1A2*. Este transportador é altamente expresso em uma série de tecidos, como o intestino, corpo ciliar, e glioma, mas está ausente nos hepatócitos (BRONGER et al., 2005; GAO et al., 2005; LEE et al., 2005; GLAESER et al 2007). No intestino humano, *OATP1A2* é expresso na escova apical da membrana ao longo das vilosidades. Devido às condições de leve acidez no duodeno o MI pode ser encontrado preferencialmente na forma catiônica (cerca de 90%) (SZAKACS, 2005), podendo o *OATP1A2* ser um transportador importante que facilita a absorção intestinal de MI.

1.5.4.2 Transportadores de efluxo

O gene *ATP-binding cassette transporter G2* (*ABCG2*) está localizado no cromossomo 4q22, possui um tamanho de 66 kb e é constituído por 16 éxons (ZAMBER, et al., 2003). É um membro da subfamília G dos transportadores ABC que codifica a *breast cancer resistance protein* (BCRP), que também pode ser chamada de *mitoxantrone resistant protein* (MXR) ou *placenta-specific ATP binding cassette transporter* (ABCP). Esta proteína que contém seis domínios transmembrana e um sítio de ligação ao ATP tem por função fazer o efluxo celular de substâncias tóxicas e alguns xenobióticos (EKHART, et al., 2009).

O transportador BCRP é expresso em células-tronco hematopoéticas, células hepáticas, células do epitélio intestinal, rim, placenta e barreira hematoencefálica (GIRI, 2009). Foi demonstrado que a indução do transportador *ABCG2* após

exposição crônica ao MI pode ter grande importância na concentração intracelular deste fármaco, uma vez que foi mostrado que um painel de linhagens celulares com alta expressão de ABCG2 (MCF7/MR, MCF7/AdVp3000, HEK293/Neo, HEK293/R, HEK293/G HEK293/T) apresentavam menores concentrações de MI marcado com C14 (BURGUER et al., 2004). Também é conhecido que a exposição das células Caco-2 ao MI a longo prazo induz a alta expressão gênica e protéica de ABCB1 e ABCG2 e menor concentração intracelular de MI (BURGUER et al., 2005).

Um estudo realizado em células Caco-2, como um modelo *in vitro* para transporte intestinal de medicação, demonstrou que a exposição contínua com MI regula positivamente a expressão de ABCB1 e ABCG2, uma vez que estas células apresentaram menores concentrações intracelulares de MI, provavelmente pelo maior efluxo mediado pelos transportadores ABCB1 e ABCG2 (BURGER e NOOTER, 2004). Isto poderia explicar os mecanismos de resistência à droga.

Kim e colaboradores (2009) sugeriram que os resultados do tratamento com MI podem ser previstos através da abordagem farmacogenética em pacientes com LMC. Assim, a variabilidade farmacogenética dos indivíduos pode prever os resultados do tratamento da terapia do imatinibe em pacientes com LMC.

Alguns *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) no gene *ABCG2* têm sido descritos. Os SNPs mais frequentes encontrados em diferentes grupos étnicos são c.34A>G (V12M) e c.421C>A (Q141K). O polimorfismo não sinônimo c.421C>A (rs2231142) que resulta na troca de lisina por glutamina o códon 141 (Q141K) e está localizado no *exon 5*, foi associado com diminuição na expressão da proteína (IMAI, et al., 2002, SISSUNG et al., 2010). Este dado confirma os achados de Gardner e colaboradores (2006) que reportaram que c.421C>A foi associado com níveis intracelulares maiores de MI em modelos *in vitro*.

O mesmo efeito de diminuição de expressão protéica foi observado para o SNP c.34A>G (rs2231137) (MIZUARAI et al., 2004). O genótipo GG para c.34A>G foi significativamente associado a pior resposta ao MI especialmente para a respostas citogenética completa e maior enquanto o alelo C para c.421C>A foi associado com menor RMM (KIM et al., 2009).

Picard e colaboradores (2007) relataram que os níveis plasmáticos de imatinibe estão associados com as respostas citogenética e molecular em pacientes

com LMC que fazem uso deste medicamento sugerindo a importância das diferenças farmacocinéticas individuais na resposta ao MI. Deste modo, tais diferenças na captação e efluxo por proteínas transportadoras podem levar a variações nas concentrações sistêmicas deste fármaco.

Devido a BCRP possuir papel crucial na absorção e excreção na manutenção da concentração intracelular de quimioterápicos o monitoramento farmacogenético deve ser cuidadosamente avaliado uma vez que está envolvido em etapas relevantes da farmacocinética.

Deste modo, considerando a importância dos transportadores de influxo e efluxo na manutenção da concentração intracelular de MI, fazem-se necessários novos estudos envolvendo a relação entre a expressão gênica dos transportadores *SLCO1A2* e *ABCG2* em leucócitos de pacientes com LMC além da avaliação da associação de polimorfismos do gene *ABCG2* e a resposta ao MI.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a relação entre a expressão de genes de transportadores de membrana (*ABCG2* e *SLCO1A2*) e os marcadores de resposta ao MI, em indivíduos com LMC tratados com MI.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de RNAm em *ABCG2* e *SLCO1A2* em leucócitos de pacientes com LMC tratados com MI;
- Estudar a associação da expressão nos genes *ABCG2* e *SLCO1A2* e as respostas citogenética e molecular em pacientes com LMC tratados com o MI;
- Determinar se os genótipos para os polimorfismos c. 421C>A (rs2231142) e c.-19-99 G>A (rs1564481) no gene *ABCG2* estão associados com os valores de expressão do referido gene.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Pacientes com LMC

A partir de 224 pacientes com LMC, foram selecionados e incluídos 118 pacientes com LMC tratados com IM, de ambos os sexos com idades entre 18 e 80 anos, provenientes do Hospital Brigadeiro e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Foram incluídos homens e mulheres maiores de 18 anos com diagnóstico de LMC, portadores de cromossomo Philadelphia (Ph), diagnóstico feito por análise citogenética, e que foram tratados com o IM (400 mg/dia) por pelo menos seis meses com aderência ao tratamento. Foram excluídos os pacientes que tinham a causa da resistência ao IM identificada tais como: portadores de outras alterações nos cromossomos diferente do cromossomo Ph, que tenham sido detectados na análise citogenética e também mutação no gene BCR-ABL1.

Foi aplicado um questionário a cada paciente contendo as seguintes informações: idade, gênero e cor da pele declarada pelo paciente. Outros dados (tipo de tratamento utilizado anteriormente, tempo de tratamento com IM e risco Sokal) foram extraídos do prontuário do paciente. Na entrevista com o paciente também foi avaliada se o mesmo estava em aderência ao medicamento.

Os 118 pacientes foram classificados em dois grupos segundo a resposta a dose padrão de IM (400 mg/dia) (Glivec®), um constituído por 70 pacientes, chamado de respondedor, que obtiveram resposta citogenética completa com a dose padrão em até 18 meses de tratamento, e outro constituído por 48 pacientes com LMC, chamado de não respondedor, que não obtiveram resposta citogenética completa com a dose inicial de IM ou que perderam esta resposta ao longo do tratamento e foram reescalonados para doses de 600 ou 800 mg/dia.

Os critérios de falha de resposta ao tratamento foram estabelecidos pela *European LeukemiaNet* (Quadros 1 e 2)

Quadro 1: Definições de resposta segundo a European LeukemiaNet (BACCARANI et al, 2009)

Resposta	Definição
Hematológica	Contagem de plaquetas $< 450 \times 10^9/L$ Contagem de leucócitos $< 10 \times 10^9/L$ Contagem diferencial: ausência de granulócitos imaturos e $< 5\%$ de basófilos Baço não palpável
Citogenética	Completa: ausência de Ph+ Parcial: Ph+ 1-35% Menor: Ph+ 36-65 % Mínima: Ph+ 66-95% Sem resposta: Ph+ $> 95\%$
Molecular (Razão do transcrito do gene <i>BCR-ABL1</i> de acordo com a escala internacional)	Completa – Transcrito não detectável Maior: $\leq 0,1\%$

Quadro 2: Critérios de falha do tratamento segundo a *European LeukemiaNet* para pacientes com LMC tratados com IM (400 mg/dia) (BACCARANI et al., 2009)

Tempo de tratamento	Resposta
3 meses	Ausência Resposta Hematológica Completa
6 meses	Ausência de Resposta Citogenética (Ph+ $>95\%$)
12 meses	Ausência de Resposta Citogenética Parcial (Ph+ $>35\%$)
18 meses	Ausência de Resposta Citogenética Completa

3.1.2 Indivíduos saudáveis

Para o estudo da frequência dos polimorfismos na população em geral foram utilizadas amostras de DNA provenientes de banco de material biológico de doadores de sangue. Estas amostras serviram unicamente para obter a frequência de genótipos e alelos numa população saudável. Nenhum dado individual dos doadores foi utilizado neste estudo.

Para o estudo da expressão gênica foram incluídos 10 indivíduos saudáveis (5 homens e 5 mulheres) provenientes da FCF-USP. Foi realizado um hemograma destes indivíduos para confirmação de quadro hematológico saudável.

3.2 Aspectos Éticos

Os pacientes com LMC e os 10 indivíduos saudáveis foram informados sobre os objetivos do projeto e consultados sobre a vontade de participar da pesquisa. Sendo favoráveis, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Este projeto de pesquisa foi aprovado nos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, do Hospital Brigadeiro e da Santa Casa de São Paulo (**Anexos 1, 2, 3, 4 e 5**).

3.3 Amostras Biológicas

Foram coletados 20 mL de sangue uma única vez, à vácuo e em tubo BD Vacutainer System[®], contendo o anticoagulante K₃EDTA. O sangue foi utilizado para realização do hemograma e quantificação do transcrito *BCR-ABL1*.

Mais 6 mL de sangue foram coletados, em tubo PAXgene[®], para extração do RNA (estudos de expressão gênica do *ABCG2* e *SLCO1A2*) em leucócitos totais.

3.4 Metodologia Laboratorial

3.4.1 Determinação do Hemograma

Os dados hematológicos foram obtidos através do contador eletrônico Cell-Dyn® 3700 (Abbott Laboratories Illinois, EUA). As extensões sangüíneas do sangue periférico foram feitas imediatamente após a coleta do sangue de cada amostra.

3.4.2 Análise citogenética para pesquisa de alterações cromossômicas

Para avaliação citogenética, foram aspirados 10 mL de medula óssea em tubo heparinizado e a análise citogenética de banda G foi feita a partir do método descrito por Mittelman e colaboradores (1997). Este exame foi realizado pelos laboratórios de citogenética do Hospital Brigadeiro e da Santa Casa de São Paulo, que seguem e utilizam o mesmo método.

Resumidamente, o material aspirado foi colocado em frascos de cultura (Falcon-Becton Dickison NJ, USA) compostos por RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), quantidade suficiente para 5 mL, 20% de soro fetal bovino (Gibco-BRL, NY, USA), 1% de L-glutamina (Gibco-BRL, NY, USA) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina, preparada com 5.000 U/mL de penicilina G sódica e 5.000 µg/mL de sulfato de estreptomicina em 0,85% de solução salina, Gibco-BRL, NY, USA). Posteriormente, foram incubadas em estufa (Hepa Filtered incubator, Forma Scientific, USA) a 37°C.

Após 24 horas de incubação, os frascos foram retirados da incubadora e o material foi transferido para tubos cônicos para centrifuga de 15 mL (Cornig, USA) e assim adicionou-se 0,1 mL de colchicina (Gibco-BRL, NY, USA). Os frascos foram homogeneizados e incubados a 37°C em banho-maria (Fanem-modelo 100, São Paulo, Brasil) por, aproximadamente, uma hora e depois centrifugados a 2.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado com auxílio de pipeta pasteur descartável e o precipitado foi ressuspenso.

Ao material ressuspenso, foi acrescentada uma quantidade de solução hipotônica (0,075 M de cloreto de potássio, Merck, Rio de Janeiro, Brasil) até completar 10 mL. Os frascos foram novamente incubados a 37°C em banho-maria por 20 minutos e centrifugados, sendo o sobrenadante desprezado. Esta etapa tinha

como finalidade o rompimento ou apenas a fragilização da membrana citoplasmática.

As amostras foram lavadas de três a cinco vezes com solução fixadora (solução de Camoy), que consiste em três partes de metanol para uma parte de ácido acético glacial. A primeira lavagem foi realizada em solução gelada (2°C a 8°C) visando a boa separação do material nuclear. Após essas lavagens, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em um volume final de 1 a 2 mL.

A partir do material fixado, uma gota do precipitado foi colocada sobre uma lâmina limpa (Perfecta Ltda, São Paulo, Brasil). Rapidamente, essa lâmina foi exposta ao calor utilizando o bico de Bunsen. As gotas foram lançadas a uma distância de 15 cm, pois nesses casos, onde foi efetuada a estimulação através de agentes mitóticos, os cromossomos se dispersam com muita facilidade.

Após o gotejamento do material nas lâminas, essas foram embrulhadas em papel Flor Post (Ripel, São Paulo, Brasil) e permaneceram de 3 a 10 dias em repouso. Esta espera foi necessária para o envelhecimento da lâmina, o que ajuda o bandamento dos cromossomos e a melhor visualização das bandas.

Para cada amostra, 20 metáfases foram estudadas de acordo com as normas do Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN, 2009).

3.4.3 Quantificação do transcrito *BCR-ABL1* por PCR em tempo real

Este exame foi realizado pelo laboratório de biologia tumoral do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo como exame assistencial.

A Extração do RNA a partir de leucócitos totais foi feita segundo o protocolo a seguir:

Foram utilizados 20mL de sangue periférico, colhidos em tubo EDTA, e o mesmo volume de tampão de lise (1mM NH_4HCO_3 ; 14mM NH_4Cl). A solução foi então acondicionada em gelo e mantida em agitação por 30 minutos. Decorrido este tempo, a solução foi submetida à centrifugação a 4°C, 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e uma segunda lavagem foi realizada. O sobrenadante

foi novamente desprezado e o botão de leucócitos foi ressuspendido em 1 mL de Trizol™ reagente (Invitrogen, USA). Foram adicionados 200µL de clorofórmio e as amostras foram agitadas e centrifugadas a 4°C, 12000g por 15 minutos. A fase aquosa foi separada em um novo tudo e precipitada com isopropanol. Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 12000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o botão de RNA foi lavado com etanol a 70% com posterior centrifugação a 4°C, 12000g por 5 minutos. O etanol foi descartado e o botão de RNA passou pela etapa de secagem para completa evaporação do etanol remanescente. O RNA foi ressuspendido em água MiliQ estéril com DEPEC e estocado a -80°C. A integridade do RNA obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. A concentração do RNA obtido foi determinada por espectrofotometria utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, USA).

As quantificações do número de transcritos *BCR-ABL1* foram realizadas no equipamento Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Sydney, Austrália), utilizando o sistema Taqman® de sondas de hibridização (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Para a análise de cada transcrito *BCR-ABL1*, foram preparadas duas reações, uma para o gene alvo e outra para o gene interno *BCR*. As sondas utilizadas foram marcadas com FAM (repórter) em 5' e TAMRA (*quencher*) em 3'. Cada amostra foi quantificada em duplicata, tanto para o gene alvo quanto para o gene interno padrão, controle negativo, controle positivo e branco. Para cada amostra, a reação foi realizada com volume final de 15 µL

Os ciclos para amplificação das amostras foram os seguintes: 1 ciclo a 50°C por 2 minutos, 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Para validação, a eficiência da curva deveria estar próxima a 100%, a inclinação da reta ("*slope*") próximo a 3,3 e R tendendo a 1. O resultado obtido foi expresso como relação do número de transcritos de *BCR-ABL1* pelo número de transcritos do gene interno *BCR*. O valor foi comparado a um "*baseline*" (68%) determinado através da quantificação do número de transcritos *BCR-ABL1* de 30 pacientes com LMC ao diagnóstico. Como o "*baseline*" obtido não foi de 100%, foi calculado um fator de correção de 1,47 para que fosse possível calcular os

valores obtidos a uma escala internacional, na qual o “*baseline*” é de 100% e considera a RMM um valor igual ou menor a 0,1% de transcritos de *BCR-ABL 1*.

3.4.4 Extração do RNA e síntese do DNA complementar (cDNA)

O sangue periférico dos pacientes foi coletado em 3 tubos PAXgene® e congelados a -80°C. O RNA foi extraído através do *PAXGENE Blood RNA Kit* (PreAnalytix/Qiagen, Alemanha). A *concentração e a pureza do RNA* foram determinadas por espectrofotometria a 230nm utilizando o espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA™ Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O ensaio de RT-PCR foi realizado em termociclador *Mastercycler Gradient* modelo 22331 (Eppendorf, Hamburg, Germany) com as seguintes etapas: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR quantitativa (qPCR).

3.4.5 Escolha do gene de Referência

A análise da expressão gênica foi feita pelo método de quantificação relativa usando um gene de referência como controle endógeno. Para a escolha deste gene de referência foi utilizado o programa geNorm™ (VANDESOMPELE et al., 2002). Este teste foi feito utilizando-se RNA tanto de respondedores quanto de não respondedores ao tratamento com MI. As sondas para os genes de referência foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Foram testados cinco genes listados na tabela abaixo:

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos e sondas dos genes de referência

<i>Gene</i>	<i>Sequencia de referência</i>	<i>Oligonucleotídeos e sondas</i>	<i>Sequencia 5' 3'</i>	<i>Tamanho (pb)</i>
<i>B2M</i>	NM_004048.2	Sense	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	86
		Antisense	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	
		Sonda	VIC – CTCCACAGGTAGCTCT	
<i>GAPDH</i>	NM_002046.3	Sense	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	230
		Antisense	CTGGAAGATGGTGATGGGATTTTC	
		Sonda	VIC – TCAGCCTTGACGGTGC	
<i>HMBS</i>	NM_000190.3	Sense	GGCAATGCGGCTGCAA	64
		Antisense	GGGTACCCACGCGAATCAC	
		Sonda	VIC - CGG AAG AAA ACA GCC	
<i>HPRT1</i>	NM_000194.1	Sense	TGACACTGGCAAAACAATGCA	94
		Antisense	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	
		Sonda	VIC-CCTTGGTCAGGCAGTAT	
<i>SDHA</i>	NM_004168.2	Sense	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	86
		Antisense	CCACCACTGCATCAAATTCATG	
		Sonda	VIC-TCCATTTCTGCTCAGTATC	

VIC: vaccine-type-specific; *B2M*, beta-2-microglobulina; *GAPD*, gliceraldeído-3- fosfato-desidrogenase; *HMBS*, hidroximetilbilane sintase; *HPRT1*, hipoxantina fosforibosiltransferase 1; *SDHA*, complexo da succinato desidrogenase, subunidade A; *UBC*, ubiquitina C.

As reações de amplificação foram realizadas com 250 nM de sonda, 300 nM de cada iniciador (sense e antisense), 1X *Taqman® Universal PCR master mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 50 ng de cDNA totalizando 25 µL. As condições de termociclagem da PCR em tempo real foram: 50°C por 2 min e 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 30s.

3.4.6 Avaliação da eficiência dos ensaios:

As eficiências dos ensaios de amplificação foram calculadas utilizando-se a curva padrão obtida da relação de diferentes concentrações de cDNA e os respectivos valores de *Cycle Threshold* (C_T). A eficiência dos ensaios (E) foi calculada pela fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular})} - 1$$

A eficiência de cada ensaio foi considerada adequada para valores entre 90 e 110%.

Este ensaio foi feito em triplicata.

3.4.7 Determinação da expressão dos genes *SLCO1A2* e *ABCG2*

A determinação da expressão dos genes *SLCO1A2* e *ABCG2* foi feita por PCR em tempo real utilizando o sistema Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O cDNA foi amplificado no equipamento *ABI 7500 Fast* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando os ensaios *Taqman® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A amplificação foi avaliada por monitoração contínua de fluorescência seguindo a metodologia descrita por Hirayama e colaboradores (2008). Estes ensaios estão descritos na **Tabela 2**.

O volume total de reação de 10 µL foi composto de 3,5 µL de Água miliQ autoclavada tratada com dimetil pirocarbonato (água DEPC), 5 µL de Taqman® *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,5 µL de ensaio e 1 µL de cDNA.

Tabela 2. Características dos ensaios Taqman® utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real.

Gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
ABCG2	<i>Homo sapiens</i>	Hs01053790_m1	83
SLCO1A2	<i>Homo sapiens</i>	Hs00366488_m1	72
GAPDH	<i>Homo sapiens</i>	Hs00266705_g1	74

pb: pares de bases

Os valores quantitativos da expressão dos genes foram obtidos pelos valores do CT ou limiar da amplificação, que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Expressão} = 2^{-\Delta CT}$$

onde: $\Delta CT = C_T \text{ gene de interesse} - C_T \text{ gene de referência}$

Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram realizados controles sem amostra (controle negativo) para avaliar possíveis contaminações dos reagentes com os produtos de PCR.

3.4.8 Extração e avaliação do DNA genômico

Para otimização do processo de extração do DNA para obtenção de uma maior concentração de DNA, 1mL das amostras de sangue foram previamente submetidas à lise celular com 900 µL do tampão Tris-1 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5% seguida de centrifugação por 5 minutos a 5000 RPM. A partir desta amostra, o DNA genômico foi extraído segundo o protocolo do *QIAAMP DNA BLOOD MINI kit* (PreAnalytix/Qiagen, Germany) e a extração foi realizada no QIAcube (PreAnalytix/Qiagen, Germany).

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose a 1%. A quantificação foi realizada em fotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc – EUA) a 260 nm, e a pureza das amostras do DNA determinada pela relação A260/A280 (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.4.9 Avaliação de polimorfismos no gene ABCG2

A genotipagem dos polimorfismos c. 421C>A (rs2231142) e c.-19-99 G>A (rs1564481) no gene *ABCG2* foi feita pela técnica de PCR em tempo real utilizando ensaios específicos da Applied Biosystem (Applied Biosystems, Foster City, USA). A descrição dos polimorfismos e o número dos ensaios utilizados estão demonstrados na **tabela 3**.

O polimorfismo c.-19-99 G>A foi escolhido devido a alta frequência do alelo menor que está apresentada na **Tabela 3** de acordo com os dados disponíveis no banco de SNPs do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Já o polimorfismo c. 421C>A foi escolhido com base dos dados da literatura.

Tabela 3. Descrição dos polimorfismos estudados

<i>Referência do gene</i>	<i>Polimorfismo</i>	<i>Referencia do SNP</i>	<i>Troca de base</i>	<i>Nº do ensaio</i>	<i>Frequência do alelo menor</i>
NM_004827.2	c. 421 C>A	rs2231142	C>A	C__15854163_70	0,117
NM_004827.2	c.-19-99 G>A	rs1564481	G>A	C__9510430_10	0,317

Como controle de qualidade de cada polimorfismo, duas amostras de cada genótipo (homozigoto, heterozigoto e homozigoto mutado) foram sequenciadas no Serviço de Sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP para confirmação dos resultados.

3.5 Análises Estatísticas

A construção do banco de dados e as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa computacional SPSS versão 19.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Os gráficos foram obtidos pelo programa GraphPad versão 5.04 (San Diego, CA, USA).

Para descrever o perfil da amostra segundo as diversas variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (gênero, cor da pele, etc.) e estatísticas descritivas das variáveis contínuas (idade, tempo de doença, etc.).

As variáveis numéricas (idade, tempo de tratamento e expressão gênica) foram comparadas utilizando o teste t de Student ou Mann-Whitney. A comparação das frequências das variáveis categóricas (tratamento anterior ao MI e respostas citogenética e molecular) foi feita pelos testes Qui-quadrado ou *Likelihood ratio*.

Correlações de Spearman foram realizadas entre as variáveis expressão do gene *ABCG2* e tempo de doença ou tempo de uso de MI segundo os grupos de respostas (respondedor e não respondedor). Nestas análises foram excluídos 7 pacientes que tinham número de transcritos $\geq 8,0\%$ (*outliers*). Seis destes pacientes apresentavam resposta citogenética mínima e um não apresentava resposta citogenética.

A regressão logística foi usada para calcular o risco de ter LMC segundo os genótipos para os polimorfismos no gene *ABCG2*. Pelo fato de haver apenas 1 paciente com LMC portador de genótipo AA para o polimorfismo c. 421C>A e nenhum paciente do grupo controle com este genótipo, foi decidido agrupar os indivíduos portadores do alelo A (genótipos CA + AA) para o cálculo de risco de ter LMC. Para o polimorfismo *ABCG2* c.-19-99 G>A, o agrupamento foi realizado utilizando o alelo ancestral, ou seja, os genótipos GG e GA foram agrupados. Desse modo, foi calculado o risco que os portadores de genótipo AA ter LMC quando comparado aos portadores de genótipos GG + GA (considerados como referência) na regressão logística.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Dados dos pacientes com LMC

Os 118 pacientes LMC incluídos neste estudo estavam em fase crônica da doença. Destes, 59,3% (n=70) classificados como respondedores e 40,7% (n=48), não respondedores a dose padrão de MI (400 mg/dia). Dos pacientes não respondedores, 70,3% nunca obtiveram resposta citogenética completa (resistência primária) após 19,5 meses de tratamento (em média) e 26,4% alcançaram a resposta citogenética completa, porém após 30,7 meses de tratamento (em média) vieram a perder a resposta (resistência secundária).

A avaliação do risco Sokal não foi realizada no grupo total de pacientes com LMC, pois alguns pacientes chegavam ao centro de avaliação previamente tratados com Hidroxicarbamida. O risco Sokal foi avaliado em apenas 78 pacientes, sendo 28,2% baixo risco, 52,5% risco intermediário e 19,3% alto risco.

As características dos pacientes respondedores e não respondedores estão apresentadas na **Tabela 4**.

Quando o grupo de pacientes com LMC foi dividido segundo o gênero, não houve diferença significativa quanto à idade, cor da pele declarada, índice massa corpórea (IMC), tempo de diagnóstico, medicações anteriores nos dois grupos de respondedores e não respondedores ($p>0,050$). A partir deste momento, todas as análises estatísticas foram realizadas entre os grupos de respondedores e não respondedores, uma vez que não há diferença entre os gêneros.

Os grupos de respondedores e não respondedores tiveram distribuição similar quanto à idade, cor da pele declarada, índice massa corpórea (IMC), medicações anteriores, excetuando o tempo de uso do MI e tempo de diagnóstico da doença que foram maiores no grupo de respondedores ($p<0,05$) (**Tabela 5**).

Tabela 4. Distribuição da idade, cor de pele, IMC, tempo de tratamento com MI, tratamento prévio com outros medicamentos e tempo de diagnóstico dos pacientes com LMC incluídos no estudo segundo o gênero.

	Respondedor N=70			Não respondedor N= 48		
	Homens N= 34	Mulheres N=36	P valor	Homens N=29	Mulheres N=19	P valor
Idade*	51,4 (±15,6)	47,4 (±15,9)	0,297	53,9 (±11,0)	47,2 (±15,7)	0,092
Cor de pele declarada**						
Branco	27 (79,4%)	29 (80,6%)	0,905	22 (75,9%)	17 (89,5%)	0,223
Não Branco	7 (20,6%)	7 (19,4%)		7 (24,1%)	2 (10,5%)	
IMC*	26,0 (±4,1)	26,2 (±4,6)	0,872	26,1 (±4,8)	27,3 (±4,6)	0,405
Tempo de tratamento com MI (em meses)^{*,a}	50,9 (± 32,5)	54,3 (±35,4)	0,675	31,8 (±26,3)	43,9 (±27,7)	0,136
Tratamento anterior**						
Hidroxiuréia	12 (36,4%)	16 (45,7%)	0,042	8 (27,6%)	4 (21,1%)	0,543
Interferon-α	5 (15,2%)	0 (0%)		1 (3,4%)	1 (5,3%)	
Hidroxiuréia+ Interferon-α	13 (39,4%)	17 (48,6%)		20 (69,0%)	13 (68,4%)	
Nenhum	3 (9,1%)	2 (5,7%)		0 (0%)	1 (5,3%)	
Tempo de diagnóstico da doença	65,4 (±45,2)	70,0 (±48,7)	0,681	92,3 (±47,6)	78,6 (±28,7)	0,267

*As variáveis numéricas estão representadas por média e desvio padrão

**As variáveis categóricas estão representadas por frequência absoluta e relativa entre parenteses.

As comparações foram realizadas entre os gêneros (*teste t de *Student* ou **teste de Qui quadrado)

^aComparação feita entre tempo de uso de MI segundo os gêneros nos grupos respondedores e não respondedores: homens (p=0,013), mulheres (p= 0,267).

^B Comparação feita entre tempo de diagnóstico segundo os gêneros nos grupos respondedores e não respondedores: homens (p=0,025), mulheres (p= 0,418).

Tabela 5. Distribuição da idade, cor de pele, IMC, tempo de tratamento com MI, tratamento prévio com outros medicamentos e tempo de diagnóstico dos pacientes respondedores e não respondedores ao MI

	Total N=118	Respondedor N=70	Não respondedor N= 48	P valor
Idade*	50,1(±14,8)	49,4 (±15,8)	51,2 (±13,4)	0,506
Cor de pele declarada**				0,866
Branco	95 (80,5%)	56 (80,0%)	39 (81,3%)	
Não Branco	23 (19,5%)	14 (20,0%)	9 (18,7%)	
IMC*	26,3 (± 4,53)	26,08 (±4,37)	26,54 (±4,79)	0,583
Tempo de tratamento com MI (em meses)*,a	46,1 (±32,2)	52,7 (±33,9)	36,6 (±27,3)	0,025
Tratamento anterior**				
Hidroxiureia	40 (34,5)	28 (41,2)	12 (25,0)	0,058
Interferon-α	7 (6,0)	5 (7,4)	2 (4,2)	
Hidroxiureia + interferon-α	63 (54,3)	30 (44,1)	33 (68,8)	
Nenhum	6 (5,2)	5 (7,4)	1 (2,1)	
Tempo de diagnóstico da doença	75,53 (±45,5)	67,77 (±46,8)	86,85 (±41,4)	0,025

* Os valores são médias (± desvio-padrão) e ** frequências absolutas e relativas entre parênteses. As comparações foram realizadas entre respondedores e não respondedores (*teste t de *Student* ou **teste de Qui quadrado)

4.2. Resposta ao tratamento com MI

Para a avaliação da resposta ao tratamento com MI foram utilizados os critérios de resposta da *European Leukemianet* (BACCARANI et al., 2009), conforme mostra a **Tabela 6**.

As respostas citogenética, molecular maior e molecular completa foram diferentes entre os pacientes respondedores e não respondedores ($p < 0,050$). Todos os pacientes estavam em resposta hematológica completa.

Tabela 6. Avaliação da resposta ao tratamento ao MI dos pacientes incluídos no estudo segundo critérios da *European Leukemianet*

	Total de Pacientes <i>N=118</i>	Respondedor <i>N=70</i>	Não respondedor <i>N=48</i>	P valor
Resposta Citogenética				
Completa	96 (81,4)	70 (100)	26 (54,2)	<0,001
Maior	1 (0,8)	0 (0)	1 (2,1)	
Parcial	3 (2,5)	0 (0)	3 (6,3)	
Mínima	5 (4,2)	0 (0)	5 (10,4)	
Sem resposta	13 (11,0)	0 (0)	13 (27,1)	
Resposta Hematológica				
Sim	118 (100)	70 (100)	48 (100)	1,000
Resposta Molecular Maior				
Sim	77 (65,3)	58 (82,9)	26 (54,1)	<0,001
Não	41 (34,7)	12 (17,1)	22 (45,9)	
Resposta Molecular Completa				
Sim	18 (15,3)	15 (21,4)	3 (6,3)	0,021
Não	100 (84,7)	55 (78,6)	45 (93,8)	

Os valores são frequências absolutas (relativas).

Resposta molecular maior: número de transcritos BCR-ABL1 $\leq 0,1\%$; Resposta molecular completa: número de transcritos BCR-ABL1 $\leq 0,0032\%$.

O teste de Qui-quadrado foi realizado para a comparação entre as frequências do grupo respondedor e não respondedor.

4.3 Testes de expressão gênica

4.3.1 Escolha do gene endógeno

Foram selecionados, inicialmente, 5 controles endógenos listados na **Tabela 1**. Foi realizada PCR em tempo real, utilizando amostras de pacientes respondedores e não respondedores, para cada um dos cinco genes endógenos escolhidos. A expressão relativa de cada um dos genes foi calculada e, a seguir, estes dados foram inseridos no programa **geNormTM** (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) que gera uma planilha mostrando os genes mais e menos instáveis. Segundo o programa, o gene considerado com menor estabilidade de expressão (M) para as amostras foi o *B2M* (M=0,725), com estabilidade intermediária foram os genes *HMBS* (M=0,672), *SDHA* (M=0,608) e *HPRT1* (M=0,550) e os genes com maior estabilidade foram *GAPDH* (M=0,552) e *UBC* (M=0,528) (**Figura 7**). Tais coeficientes foram considerados adequados para a condução dos experimentos, pois estão dentro do valor de estabilidade de expressão aceitável para matrizes complexas ($M \leq 1$), como o sangue, de acordo com Hellemans e colaboradores (2007). Deste modo, escolhemos o *GAPDH* para ser utilizado como controle interno.

Figura 7. Posição dos genes de referência, como determinado pelo software **GeNormTM**. Os genes foram ordenados de acordo com a estabilidade de expressão na amostra. Da esquerda para a direita estão indicados os genes mais estáveis. *B2M*, beta-2-microglobulina; *HMBS*, hidroximetilbilane sintase; *SDHA*, complexo da succinato desidrogenase, subunidade A; *HPRT1*, hipoxantina fosforibosiltransferase 1; *UBC*, ubiquitina C e *GAPDH*, gliceraldeído-3- fosfato-desidrogenase.

4.3.2 Eficiência

Foram realizados testes de PCR quantitativa (qPCR), onde foram utilizadas diluições seriadas de cDNA (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) a partir de um *pool* de cDNA de pacientes respondedores e não respondedores ao MI. Os dados da concentração de cDNA versus C_T para cada gene originou uma curva padrão, cujo coeficiente angular da reta foi utilizado para o cálculo da eficiência. As eficiências de amplificação foram de 101,4% e 104,2% para os genes *GAPDH* e *ABCG2* respectivamente (**Tabela 7 e Figura 8**).

Tabela 7. Eficiência da reação de PCR quantitativa para os genes estudados

	<i>GAPDH</i>	<i>ABCG2</i>
Coeficiente Angular	-3,228	-3,225
r²	0,971	0,946
Eficiência (%)	101,4	104,2

As eficiências dos ensaios de amplificação foram calculadas utilizando-se a curva padrão obtida da relação entre diferentes concentrações de cDNA e os respectivos valores de ciclo *threshold* (C_T). E a eficiência (E) dos ensaios foi calculada pela fórmula $E=10^{(-1/\text{coeficiente angular})}-1$. A eficiência de cada ensaio foi considerada adequada para valores entre 90 e 110%.

Figura 8. Representação da curva-padrão de qPCR para a medida da expressão de *GAPDH* e *ABCG2*. A eficiência foi estimada pela análise de regressão linear do gráfico obtido pela relação C_T versus concentração de cDNA (ng).

4.3.3 Expressão dos genes *ABCG2* e *SLCO1A2*

4.3.3.1 Comparação da expressão do gene *ABCG2* entre os pacientes com LMC e os indivíduos saudáveis

Foram selecionados 10 indivíduos saudáveis para obtenção da expressão do gene *ABCG2*. A idade média destes indivíduos foi de 48,8 ($\pm 4,8$) e não diferiu da idade média do grupo com LMC ($p \geq 0.05$).

A **Figura 9** mostra as medianas de expressão entre os indivíduos saudáveis e os grupos de respondedor e não respondedor ao MI. As medianas foram diferentes entre os grupos ($P=0,023$). As medianas de expressão do gene *ABCG2* entre os grupos saudável e respondedor foram similares ($P=0,517$) enquanto as medianas de expressão entre o grupo saudável e não respondedor foram diferentes ($P=0,018$).

Figura 9. Expressão gênica de *ABCG2* entre os indivíduos saudáveis, respondedores e não respondedores a dose padrão de 400mg/dia de MI.

A expressão do mRNA foi medida por qPCR e normalizada com o gene de referência *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. As medianas dos grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney. Controle versus respondedor ($P=0,517$), Controle versus Não Respondedor (**$P=0,018$**).

4.3.3.2. Comparação da expressão do gene *ABCG2* nos grupos de respondedores e não respondedores a dose padrão de MI

A **Figura 10** mostra a expressão do gene *ABCG2* em respondedores e não respondedores ao MI. A expressão do gene *ABCG2* foi diferente entre os grupos de resposta ao MI apresentando-se maior no grupo de não respondedores ($P = 0,028$, **Tabela 8**). O número de transcritos *BCR-ABL1* foi menor no grupo de respondedores ($P < 0,001$, **Tabela 8**)

Figura 10. Expressão gênica de *ABCG2* entre os respondedores e não respondedores a dose padrão de 400mg/dia de MI.

A expressão do mRNA foi medida por qPCR e normalizada com o gene de referência *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. As medianas dos grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney.

Tabela 8. Expressão gênica de *ABCG2* e número de transcritos *BCR-ABL1* entre os grupos de resposta a dose padrão de MI.

Expressão do RNAm	Respondedor (N= 70)	Não respondedor (N=48)	P valor*
	Mediana (P25-P75)	Mediana (P25-P75)	
Gene <i>ABCG2</i>	0,0018 (0,0011- 0,0052)	0,0036 (0,0016-0,0056)	0,028
Número de transcritos <i>BCR-ABL1</i>	0,0141(0,0029-0,0695)	0,1745 (0,0338-2,6975)	<0,001

Os valores apresentados são medianas (percentil 25 e 75%). * teste Mann- Whitney.

4.3.3.3 Expressão do gene *ABCG2* nos grupos com resistência primária e resistência secundária

Os grupos com resistência primária e secundária foram comparados com grupo de respondedores ao MI frente à expressão do gene *ABCG2*. Os pacientes com resistência primária apresentaram mediana de expressão maior do que a mediana de expressão dos respondedores ao MI ($P=0,029$, **Figura 11**, **Tabela 9**). Já a mediana de expressão dos pacientes com resistência secundária não diferiu da mediana de expressão dos respondedores ao MI (**Figura 12**).

Figura 11. Expressão gênica de *ABCG2* entre os respondedores e não respondedores com resistência primária ao MI.

A expressão do mRNA foi medida por qPCR e normalizada com o gene de referência *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. As medianas dos grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney.

Figura 12. Expressão gênica de *ABCG2* entre os respondedores e não respondedores com resistência secundária ao MI

A expressão do mRNA foi medida por qPCR e normalizada com o gene de referência *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. As medianas dos grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney.

Tabela 9. Expressão gênica de *ABCG2* entre os grupos de respondedor, resistência primária e resistência secundária ao MI.

Grupos	Mediana (P25-P75)
Respondedor N= 70	0,0018 (0,0011- 0,0052)
Resistência Primária N=34	0,0037 (0,0017-0,0053)
Resistencia Secundária N=34	0,0027 (0,0016-0,0059)

Comparação entre grupo respondedor *versus* resistência primária (P=0,028). Comparação entre grupo respondedor e resistência secundária (P=0,242). *Teste Mann-Whitney.

4.3.3.4 Expressão do gene *ABCG2* nos grupos com resposta molecular maior (RMM)

A distribuição dos valores da expressão do gene *ABCG2* no grupo total e também nos pacientes respondedores e não respondedores, segundo a RMM, está apresentada na **Figura 13**.

A expressão do gene *ABCG2* foi diferente na comparação entre pacientes com e sem RMM no grupo total de pacientes (**Figura 13a**) sendo maior a expressão gênica em pacientes sem RMM ($P=0,027$). Porém, não houve diferença na expressão quando o grupo total foi subdividido em respondedores e não respondedores (**Figuras 13b e 13c**).

Figura 13. Expressão gênica de *ABCG2* em pacientes com resposta molecular maior (RMM).

A expressão foi medida por PCRq e normalizada com o gene de referência GAPDH. Valores de expressão calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Valores de p calculados com o teste Mann-Whitney. A resposta molecular maior é dada quando o número de transcritos *BCR/ABL1* está abaixo de 0,1%.

4.3.3.5 Análise da expressão gênica do gene *ABCG2* segundo a resposta molecular completa (RMC)

Não houve diferença significativa nas taxas de expressão do gene *ABCG2*, em pacientes com ou sem RMC no grupo total, grupo de respondedor e não respondedor à dose padrão de MI (**Figura 14**).

Figura 14. Expressão gênica de *ABCG2* em pacientes com resposta molecular completa (RMC).

A expressão foi medida por PCRq e normalizada com o gene de referência GAPDH. Valores de expressão calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Valores de p calculados com o teste Mann-Whitney. A resposta molecular completa é dada quando o número de transcritos *BCR/ABL1* está abaixo de 0,0032%.

4.3.3.6 Correlação entre a expressão de *ABCG2* e o número de transcritos *BCR-ABL1*

A correlação entre a expressão de *ABCG2* e o número de transcritos *BCR-ABL1* foi realizada no grupo de respondedores e não respondedores.

Nestas análises foram excluídos 7 pacientes que tinham número de transcritos $\geq 8,0\%$ (*outliers*). Seis destes pacientes apresentavam resposta citogenética mínima e um não apresentava resposta citogenética.

Não houve correlação entre o número de transcritos e a expressão do gene *ABCG2* ($r=0,01$; $N= 70$, $P=0,990$) no grupo de respondedores. Porém, houve correlação significativa entre o número de transcritos e a expressão do referido gene no grupo de não respondedores ($r=0,35$; $N= 41$, $P=0,028$).

4.3.3.7 Expressão gênica de *SLCO1A2*

A princípio não foi possível a expressão deste gene nas amostras. Para verificar a funcionalidade do ensaio a expressão de *SLCO1A2* foi testada em linhagem celular de glioma A172. O gene foi expresso nesta linhagem e posteriormente foi testado a expressão gênica de *SLCO1A2* em células mononucleares (a partir de 500ng de RNA) e em cDNA de leucócito total (a partir 1000ng de RNA) para verificar se o tipo celular ou a concentração estavam inviabilizando a análise.

Verificou-se que não houve expressão em células mononucleares (500ng de RNA) e houve expressão de *SLCO1A2* em leucócitos totais de pacientes a partir de 1000ng de RNA, porém esta expressão foi baixa.

Portanto a concentração de RNA foi um fator limitante para a análise da expressão deste gene nas amostras obtidas para este projeto não sendo possível avaliar a expressão de *SLCO1A2*.

4.4. Análises dos polimorfismos do gene ABCG2

4.4.1. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos no gene ABCG2

A distribuição dos genótipos e de alelos dos polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A, no gene *ABCG2* nos indivíduos com LMC e dos controles estudados está apresentada na **Tabela 10**. Foram observadas as seguintes frequências de alelos mutados nos pacientes com LMC, 421A= 8,5% e 19-99T=27,4% e nos controles saudáveis 421A= 7,5% e 19-99T= 24,2%.

A distribuição dos genótipos (dos pacientes com LMC e dos controles) está em equilíbrio Hardy Weinberg. Não houve diferença significativa entre as frequências dos genótipos e de alelos no grupo de pacientes com LMC e nos controles ($p>0,050$) para os dois polimorfismos estudados. Também não foi observada diferença na distribuição dos genótipos segundo o gênero para ambos os grupos ($p>0,050$).

Tabela 10- Distribuição de genótipos e de alelos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene *ABCG2* entre pacientes com LMC e controles saudáveis.

Polimorfismos	LMC N=117	Controles N=120	P valor
ABCG2 c.421C>A			
CC	98 (83,8)	102 (85,0)	0,594
CA	18(15,4)	18 (15,0)	
AA	1(0,8)	0 (0)	
Frequencia alélica			
C	214 (91,5)	222 (92,5)	0,791
A	19 (8,5)	18 (7,5)	
ABCG2 c.-19-99 G>A			
GG	67 (57,3)	68 (56,7)	0,106
GA	36 (30,8)	46 (38,3)	
AA	14 (11,9)	6 (5,0)	
Frequencia alélica			
G	170 (72,6)	182 (75,8)	0,428
A	64 (27,4)	58 (24,2)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa).

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio Hardy Weinberg nos dois grupos.

Pelo fato de haver apenas 1 paciente com LMC portador de genótipo AA para o polimorfismo c. 421C>A e nenhum paciente do grupo controle com este genótipo, foi decidido agrupar os indivíduos portadores do alelo A (genótipos CA + AA) para o cálculo de risco de ter LMC. A presença do alelo A para o referido polimorfismo não foi associado ao risco de ter LMC (OR: 1,10 e IC95%: 0,55 – 2,22, P= 0,793).

Para o polimorfismo ABCG2 c.-19-99 G>A, o agrupamento foi realizado utilizando o alelo ancestral, ou seja, os genótipos GG e GA foram agrupados. Desse modo, foi calculado o risco que os portadores de genótipo AA ter LMC quando comparado aos portadores de genótipos GG + GA (considerados como referência) na regressão logística. Houve tendência (P=0,061) ao maior risco de ter LMC em portadores de genótipo AA (OR: 2,58, IC 95% 0,96 – 6,97) quando comparados aos portadores de genótipos GG + GA.

4.4.2 Associação entre os polimorfismos e a resposta MI

Para análise do efeito dos polimorfismos genéticos estudados na resposta ao MI, os genótipos que apresentavam o alelo mutado foram agrupados. Não foi observada associação entre os polimorfismos estudados e a resposta ao MI ($p>0,050$) nos grupos respondedores e não respondedores ao MI (**Tabela 11**).

Tabela 11 – Frequência de genótipos e de alelos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene ABCG2 em pacientes respondedores e não respondedores ao MI.

Genótipos	Respondedor N=69	Não Respondedor N=48	P valor
ABCG2 c.421C>A			
CC	58 (84,1)	41 (83,7)	0,955
CA+AA	11 (15,9)	8 (16,7)	
ABCG2 c.-19-99 G>A			
GG	43 (62,3)	24 (49,0)	0,150
GA+AA	26 (37,7)	25 (51,0)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa).

O teste Qui-quadrado foi usado para comparar as frequências dos genótipos nos pacientes respondedores e não respondedores

4.4.3 Associação entre os polimorfismos e a resposta molecular maior e resposta molecular completa

Os polimorfismos estudados não foram associados com a resposta molecular maior (**Tabela 12**). Já para a resposta molecular completa (**Tabela 12**), houve maior frequência do genótipo -19-99GG (82,4%) nos pacientes com RMC ($P=0,018$). Houve tendência de maior frequência (84,6%) dos genótipos homozigoto ancestral para o polimorfismo c.-19-99 G>A nos indivíduos alcançaram a RMC no grupo de respondedores (**Tabela 14**) ($P=0,057$).

Quanto ao polimorfismo c. 421C>A, quando foi dividido o grupo total de pacientes com LMC em respondedor e não respondedor, todos os indivíduos com RMC no grupo de respondedores eram portadores do genótipo 421GG (**Tabela 14** $P=0,025$).

Tabela 12. – Frequência de genótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene *ABCG2* segundo a resposta molecular maior e resposta molecular completa no grupo total de pacientes com LMC.

Genótipos	Com RMM (N= 76)	Sem RMM (N=41)	P valor*	Com RMC (N= 17)	Sem RMC (N=100)	P valor*
ABCG2 c.421C>A						
CC	66 (86,8)	32 (78,0)	0,226	16 (94,1)	82 (82,0)	0,210
CA+AA	10 (13,2)	9 (22,0)		1 (5,9)	18 (18,0)	
ABCG2 c.-19-99G>A						
GG	46 (60,5)	21 (51,2)	0,332	14 (82,4)	53 (53,0)	0,018
GA+AA	30 (39,5)	20 (48,8)		3 (17,6)	47 (47,0)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa). *Likelihood Ratio*.

Resposta molecular maior = transcritos *BCR-ABL1* $\leq 0,1\%$

Resposta molecular completa (RMC) = transcritos *BCR-ABL1* $\leq 0,0032\%$

Tabela 13 – Frequência de genótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene *ABCG2* segundo a resposta molecular maior nos pacientes respondedores e não respondedores ao MI.

Genótipos	Respondedor		P valor	Não respondedor		P valor
	Com RMM	Sem RMM		Com RMM	Sem RMM	
	N=57	N=12		N=19	N=29	
ABCG2 c.421C>A						
CC	49 (86,0)	9 (75,0)	0,369*	17 (89,5)	23 (79,3)	0,343*
CA+AA	8 (14,0)	3 (25,0)		2 (10,5)	6 (20,7)	
ABCG2 c.-19-99G>A						
GG	36 (63,2)	7 (58,3)	0,755*	10 (52,6)	14 (48,3)	0,768**
GA+AA	21 (36,8)	5 (41,7)		9 (47,4)	15 (51,7)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa)

*Likelihood Ratio** e Qui-Quadrado**

Resposta molecular maior = transcritos *BCR-ABL1* $\leq 0,1\%$

Tabela 14 – Frequência de genótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene *ABCG2* segundo a resposta molecular completa nos pacientes respondedores e não respondedores ao MI.

	<i>Respondedor</i>		<i>P valor</i>	<i>Não respondedor</i>		<i>P valor</i>
Genótipos	Com RMC	Sem RMC		Com RMC	Sem RMC	
	N=13	N=56		N=4	N=44	
ABCG2 c.421C>A						
CC	13 (100,0)	45 (80,4)	0,025**	3 (75,0)	37 (84,1)	0,640*
CA+AA	0 (0,0%)	11 (19,6)		1 (25,0)	7 (15,9)	
ABCG2 c.-19-99G>A						
GG	11 (84,6)	32 (57,1)	0,052**	3 (75,0)	21 (47,7)	0,296*
GA+AA	2 (15,4)	24 (42,9)		1 (25,0)	23 (52,3)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa)

Teste do Qui quadrado* ou *Likelihood Ratio***

Resposta molecular completa (RMC) = transcritos *BCR-ABL1* $\leq 0,0032\%$

4.4.4 Análise dos haplótipos

Não houve diferença na distribuição dos haplótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene *ABCG2* entre o grupo de respondedores e não respondedores (**Tabela 15**). O mesmo aconteceu quando os haplótipos foram analisados segundo a resposta molecular maior (**Tabela 16**). No entanto, quando os haplótipos foram analisados frente à resposta molecular completa houve maior frequência (84,6%) do haplótipo com genótipos ancestrais (CC e GG para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene *ABCG2*) nos pacientes com RMC no grupo de respondedores (**Tabela 17**, $P=0,041$).

Tabela 15. Frequência dos haplótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene *ABCG2* em pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento com MI.

<i>Haplótipo</i>	<i>Respondedor</i>	<i>Não respondedor</i>	<i>P valor*</i>
c.421C>A e c.-19-99G>A			
CC e GG	37 (53,6)	19 (39,6)	0,438
CC e GA	15 (21,7)	13 (27,1)	
CC e AA	6 (8,7)	8 (16,7)	
CA e GG	6 (8,7)	4 (8,3)	
AA e GG	0 (0)	1 (2,1)	
CA e GA	5 (7,2)	3 (6,3)	
Total	69 (100,0)	48 (100,0)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa). * *Likelihood ratio*

Tabela 16. Frequência dos haplótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene *ABCG2* em pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento com MI segundo a resposta molecular maior (RMM).

	<i>Respondedor</i>		<i>P valor*</i>	<i>Não respondedor</i>		<i>P valor*</i>
Haplótipos	Com RMM	Sem RMM		Com RMM	Sem RMM	
c.421C>A e c.-19-99G>A						
CCGG	31 (54,4)	6 (50,0%)	0,802	8 (42,1)	11 (37,9)	0,464
CCGA	13 (22,8)	2 (16,7%)		5 (26,3)	8 (27,6)	
CCAA	5 (8,8)	1 (8,3%)		4 (21,1)	4 (13,8)	
CAGG	5 (8,8)	1 (8,3%)		2 (10,5)	2 (6,9)	
AAGG	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (3,4)	
CAGA	3 (5,3)	2 (16,7%)		0 (0)	3 (10,3)	
Total	57 (100,0)	12 (100,0)		19 (100,0)	29 (100,0)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa). * *Likelihood ratio*
Resposta molecular maior (RMM) = transcritos *BCR-ABL1* $\leq 0,1\%$

Tabela 17. Frequência dos haplótipos para os polimorfismos c.421C>A e c.-19-99 G>A no gene *ABCG2* em pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento com MI segundo a resposta molecular completa.

Haplótipos	Respondedor			Não respondedor		
	Com RMC	Sem RMC	P valor*	Com RMC	Sem RMC	P valor*
c.421C>A e c.-19-99G>A						
CC e GG	11 (84,6)	26 (46,4)	0,041	2 (50,0)	17 (38,6)	0,518
CC e GA	2 (15,4)	13 (23,2)		0 (0)	13 (29,5)	
CC e AA	0 (0)	6 (10,7)		1 (25,0)	7 (15,9)	
CA e GG	0 (0)	6 (10,7)		1 (25,0)	3 (6,8)	
AA e GG	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (2,3)	
CA e GA	0 (0)	5 (8,9)		0 (0)	3 (6,8)	
Total	13 (100,0)	56 (100,0)		4 (100,0)	44 (100,0)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa)

* *Likelihood ratio*. Resposta molecular completa = transcritos *BCR-ABL1* $\leq 0,0032\%$

4.4.5 Efeito dos polimorfismos na expressão do gene *ABCG2*

Não houve diferença entre as medianas da expressão do gene *ABCG2* segundo os genótipos (CC versus CA + AA para o polimorfismo *ABCG2* c.421C>A) no grupo total, no grupo de respondedores e de não respondedores ao MI (**Figuras 15 e 16**).

Figura 15. Expressão gênica segundo os genótipos do polimorfismo c.421C>A nos grupos total, de respondedores e não respondedores ao MI.

A expressão foi medida por PCRq e normalizada com o gene de referência GAPDH.

Valores de expressão calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Valores de p calculados com o teste Mann-Whitney.

Figura 16. Expressão gênica segundo os genótipos do polimorfismo c.-19-99G>A nos grupos total, de respondedores e não respondedores ao MI.

A expressão foi medida por PCRq e normalizada com o gene de referência GAPDH. Valores de expressão calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Valores de p calculados com o teste Mann-Whitney.

5. DISCUSSÃO

Com o desenvolvimento dos inibidores da tirosinoquinase, há mais de uma década, houve importante revolução no tratamento da leucemia mieloide crônica. O MI mudou a história natural da doença dos pacientes com LMC, que iam a óbito no prazo de cinco a seis anos após o diagnóstico.

Segundo AGRAWAL e colaboradores (2010), o impacto do MI no tratamento da LMC foi tão grande que muitos pacientes nunca irão desenvolver a fase acelerada ou crise blástica em suas vidas. Os autores citam que, pela primeira vez, é possível que muitos pacientes venham a óbito por outras causas, diferente da LMC.

Apesar desta notável conquista, cerca de 20% a 30% dos pacientes com LMC que fazem uso do MI não respondem à terapia padrão (400 mg/dia) e um número substancial destes casos de resistência não tem causa conhecida (DEINEINGER, 2009; YONG e MELO, 2009).

Dentre os fatores associados à resistência ao MI estão as alterações nos transportadores de membrana de influxo e efluxo (APPERLEY, 2007). No entanto, até a presente data, o papel destes transportadores de membrana continua incerto. Tem sido sugerido que estas proteínas, tanto de influxo quanto de efluxo, tem papel protetor em células tronco normais e tumorais contra agentes tóxicos (STAVROVSKAYA, STROMSKAYA, 2008).

Desde que a expressão aumentada de ABCG2 em células cancerígenas mostrou conferir fenótipo resistente a diversas drogas, vários estudos se dedicaram determinar o papel deste gene na resistência ao tratamento para o câncer (ROBBEY et al., 2009). Um dos primeiros *in vivo* estudos sugeriu que ABCG2 pode ter papel na resistência ao tratamento para leucemia aguda (ROSS et al., 2000).

O envolvimento de vários transportadores humanos na farmacocinética do MI torna difícil a investigação dos mecanismos de transporte deste fármaco. No entanto, dentre os diversos transportadores de membrana, o ABCG2 tem papel importante no efluxo deste fármaco (TAKAHASHI e MIURA, 2011).

Alguns estudos *in vitro* mostraram que alterações na expressão dos genes ABCG2 e SLCO1A2 poderiam estar relacionadas com a resistência ao tratamento

com MI (MAHON et al, 2003, BURGUER et al, 2004; NAKANISH et al 2006, HU et al 2008).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar se a expressão gênica dos transportadores de membrana *ABCG2* e *SLCO1A2* poderiam influenciar na resposta ao MI.

5.1. Estudos de expressão gênica

Nos últimos anos, diferentes métodos (PCR em tempo real e microarranjo de DNA) têm sido utilizados para determinar quais genes de transportadores da família ABC estão envolvidos na resistência a múltiplas drogas (ANNEREAU et al., 2004; SZAKACS et al., 2004). Estes estudos tiveram como objetivos avaliar a relação entre a expressão de diversas proteínas ABC, entre elas *ABCG2*, e a diminuição da sensibilidade das células a agentes citostáticos.

No presente estudo, todos os pacientes estavam na fase crônica da doença e foi constatado que o aumento da expressão de *ABCG2* está associado à resistência ao MI. Estes dados corroboram com os achados obtidos em vários estudos realizados *in vitro* (BURGER et al., 2004; BURGUER et al., 2005 e DOHSE et al., 2010). Foi observado que células MCF7/MR que superexpressam o *ABCG2* possuíam menor concentração de MI. Este evento foi revertido quando o *ABCG2* foi bloqueado pelo inibidor específico Ko-143, restaurando a concentração de MI nestas células (BURGER et al., 2004). Outro estudo deste mesmo grupo, mostrou que a exposição em longo prazo do MI em células Caco-2, pode aumentar a expressão gênica e protéica de *ABCB1* e *ABCG2*, diminuindo a concentração intracelular de MI (BURGUER et al., 2005). Estudo com outro tipo celular (K562), transfectadas e que superexpressam *ABCG2* e *ABCB1*, exibiram resistência ao tratamento com MI em dose clinicamente viável, sugerindo que a função destes transportadores de membrana está associada à resistência ao MI (DOHSE et al., 2010).

Outro estudo *in vivo* mostrou em pacientes com LMC em fase acelerada tratados com MI, que após 6 meses de terapia, apresentaram aumento da expressão de várias proteínas como: *ABCB1*, *MRP1*, *ABCG2* e *LRP* em células de sangue periférico (STAVROVSKAYA et al., 2008).

Frente a estes achados, não fica claro se o aumento da expressão do *ABCG2* é devido a regulação mediada por *BCR-ABL1* tal como foi sugerido pelo estudo de Burguer e colaboradores (2004) ou devido à exposição crônica ao MI tal como mostrado nos estudos de Burguer e colaboradores (2005) e de Stavrovskaya e colaboradores (2008).

No presente estudo, o aumento da expressão do *ABCG2* em pacientes não respondedores foi influenciado por pacientes com resistência primária, mas não secundária. Ademais, foi observado que pacientes sem RMM apresentaram maior mediana de expressão do gene *ABCG2*. Além disso, foi observada ausência de associação entre a expressão do gene *ABCG2* com o tempo de doença e o tempo de uso do MI. Portanto, estes dados sugerem que o aumento da expressão desta bomba de efluxo poderia propiciar menor concentração intracelular de MI resultando em menor efetividade da terapia. Um fator limitante deste trabalho foi não ter realizado a dosagem plasmática do MI. Estudos futuros que determinem a concentração do fármaco e que avaliem os transportadores de membrana em pacientes com LMC são necessários para validar os achados de nosso estudo.

Outro dado interessante descrito na literatura foi que o gene de fusão *BCR-ABL1* regula a expressão de *ABCG2* (NAKANISHI et al., 2006). Foi demonstrado que células-tronco hematopoéticas de pacientes com LMC recém-diagnosticados apresentaram maior expressão de *ABCG2* quando comparada com a expressão de células tronco hematopoéticas normais (JORDANIDES et al., 2006). No nosso estudo foi observada correlação significativa entre a expressão de *ABCG2* e o número de transcritos *BCR-ABL1* ($r = 0,35$, $P = 0,028$) em pacientes não respondedores. Esta correlação não foi observada nos pacientes respondedores. Isto poderia ser explicado pelo fato dos pacientes respondedores estarem em RCC e apresentarem menor número de transcritos *BCR-ABL1* do que os pacientes não respondedores ($P < 0,001$). Considerando que não houve diferença na expressão de *ABCG2* no grupo de respondedores e nos indivíduos saudáveis, este dado sugere que o MI não induz o aumento da expressão da *ABCG2*.

No entanto, alguns estudos *in vivo* não encontraram associação entre a expressão gênica de *ABCG2* e a falha na resposta ao MI (CROSSMAN et al., 2005; NARDINELLI, 2008; WANG et al., 2008).

Crossman e colaboradores (2005) observaram em pacientes com LMC em fase crônica e blástica, que não houve diferença na expressão de *ABCG2* e de *ABCB1* em indivíduos respondedores e não respondedores ao MI. Um estudo brasileiro com pacientes em fase crônica da LMC na fase de pré-tratamento também mostrou que, a resistência ao MI e a resposta citogenética não foram associadas à expressão dos genes *ABCB1* e *ABCG2* em leucócitos totais (NARDINELLI, 2008). Outro estudo conduzido em pacientes com LMC na fase de pré-tratamento e também na quarta semana, 3 e 6 meses após início com MI mostrou que a expressão dos genes *hOCT1* (influxo) e de *ABCB1*, *ABCC1* e *ABCG2* (efluxo) não foi associada com a resposta ao MI nas fases de pré e pós-tratamento (WANG et al., 2008).

Outros fatores limitantes deste estudo foram a baixa concentração do RNA obtido que impossibilitou a análise da expressão gênica de *SLCO1A2* e a ausência de amostras dos pacientes na fase pré-tratamento o que definiria se o aumento da expressão do *ABCG2* é devido a regulação mediada por *BCR-ABL1* ou à exposição crônica ao MI. Apesar destas limitações, fica claro o papel do gene *ABCG2* na resistência ao MI.

5.2 Estudos farmacogenéticos

Em revisão realizada por Dulucq e Krajinovic (2010) diversos polimorfismos genéticos foram apontados como marcadores que podem ser utilizados para melhorar o tratamento e a gestão de doenças para as quais o MI é usado. Dentre estes marcadores está o polimorfismo no gene *ABCG2* c.421C>A.

As frequências do alelo mutado foram semelhantes nos pacientes com LMC e nos indivíduos saudáveis, não estando associados à LMC. Estas frequências foram similares ($P>0,05$) às observadas em populações caucasianas (KOBAYASHI et al., 2005) suecos (BACKSTROM et al., 2003) europeus e americanos (JONG et al., 2004). Porém foi menor do que a frequência encontrada em asiáticos (IMAI et al., 2002) e maior do que a encontrada em africanos *sub-Saharan* (JONG et al., 2004,) ($P<0,001$).

Não há consenso na literatura sobre o papel do polimorfismo *ABCG2* c.421C>A na manutenção da concentração intracelular do MI em pacientes com

LMC. Foi observado que pacientes japoneses portadores do genótipo 421CA + 421AA necessitam de ajuste de dose maior de MI que os pacientes 421CC para manter a concentração plasmática deste fármaco a 1000 ng/mL (TAKAHASHI et al., 2010). Porém não houve associação destes polimorfismos com a RMM nos pacientes que tomavam a dose padrão de 400mg/dia de MI e também naqueles que foram escalonados para outras doses. Este último dado corrobora com os dados encontrados no presente estudo, uma vez que não foi encontrada associação entre os genótipos para o polimorfismo c. 421C>A e a RMM no grupo total e, no grupo de respondedores e não respondedores ao MI quando analisados separadamente.

Em contraste, Kim e colaboradores (2009) mostraram que pacientes com LMC portadores de genótipos 421CC + 421CA apresentaram menor frequência RMM e RMC quando comparados com pacientes do genótipo 421AA. Adicionalmente, encontraram maior frequência de indivíduos com escalonamento de dose para o genótipo CC. Nosso estudo mostrou maior frequência do genótipo 421CC em pacientes respondedores com RMC quando comparado com respondedores sem RMC ($P=0,025$). Quando o grupo total foi analisado, este resultado não se manteve.

Foi observado em alguns estudos em cultura de célula (YANASE, et al., 2006) e em células de voluntários japoneses (IMAI, et al., 2002) que a expressão proteica de *ABCG2* está diminuída na presença da variante C421A. Diferentemente, outro estudo não encontrou diferença significativa entre 421A e a expressão proteica de *ABCG2* em células de amostras intestinais humanas (ZAMBER et al., 2003).

Embora Imai e colaboradores (2002) tenham encontrado tal diferença na expressão proteica, a expressão gênica de *ABCG2* foi similar entre portadores do genótipo 421CA+421AA e 421CC, inferindo uma modificação pós-transcricional. Outro grupo também não encontrou diferença na expressão gênica de *ABCG2* em células de doadores saudáveis com genótipo 421CA e 421CC (POONKUZHALI et al., 2008). Estes dados de expressão gênica corroboram com os resultados deste estudo que não encontrou associação entre a expressão do gene *ABCG2* e os genótipos do polimorfismo c.421C>A.

Em adição, no presente este estudo, o alelo 421A não foi associado ao risco de ter LMC.

Ao nosso conhecimento, não há estudos na literatura que tenham associado o efeito do polimorfismo c. -19-99G>A na LMC. Como dado inédito, o presente estudo demonstrou que portadores do genótipo -19-99AA apresentaram tendência ao risco de ter LMC. Quanto à resposta ao MI não houve associação com o fato de ser respondedor ou não, mas houve tendência a maior frequência (84,6%) dos portadores do genótipo -19-99GG total com RMC e no grupo de respondedores com RMC.

O polimorfismo c.-19-99G>A também não foi associado à expressão do gene ABCG2.

Os resultados de análise haplotípica mostraram que o haplótipo ancestral 421CC/-19-99GG foi associado à RMC no grupo de pacientes que tomava a dose padrão de MI.

6. CONCLUSÃO

- Os pacientes não respondedores a dose padrão do MI apresentaram maior expressão de ABCG2
- Os pacientes sem RMM apresentaram maior expressão de ABCG2 quando comparados com aqueles tinham RMM no grupo total de pacientes. Porém este achado não foi confirmado quando os grupos de resposta foram analisados separadamente.
- Não houve diferença entre a expressão gênica de ABCG2 e a RMC.
- Não foi possível fazer a análise da expressão gênica de SLCO1A2.
- A expressão do gene ABCG2 não foi influenciada pelos polimorfismos c.421C>a e -19-99G>A. Mas portadores do genótipo 421CC impactaram na resposta molecular completa de modo positivo.
- No grupo de respondedores que tomavam a dose padrão de MI com RMC houve maior frequência de pacientes com o haplótipo 421CC/-19-99GG quando comparado com o grupo de respondedores sem RMC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVANI ,A ,S; PENDERGAST, A, M. *Bcr-Abl* variants: biological and clinical aspects. **Leuk Res.** 26:713-720, 2002.

AGRAWAL, M; GARG R, J; CORTES, J; QUINTÁS-CARDAMA, A. Tyrosine Kinase Inhibitors: The First Decade. **Curr Hematol Malig Rep**, 5:70–80, 2010.

ANNEREAU, J. P., SZAKACS, G., TUCKER, C. J., ARCIELLO, A., CARDARELLI, C., COLLINS, J., GRISSOM, S., ZEEBERG, B. R., REINHOLD, W., WEINSTEIN, J. N., POMMIER, Y., PAULES, R. S., AND GOTTESMAN, M. M. Analysis of ATP-Binding Cassette Transporter Expression in Drug-Selected Cell Lines by a Microarray Dedicated to Multidrug Resistance. **Mol. Pharmacol.**, 66, 1397- 1405, 2004.

APPERLEY, J, F. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **Lancet Oncol**; 8: 1018–29, 2007

BACCARANI, M., CORTES J., PANE F. et al. Chronic myeloid leukemia: na update os concepts and management reccommendations of European LeukemiaNet **Journal of Clinical Oncology** 27:6041-6052, 2009

BACCARANI, M., SAGLIO, G., et al.. Envolving concepts i the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v.1 n.8 , p.1809-20, 2006.

BACKSTROM, G; TAIPALENSUU, J; MELHUS, H; BRANDSTROM, H; SVENSSON, A, C; ARTURSSON, P. Genetic variation in the ATP-binding cassette transporter gene ABCG2 (BCRP) in a Swedish population, **Eur. J. Pharm. Sci.** 18:359–364, 2003.

BAIN J.B. An overview of translocation-related oncogenesis in the chronic myeloid leukemias. **Acta Haematologica** 107:57-63, 2002.

BENDE, G; KOLLIPARA, S; MOVVA, S; MOORTHY, G; SAHA, R. Validation of an HPLC Method for Determination of Imatinib Mesylate in Rat Serum and Its

Application in a Pharmacokinetic Study. **Journal of Chromatographic Science**. 48: 334-341, 2010.

BIXBY, D; TALPAZ, M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. **Hematology** 1: 461-476, 2009.

BORTOLHEIRO TC. Avaliação de fatores prognósticos e das respostas hematológica, citogenética e molecular em pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com mesilato de imatinibe. Tese de mestrado, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 2007.

BORTOLHEIRO, T, C; CHIATTONE, C, S. Leucemia Mieloide Crônica: história natural e classificação. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**;3:3-7, 2008.

BRANFORD S: Chronic myeloid leukemia: molecular monitoring in clinical practice. **Hematology Am Soc Hematol**. 376–383, 2007.

BRONGER H, KONIG J, KOPLOW K, STEINER, H; AHMADI, R; HEROLD-MENDE,C; KEPPLER, D; NIES, A, T. ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. **Cancer Res**;65 (24) 11419–11428, 2005.

BURGER H, VAN TOL H, BOERSMA AWM, BROK M, WIEMER EAC, STOTER G, NOOTER K. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. **Blood**, 104:2940-2, 2004.

BURGER H, VAN TOL H, BROK M, ERIK A. C. WIEMER, E, A, C; BRUIJN E, A; GUETENS, G ; BOECK, G; SPARREBOOM, A; VERWEIJ, J; NOOTER, K. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. **Cancer Biol Ther** , 4: 747–52, 2005.

BURGER H., NOOTER K. Pharmacokinetic resistance to imatinib mesylate> role of ABC drug pumps ABCG2 and ABCB1 in the oral bioavailability of imatinib. **Cell Cycle** 3: 1502-1505, 2004.

CAMPOS, M, G, V; ARANTES, A, M; OLIVEIRA, J, S, R; CHAUFFAILLE, M, L, L, F. Chronic myeloid leukemia: A disease of youth in Brazil. **Leukemia Research**. 34: 542–544, 2010.

CORTES J, E; TALPAZ, M; O'BRIEN, S; FADERI, S; GARCIA-MANERO, G; FERRAJOLI, A. Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era. An evaluation of the World Health Organization proposal. **Cancer**. 106(6):1306-15, 2006.

CORTES J.E, TALPAZ M., KANTARJIAN H. Chronic myelogenous leukemia: a review. **American Journal of Medicine** 100:555-570,1996

CROSSMAN,L,C; DRUKER, B,J; DEININGER,M, W, N; PIRMOHAMED,M; WANG, L; CLARK, R, E. hOCT 1 and resistance to imatinib. **Blood**. 106: 1133-1134, 2005.

KOBAYASHI, D, IEIRI, I; HIROTA, T; TAKANE, H; MAEGAWA, S; KIGAWA, J; SUZUKI, H; NANBA, E; OSHIMURA, M; TERAOKA N; OTSUBO, K; MINE, K; SUGIYAMA, Y. Functional assessment of abcg2 (bcrp) gene polymorphisms to protein expression in human placenta, *Drug Metab. Dispos.* 33:94–101, 2005.

DE JONG, F, A; MARSH, S; MATHIJSEN, R, H; KING,C; VERWEIJ, J; SPARREBOOM, A. ABCG2 pharmacogenetics: ethnic differences in allele frequency and assessment of influence on irinotecan disposition, **Clin. Cancer Res**. 10:5889–5894, 2004.

DEININGER M.W, O'BRIEN S.G, GUILHOT F., et al. International randomized study of interferon vs STI571 (IRIS) 8-year follow-up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. **Blood** 114:1126, 2009.

DEININGER M W N, GOLDMAN JM, MELO J, V. the molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**. 96: 3343-56, 2000.

DIAMOND, J, M; MELO, J, V. Mechanisms of resistance to BCR–ABL kinase inhibitors. *Leukemia & Lymphoma*. 52(S1): 12–22, 2011.

DOBBIN, J, A; GADELHA, M, I, P. Mesilato de Imatinibe para Tratamento da Leucemia Mieloide Crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 48(3): 429-438, 2002.

DOHSE, M; SCHARENBER G, C; SHUKLA, S; ROBEY, R, W; VOLKMANN, T; DEEKEN, J, F; BRENDDEL, C; AMBUDKAR, S, V; NEUBAUER, A; BATES, S, E. Comparison of ATP-Binding Cassette Transporter Interactions with the Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib. **Drug Metabolism and Disposition**, 38:1371–1380, 2010.

DRUKER B.J., GUILHOT F., O'BRIEN S., GATHMANN I., KANTARJIAN H., GATTERMANN N., DEINIGER M.W.N Five-Year Follow up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia **The New England Journal of Medicine** 355(23) :2408-2417,2006.

DRUKER B.J., LYDON N.B., Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **Journal of Clinical Investigation** 105(1):3-7, 2000.

DULUCQ, S e KRAJINOVIC, M. The pharmacogenetics of imanitib. **Genome Medicine**. 2:85, 2010

EIRING, A, M;KHORASHAD, J, S; MORLEY, K; DEININGER, M, W. Advances in the treatment of chronic myeloid leukemia. **BMC Medicine**. 9:99, 2011.

EKHART, C; RODENHUIS, S; SMITS, P, H, M; BEIJNEN, J, H; HUITEMA, A, D, R. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treatment Reviews*. 35: 18– 31, 2009.

FRANKE, R, M; SCHERKENBAH, L, A; SPARREBOOM, A. Pharnacogenetics of organic anion transporting polypeptide 1A2. **Pharmacogenomics**, 10(3): 339-344, 2009.

GAMBACORTI-PASSERINI C, BARNI R, LE COUTRE P, et al. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. **J Natl Cancer Inst**. 92(20):1641-1650, 2000.

GAO B, HUBER RD, WENZEL A, et al. Localization of organic anion transporting polypeptides in the rat and human ciliary body epithelium. **Exp Eye Res** 80:61–72 2005.

GARDNER, E, R; BURGER, H; VAN SCHAIK, R, H; VAN OOSTEROM, A, T; BRUIJN, E, A; GUETENS, G; PRENEN, H; DE JONG, F, A; BAKER, S, D; BATES, S, E; FIGG, W, D; VERWEIJ, J; SPARREBOOM, A; NOOTER, K. Association of enzyme and transporter genotypes with the pharmacokinetics of imatinib. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. 80(2):192-201, 2006.

GILES F. J; O'DWYER, M; SWORDS, R. Class effects of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. **Leukemia**. 23: 1698–1707, 2009.

GIRI, N; AGARWAL, S; SHAIK, N; PAN, G; CHEN, Y; ELMQUIST, W, F. Substrate-Dependent Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp1/Abcg2)-Mediated Interactions: Consideration of Multiple Binding Sites in Vitro Assay Design. **DMD** 37:560–570, 2009.

GLAESER H, BAILEY DG, DRESSER GK, et al. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. **Clin Pharmacol Ther**, 81:362–7, 2007.

GOLDMAN JM, MARIN D, OLAVARRIA E, APPERLEY JF. Clinical Decisions for chronic myeloid leukemia in imatinib era. **Semin Hematology** 40:98-103, 2003.

GOLDMAN, J, M. Chronic myeloid leukaemia. **Medicine** 37:195-197, 2008.

HAMPRAS, S, S; SUCHESTON, L; WEISS, J; BAER, M, R; ZIRPOLI, G; SINGH, P, K; WETZLER, M; CHENNAMANENI, R; BLANCO, J, G; FORD, L, A; MOYSICH, K, B. ABC polymorphisms and survival outcome in AML patients. **Int J Mol Epidemiol Genet**. 1(3):201-207, 2010.

HEHLMANN, R. CML in the imatinib era. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, 22: 283–284, 2009.

HELLEMANS J, MONTIER G, DE PAEPE A, SPELEMAN F, VANDESONPELE J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol**; 8(2): R19, 2007.

HIRAYAMA C, WATANABE H., NAKASHIMA R., NANBU T., HAMADA A., KUNIYASU A., NAKAYAMA H., KAWAGUSHI T., SAITO H. Constitutive Overexpression of P-glycoprotein, Rather than Breast Cancer Protein or Organic Cation Transporter 1, Contributes to Acquisition of Imatinib-Resistance in K562 Cells. **Pharmaceutical Research** vol 25, 4:827-835, 2008.

HOFMANN, W; KOMOR, M; HOELZER, D; OTTMANN, O, G. Mechanisms of Resistance to STI571 (Imatinib) in Philadelphia-chromosome Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. **Leukemia and Lymphoma**. 5:4, 655: 660, 2004.

HU S, FRANKE R M, FILIPSKI K K, HU C, ORWICK S J, DE BRUIJN E A, BURGER, H, BAKER, S D, SPARREBOOM A. Interaction of Imatinib with Human Organic Ion Carriers. **Clin Cancer Res**; 4(10): 3141- 3148, 2008.

HUGHES T., SAGLIO G., BRANFORD, S. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase **Journal of Clinical Oncology** 27:4204-4210, 2009.

IBRAHIM, A, R; ELIASSON, L; APPERLEY, J, F; MILOJKOVIC, D; BUA, M; SZYDLO, R; MAHON, F, X; KOZLOWSKI, K; PALIOMPEIS, C; FORONI, L; KHORASHAD, J, S; BAZEOS, A; MOLIMARD, M; REID, A; REZVANI, K; GERRARD, G; GOLDMAN, J; MARIN, D. Poor adherence is the main reason for loss of CCyR and imatinib failure for chronic myeloid leukemia patients on long-term therapy. **Blood**. 117(14): 3733-36, 2011.

IMAI Y, NAKANE M, KAGE K, TSUKAHARA S, ISHIKAWA E, TSURUO T. C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. **Mol Cancer Ther**. 1(8):611–6, 2002.

ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetics Nomenclature, Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic

Nomenclature. Published in collaboration with 'Cytogenetic and Genome Research' Editor(s): Shaffer, L.G.; Slovak ML, Campbell LJ.

JABBOUR, E; FAVA, C; KANTARJIAN, H. Advances in the biology and therapy of patients with chronic myeloid leukaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**. 22: 395–407, 2009.

JELINEK J, GHARIBYAN V, ESTECIO MRH, KONDO K, HE R, et al. Aberrant DNA Methylation Is Associated with Disease Progression, Resistance to Imatinib and Shortened Survival in Chronic Myelogenous Leukemia. *PLoS ONE* 6(7): e22110, 2010.

JORDANIDES NE, JORGENSEN HG, HOLYOAKE TL, MOUNTFORD JC. Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate. **Blood**, 108: 1370–73, 2006.

KANTARJIAN H, M; TALPAZ, K, M; GILES, F; O'BRIEN, S, CORTES, J. New Insights into the Pathophysiology of Chronic Myeloid Leukemia and Imatinib Resistance. **Ann Intern Med**.145:913-923. 2006.

KANTARJIAN H.M., O'BRIEN S., ANDERLINI P. et al. Treatment of chronic myeloid leukemia: current status and investigational options. **Blood** 87:3069-3081, 1996

KIM D H D, SRIHARSHA L, XU W, KAMEL-REID S, LIU X, SIMINOVITCH K, MESSNER H A, LIPTON J H. Clinical Relevance of a Pharmacogenetic Approach Using Multiple Candidate Genes to Predict Response and Resistance to Imatinib Therapy in Chronic Myeloid Leukemia. **Clin Cancer Res**; 15(14), 2009.

KOBAYASHI, D; IEIRI, I; HIROTA, T; TAKANE, H; MAEGAWA, S; KIGAWA, J. Functional assessment of abcg2 (bcrp) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. **DrugMetab. Dispos**. 33:94–101, 2005.

KUJAWSKI, L; TALPAZ, M. Strategies for overcoming imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. **Leukemia and Lymphoma**.; 48(12): 2310 – 2322, 2007.

LEE W, GLAESER H, SMITH L H, ROBERTS RL, MOECKEL G L, GERVASINI G, LEAKE B F , KIM R B. Polymorphisms in Human Organic Anion-transporting

Polypeptide 1A2 (OATP1A2): Implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry **J. Biol. Chem.** 280: 9610-9617, 2005.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ method. **Methods**, v25, n.4, p.402-8, 2001.

MAHON FX, DEININGER MW, SCHULTHEIS B, et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. **Blood** 96: 1070–79, 2000.

MAHON, F, X; BELLOC, F; LAGARDE, V; CHOLLET, C; MOREAU-GAUDRY, F; REIFFERS, J; GOLDMAN, J, M; MELO, J, V. *MDR1* gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. **Blood**. 101: 2368- 2368, 2003.

MELLO J.V. Chronic myeloid leukemia. **American Society of Hematology** , 1999.

MELO JV, CHUAH C: Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. **Cancer Lett.** 249:121–132, 2007.

MITTELMAN F., MERTENS F., JOHANSON B. A Breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia **Nature Genetics** 15: 417-447, 1997.

MIZUARAI, S; AOZASA, N; KOTANI, H. Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. **Int. J. Cancer** 109:238–246, 2004.

NAKANISHI T, SHIOZAWA K, HASSEL BA, ROSS DD. Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. **Blood**; 108: 678–84, 2006.

NARDINELLI, L. Acompanhamento molecular de pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com mesilato de imatinibe e avaliação dos mecanismos de

resistência a tratamento: mutação no gene BCR-ABL e expressão dos genes MDR1 e BCRP. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008.

NOVARTIS PHARMA AG. CML CLINICAL MONOGRAPH. CH-4002 Basel, Switzerland, 76p. 2007.

O'BRIEN SG, GUILHOT F, LARSON RA, et al. Imatinib compared with interferon and low dose cytarabine for newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**. 348:994–1004, 2003.

PENG B, HAYES M, RESTA D, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. **J Clin Oncol**. 22(5):935-942, 2004.

PICARD, S; TITIER, K; ETIENNE, G; et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. **Blood**. 109:3496-9, 2007.

POONKUZHALI, B; LAMBA, J; STROM, S; SPARREBOOM, A; THUMMEL, K; WATKINS, P; SCHUETZ, E. Association of Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2 Phenotypes and Novel Promoter and Intron 1 Single Nucleotide Polymorphisms. **DMD**. 36:780–795, 2008.

PORTARIA SAS/MS 431, de 03/10/01, publicada em 05/10/2001: aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Tratamento da Leucemia Mieloide Crônica do Adulto. Retificação publicada em 29/10/2001.

QUINTÁS-CARDAMA A, KANTARJIAN H, M, CORTES J, E. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. **Cancer Control**, 16:122–13,2009.

ROBEY, R, W; TO, K, K, K; POLGAR, O; DOHSE, M; FETSCH, P; DEAN, M; BATES, S, E. ABCG2: A perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 61:3–13, 2009.

ROSS, D,D; KARP, J, E; CHEN, T, T; DOYLE, L, A. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood*. 96: 365–368, 2000.

ROUMIANTSEV S, DE AOS IE, VARTICOVSKI L, ILARIA R, VAN ETEN RA. The src homology 2 domain of Bcr/Abl is required for efficient induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice but not for lymphoid leukemogenesis or activation of phosphatidylinositol 3-kinase. **Blood**. 97:4, 2001.

SAMBROOK, J. AND RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS FP, KANTARJIAN H, QUINTÁS-CARDAMA A, CORTES J. Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia. **Cancer J**. 17(6):465-76, 2011.

SAWYERS CL. Chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**. 340:13-30,1999.

SIMPSON, A J. G. et al. A Co-Evolução da Terapêutica e do Diagnóstico Molecular da Leucemia Mieloide Crônica. **Acta oncol. Bras**. 19(1) 259-266, 1998.

SISSUNG, T, M. BAUM, C, E; KIRKLAND, C, T; GAO, R; GARDNER, E, R; FIGG, W, D. Pharmacogenetics of Membrane Transporters: An Update on Current Approaches. **Mol Biotechnol**. 44:152–167, 2010.

SOKAL, J; BACCARANI, M; RUSSO, D, et al. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia **Seminars of Hematology** 25:49-61, 1988

STAVROVSKAYA A,A; STROMSKAYA T,P. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. **Biochemistry**. 73:592–604, 2008.

STROMSKAYA, T, P; RYBALKINA E, Y; KRUGLOV, S, S; ZABOTINA, T, N; MECHETNER, E, B; TURKINA, A, G; STAVROVSKAYA, A, A. Role of P_Glycoprotein in Evolution of Populations of Chronic Myeloid Leukemia Cells Treated with Imatinib. **Biochemistry (Moscow)** 73: 29-37, 2008.

SUREDA A., CARRASCO M., DE MIGUEL M., MARTINEZ J.A., CONDE E., SANZ M.A. DIAZ-MEDIAVILLA J., SIERRA J. Imatinib mesylate as treatment for blastic

transformation of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. **Haematologica** 88:1213-1220, 2003.

SZAKACS Z, BENI S, VARGA Z, et al. Acid-base profiling of imatinib (gleevec) and its fragments. **J Med Chem** 48:249–55. 2005.

SZAKACS, G., ANNEREAU, J. P., LABABIDI, S., SHANKAVARAM, U., ARCIELLO, A., BUSSEY, K. J., REINHOLD, W., GUO, Y., KRUH, G. D., REIMERS, M., WEINSTEIN, J. N., AND GOTTESMAN, M. M. Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. **Cancer Cell**, 6, 129-137, 2004.

TAKAHASHI N, MIURA M, SCOTT SA, KAGAYA H, KAMEOKA Y, TAGAWA H, SAITOH H, FUJISHIMA N, YOSHIOKA T, HIROKAWA M, SAWADA K. Influence of CYP3A5 and drug transporter polymorphisms on imatinib trough concentration and clinical response among patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. *J Hum Genet.* 55: 731–737, 2010.

TAKAHASHI, N; MIURA, M. Therapeutic Drug Monitoring of Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia Patients in the Chronic Phase Pharmacology. 87:241–248, 2011.

TIRONA RG, KIM RB. Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP). **Advanced Drug Delivery Reviews** 54: 343–1352, 2002

VANDESOMPELE J, DE PETES K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**; v.3, n.7, Research 0034, 2002.

VOLPE, G, PANUZZO, C, ULISCIANI, S, CILLONI, D. Imatinib resistance in CML. **Cancer Letters** 274:1–9, 2009.

WANG L, GIANNOUDIS A, LANE S, WILLIAMSON P, PIRMOHAMED M, CLARK RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. **Clin Pharmacol Ther.** 83:258 – 264, 2008.

WINSLOW, T. Philadelphia Chromosome. National Cancer Institute. Disponível em: <http://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=7153>. Acesso em: 08 de fevereiro de 2011.

YANASE, K; TSUKAHARA, S; MITSUHASHI, J; SUGIMOTO, Y. Functional SNPs of the breast cancer resistance protein – therapeutic effects and inhibitor development. *Cancer Letters*, 234:73–80, 2006.

YOKOTA, A, KIMURA, S. Novel Agents to Override Imatinib Resistance Mechanisms **Drug Development Research** 69 : 398–406, 2008.

YONG, A, S, M; MELO, J, V. The impact of gene profiling in chronic myeloid leukaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**. 22:181–190, 2009.

ZAMBER, C, P; LAMBA, J, K; YASUDA, K; FARNUM, J; THUMMEL, K; SCHUETZ, J, D; SCHUETZ, E, G. Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine, *Pharmacogenetics*.13:19–28, 2003.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha do aluno

Anexos 2 a 4. TCLEs

Anexos 5 a 9. Pareceres dos comitês de Ética

Anexo 10. Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

Anexo 1. Ficha do aluno

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6290364/1 - Luciene Terezina de Lima

Email: lucienelima@usp.br
Data de Nascimento: 25/10/1985
Cédula de Identidade: RG - MG13.655.414 - MG
Local de Nascimento: Estado de Minas Gerais
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal de Alfenas - Minas Gerais - Brasil - 2009

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 12/02/2010
Início da Contagem de Prazo: 12/02/2010
Data Limite: 12/08/2012
Orientador: Prof(a). Dr(a). Elvira Maria Guerra Shinohara - 12/02/2010 até o presente. E.Mail: emguerra@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 11/04/2011
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 12/02/2010
Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2011

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2011

Impresso em: 13/01/12 07:42:21

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6290364/1 - Luciene Terezina de Lima

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5738-2/2	Alterações Bioquímicas, Nutricionais e Genéticas Relacionadas à Síntese do Heme	06/04/2010	10/05/2010	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5708-4/1	Farmacogenômica Cardiovascular	05/05/2010	15/06/2010	90	6	90	A	N	Concluída
EDM5102-1/2	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/05/2010	14/07/2010	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5757-3/1	Tópicos em Análises Clínicas II	17/08/2010	14/12/2010	30	2	90	A	N	Concluída
FBA5897-1/1	Nutrigenômica do Câncer	30/08/2010	05/09/2010	30	2	100	A	N	Concluída
BIO5745-2/1	Recursos de Informática para Genética Humana (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	22/11/2010	05/12/2010	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5793-10/1	Tópicos em Análises Clínicas I	15/03/2011	27/06/2011	30	2	80	A	N	Concluída
FBC5755-1/2	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese	05/04/2011	10/05/2011	60	4	90	A	N	Concluída
TIC5013-1/2	Genoma, Transcriptoma e Proteoma Aplicado a Cardiologia (Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Universidade de São Paulo)	13/06/2011	03/07/2011	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2011

Impresso em: 13/01/12 07:42:21

Anexo 2. TCLE

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Estudo da expressão de transportadores de membrana e sua relação com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica”

Nome do Paciente: _____

Doc de Identidade: _____ Sexo: _____

Data de Nascimento: _____

Endereço: _____ N: _____ Apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: _____

Duração da pesquisa: 2 anos

Prezado (a) senhor (a),

Meu nome é Elvira M Guerra Shinohara, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), e estou convidando-o a participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com a equipe de médicos do serviço de hematologia da Santa Casa de São Paulo. A pesquisa está sendo realizada em colaboração com pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Nesta pesquisa serão incluídos pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) que se trataram por pelo menos 3 meses com o mesilato de imatinibe (Glivec®). O objetivo desta pesquisa é avaliar as alterações no DNA que podem ser responsáveis pela resistência dos pacientes ao tratamento com o Glivec. Para isso serão realizados testes genéticos (DNA) para verificar a presença de alterações na sequência do DNA e a expressão deste no seu sangue que possam explicar as causas de resistência ao tratamento.

Se você aceitar participar do estudo, precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue que serão coletadas no ambulatório de hematologia da Santa Casa de São Paulo. Será feita uma única coleta de 25 mL de sangue para a realização de exames. O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Para estudar seu DNA, serão realizados testes que verificam a expressão dos genes SLC22A1, ABCB1, SLCO1A2 e ABCG2 cujos produtos (proteínas) estão relacionados com alterações na entrada e saída do remédio dentro das células. A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será mantida em banco de materiais biológicos sem a identificação de seu nome, pois será utilizado código para a identificação, e a amostra poderá ser utilizada para pesquisas futuras relativas a LMC. Se isso ocorrer, o novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e então, você será consultado.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto, a sua participação neste estudo é voluntária. Os resultados dos exames realizados no sangue serão enviados ao serviço de hematologia da Santa Casa de São Paulo e serão colocados no seu prontuário para acompanhamento de seu médico. Todos resultados serão disponibilizados a qualquer momento durante a pesquisa.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico na Santa Casa de São Paulo não será afetado. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do banco de dados do Laboratório de Hematologia da FCF/USP, onde serão guardados.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento das causas de resistência ao mesilato de imatinibe (Glivec®) e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para pacientes com LMC.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, ou se tiver alguma lesão ou doença relacionada à pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. Elvira M Guerra Shinohara (tel: 3091-3635) ou com o pesquisador Douglas Vivona (tel: 7806-2187) ou com a Dr. Carlos Chiattonne (tel:2176-7268)

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar desta Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras? ----- SIM ----- NÃO

Você quer saber os resultados dos testes genéticos? ----- SIM ----- NÃO

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepfcf@usp.br ou o **Comitê de Ética da Irmandade da Santa Casa de São Paulo**, R. Dr. Cesário Mota Junior, 112 – Santa Cecília – São Paulo – SP – Telefone: 2176-7041

Anexo 3. TCLE

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO **PACIENTES COM LMC QUE PARTICIPARAM DO ESTUDO ANTERIOR**

Projeto de Pesquisa: “Estudo da expressão de transportadores de membrana e sua relação com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica”

Nome: _____
 Doc de Identidade: _____ Sexo: _____
 Data de Nascimento: _____
 Endereço: _____ N: _____ Apto: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____
 CEP: _____ Telefone: _____
 Duração da pesquisa: 2 anos

Prezado (a) senhor (a),

Meu nome é Elvira M Guerra Shinohara, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e junto com os alunos de Pós-Graduação (Douglas Vivona e Luciene Terezina de Lima) estamos realizando um projeto de pesquisa sobre diferenças na resposta ao tratamento com Glivec (mesilato de imatinibe). Há algum tempo atrás você participou desta pesquisa desenvolvida por nosso laboratório com apoio da equipe de médicos do Serviço de Hematologia da Santa Casa de São Paulo. O objetivo da pesquisa foi avaliar as alterações no DNA que possam ser responsáveis pela resistência dos pacientes ao tratamento com o Glivec. Agora, estamos solicitando a você autorização para estudar outras alterações no seu DNA. Iremos fazer testes que verificam as diferenças na sequência do DNA de cada indivíduo (polimorfismos) em outros genes (ABCG2, ABCA3, SLC01A2, SLC01B3, CYP3A4 e CYP3A5), cujos produtos (proteínas) estão relacionados com alterações na entrada e saída do remédio dentro das células e como o medicamento é processado na célula (metabolização do medicamento). Também serão avaliadas as expressões dos referidos genes para verificar o quanto eles são responsáveis ou não pela resistência ao Glivec. Ainda neste novo estudo vamos avaliar a metilação do DNA, que também pode estar relacionado com a resistência no tratamento do Glivec. Desse modo, venho pedir seu consentimento para utilizar seu material biológico, que foi armazenado no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e foi mantido em banco de materiais biológicos sem a identificação de seu nome, pois foi utilizado código para a identificação, e será utilizado caso você dê a sua autorização.

Esclareço que não será preciso fazer uma nova coleta, pois sua amostra está armazenada.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto, a sua participação neste estudo é voluntária. Todos os resultados serão disponibilizados a qualquer momento durante a pesquisa. Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico na Santa Casa de São Paulo não será afetado.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento das causas de resistência ao mesilato de imatinibe (Glivec®) e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para pacientes portadores de LMC.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, ou se tiver alguma lesão ou doença relacionada à pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. Elvira M Guerra Shinohara (3091-3785), ou com Luciene Lima (6702-8579), ou com o pesquisador Douglas Vivona (7266-2600) ou com a Dr. Carlos Chiattonne (2176-7268).

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, participar desta Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras? ----- SIM ----- NÃO

Você quer saber os resultados dos testes genéticos? ----- SIM ----- NÃO

São Paulo, _____ de _____ de 200____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepfcf@usp.br ou o **Comitê de Ética da Irmandade da Santa Casa de São Paulo**, R. Dr. Cesário Mota Junior, 112 – Santa Cecília – São Paulo – SP – Telefone: 2176-7041

Anexo 4. TCLE

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
GRUPO DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Projeto de Pesquisa: “Estudo da expressão de transportadores de membrana e sua relação com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica”

Nome: _____

Doc de Identidade: _____ Sexo: _____

Data de Nascimento: _____

Endereço: _____ N: _____ Apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: _____

Duração da pesquisa: 2 anos

Prezado (a) senhor (a),

Meu nome é Elvira M Guerra Shinohara, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e junto com os alunos de Pós-Graduação (Douglas Vivona e Luciene Terezina de Lima) estamos realizando um projeto de pesquisa sobre diferenças na resposta ao tratamento com Glivec (mesilato de imatinibe), remédio este usado no tratamento da leucemia mielóide crônica (LMC). Nesta pesquisa serão incluídos pacientes com LMC que se trataram por pelo menos 3 meses com o mesilato de imatinibe (Glivec®) e indivíduos saudáveis. O objetivo desta pesquisa é avaliar as alterações no DNA que podem ser responsáveis pela resistência dos pacientes ao tratamento com o Glivec. Para isso serão realizados testes genéticos (DNA) para verificar a presença de alterações na sequência do DNA e a expressão deste no sangue e que possam explicar as causas de resistência ao tratamento. O seu sangue será utilizado como controle normal para a realização destes testes.

Se você aceitar participar do estudo, precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue que serão coletadas no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Será feita uma única coleta de 25 mL de sangue, em jejum de 8 horas, para a realização de exames. O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Para estudar seu DNA, serão realizados testes que verificam as diferenças na sequência do DNA de cada indivíduo (polimorfismos) nos genes ABCB1, ABCG2, ABCA3, SLC22A1, SLC01A2, SLC01B3, CYP3A4 e CYP3A5 cujos produtos (proteínas) estão relacionados com alterações na entrada e saída do remédio dentro das células e na metabolização. Também serão avaliadas as expressões dos referidos genes para verificar o quanto eles são responsáveis ou não pela resistência ao Glivec. Neste estudo ainda vamos avaliar a metilação do DNA, que também pode estar relacionado com a resistência no tratamento do Glivec. A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será mantida em banco de materiais biológicos sem a identificação de seu nome, pois será utilizado código para a identificação, e a amostra poderá ser utilizada para pesquisas futuras relativas a LMC. Se isso ocorrer, o novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e então, você será consultado sobre a permissão do uso deste material.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto, a sua participação neste estudo é voluntária. Os resultados dos exames realizados no sangue serão enviados para o seu endereço. Todos os resultados serão disponibilizados a qualquer momento durante a pesquisa.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do banco de dados do Laboratório de Hematologia da FCF/USP, onde serão guardados.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento das causas de resistência ao mesilato de imatinibe (Glivec®) e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para pacientes com LMC.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, ou se tiver alguma lesão ou doença relacionada à pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. Elvira M Guerra Shinohara (3091-3785), ou com Luciene Lima (6702-8579), ou com o pesquisador Douglas Vivona (7266-2600) ou com a Dr. Carlos Chiattone (2176-7268).

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar desta Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras? ----- SIM ----- NÃO

Você quer saber os resultados dos testes genéticos? ----- SIM ----- NÃO

São Paulo, _____ de _____ de 201____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepfcf@usp.br ou o **Comitê de Ética da Irmandade da Santa Casa de São Paulo**, R. Dr. Cesário Mota Junior, 112 – Santa Cecília – São Paulo – SP – Telefone: 2176-7041

Anexo 5. Aprovação do Comitê de Ética da FCF-USP. **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comitê de Ética em Pesquisa – CEPOfício CEP/FCF/02/2010

São Paulo, 10 de fevereiro de 2010.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 08 de fevereiro de 2010, **APROVOU** as alterações do projeto "Estudo da expressão de transportadores de membrana e sua relação com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica" apresentado por Vossa Senhoria.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Anexo 6. Aprovação do Comitê de Ética da FCF-USP. **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPOfício CEP/FCF/176/2011

São Paulo, 10 de novembro de 2011.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
FBC

Senhor(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 09 de novembro de 2011, **aprovou** as alterações no projeto intitulado "Estudo da expressão de transportadores de membrana e sua relação com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica" (Protocolo CEP/487) relacionadas abaixo:

- 1) Determinações nas amostras de 120 pacientes com LMC já incluídos no projeto original: determinar a expressão dos genes CYP3A4 e CYP3A5; fazer as genotipagens dos SNPs nos genes ABCG2, ABCA3, SLC22A1, SLC01A2, SLC01B3, CYP3A5; determinar a taxa de metilação global do DNA e em regiões promotoras dos genes;
- 2) Colher amostra de sangue de mais 30 pacientes com LMC para determinar a atividade funcional do transportador ABCB1 bem como incluir 30 indivíduos saudáveis para avaliar as expressões dos genes ABCB1, ABCG2, SLC22A1, SLC01A2, CYP3A4, CYP3A5 e as genotipagens dos SNPs nestes genes.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

Anexo 7. Aprovação do Comitê de Ética do Hospital Brigadeiro.

078-73

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇO DE SAÚDE
UGA – V – HOSPITAL BRIGADEIRO
Av. Brigadeiro Luiz Antônio, 2651 Tel. 3253-9704 – FAX. 3289-2421
cep@terra.com.br
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 22 de Abril de 2009.

Carta de Aprovação

Registro CEP-HB: 006/09-P

I- Identificação:

Título do projeto: “Estudo da expressão gênica e de polimorfismos nos genes MDR1 e hOCT1 e sua relação com a resistência ao tratamento ao tratamento com mesilato de imatinib em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC)”.

Pesquisadora responsável: Dra. Maria Aparecida Zanichelli
Instituição onde será realizado: Hospital Brigadeiro – Serviço de Hematologia

Prezada pesquisadora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Brigadeiro, de acordo com atribuições definidas na resolução 196/96 e complementares, analisou e aprovou na data de 22 de Abril de 2009, o protocolo acima descrito, bem como os documentos que o compõe.

Confirmamos que a Aprovação ocorreu por unanimidade e que nenhum dos pesquisadores envolvidos participou da votação.

Queremos recordá-lo do compromisso de nos enviar relatórios semestrais da evolução do estudo, conforme determina a CONEP.

Documentos analisados e aprovados:

- Protocolo de pesquisa clínica;
- Folha de Rosto;
- T.C.L.E;
- Parecer Consubstanciada.

Atenciosamente,

Dra. Leila de Lourdes Martins Perobelli
 Coordenadora do CEP-HB

IV- Parecer

O referido estudo é passível de aprovação, após serem respondidas pendências pelo pesquisador.

V- Parecer do CEP-HB:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Brigadeiro, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96 e complementares, manifesta-se pela aprovação em questão, na data de 22 de Abril de 2009, após resposta do pesquisador, aos questionamentos.

Situação: Aprovado

Atenciosamente,

Dra. Leila de Lourdes Martins Perobelli
 Coordenadora do CEP-HB

Anexo 8. Aprovação do Comitê de Ética do Hospital Brigadeiro.

SPDM - Associação Paulista para o Desenvolvimento da Medicina HOSPITAL BRIGADEIRO
<p>São Paulo, 17 de outubro de 2011</p>		
<p>PARECER CONSUBSTANCIADO</p>		
<p>REF: "Estudo da expressão de transportadores de membrana e sua relação com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica"</p>		
<p>Pesquisadores Responsáveis: Dra. Maria Aparecida Zanichelli/Dra. Elvira Guerra Shinohara/Douglas Vivona</p>		
<p>O comitê de Ética em Pesquisa deste Hospital, utilizando-se de duas prerrogativas e com base na resolução 196/96 e suas complementares aprovou os seguintes documentos:</p>		
<p>Adendo nº1 ao projeto inicial</p>		
<p>TCLE – Pacientes com LMC que serão incluídos no estudo funcional do ABCB1</p>		
<p>TCLE – Grupo de indivíduos saudáveis (controle)</p>		
<p>TCLE – Pacientes com LMC que a participaram do estudo anterior</p>		
<p>TCLE - para novos pacientes</p>		
<p>A aprovação foi por unanimidade e nenhum dos pesquisadores envolvidos participou da análise do projeto.</p>		
<p>Queremos recorda-lhe do compromisso de nos enviar RELATÓRIOS SEMESTRAIS da evolução do estudo, conforme determina a CONEP.</p>		
<p>Atenciosamente,</p>		
<p> </p>		
<p>Dra. Leila de Lourdes Martins Perobelli Coordenadora do CEP-HB</p>		

Anexo 9. Aprovação do Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

**IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**

PARECER CONSUBSTANCIADO

I IDENTIFICAÇÃO n 221/09

Título do projeto "Estudo da expressão gênica e de polimorfismos nos genes MDR1 e hOCT1 e sua relação com a resistência ao tratamento com mesilato de imatinib em pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC)"

Pesquisadora responsável: Farmacêutico Douglas Vivona

Co-autor Dr. Carlos Sergio Chiattonne

Data de apresentação ao CEP 26.05.2009

Finalidade da pesquisa iniciação científica – pós graduação mestrado

III SUMÁRIO DO PROJETO

Serão estudados 385 pacientes portadores de LMC provenientes do Hospital Brigadeiro, da Sta Casa de São Paulo e outros centros a serem convidados. Estes pacientes serão divididos em cinco grupos, um constituído de 150 pacientes que obtiveram resposta com a dose padrão de 400 mg de mesilato de imatinib (Glivec®) após 18 meses de tratamento, o segundo, constituído por 150 pacientes que não responderam a dose inicial de 400 mg e passaram a tomar 800mg, com pelo menos 3 meses de uso MI; o terceiro, constituído de 20 pacientes que tomaram 800 mg de mesilato imatinib com pelo menos 3 meses de uso com MI e passaram a fazer uso de Nilotinib; o quarto grupo constituído de 40 pacientes que tomaram 800 mg de mesilato imatinib e não responderam com pelo menos 3 meses de uso com MI e estão fazendo de uso de Hydrea, e o quinto grupo constituído por 25 pacientes que iniciaram o tratamento com 600 mg de MI. Estes pacientes serão avaliados quanto aos critérios de falha de tratamento estabelecidos pela *European LeukemiaNet* (Quadro 1 e 2 em anexo)

Será aplicado um questionário a cada paciente contendo as seguintes informações: idade, sexo, grupo étnico, dados sócio-econômicos (escolaridade, renda *per capita* e ocupação), tempo de diagnóstico da doença, tipo de tratamento utilizado anteriormente, tempo de tratamento com mesilato de imatinib, uso de outros medicamentos, risco Sokal, uso de bebidas alcoólicas e fumo.

Os objetivos do presente estudo são: 1- Avaliar as freqüências dos genótipos dos polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T no gene MDR1 e T-43G e A1222G no gene hOCT1 em portadores de LMC tratados com MI, 2- Estudar a associação entre os polimorfismos nos genes MDR1 e hOCT1 e os marcadores de resposta ao MI, 3- Avaliar se os polimorfismos T-43G e A1222G do gene hOCT1 e T1236C, G2677T/A e C3435T do gene MDR1 estão associados a resistência ao MI 4- Determinar os fatores

V PARECER DO CEP

Considero o projeto aprovado com pendência de especificar quais os outros centros convidados a participar

CARMEN S. BADARÓ MARQUES

RELATORA DO CEP

24.06.2009

Parecer aprovado na
reunião do CEP
dia 24/06/09

Prof. Dr. Nelson Keiske Ono
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
IRL/USP

Anexo 10. Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP