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

**Avaliação da associação dos polimorfismos C1236T, C3435T e
G2677T/A no gene ABCB1 a marcadores de resposta ao mesilato de
imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica**

Douglas Vivona

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo

2010

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

**Avaliação da associação dos polimorfismos C1236T, C3435T e
G2677T/A no gene ABCB1 a marcadores de resposta ao mesilato de
imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica**

Douglas Vivona

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

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

Vivona, Douglas
V863a Avaliação da associação dos polimorfismos C1236T, C3435T
e G2677T/A no gene ABCB1 a marcadores de resposta ao
mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide
crônica / Douglas Vivona. -- São Paulo, 2010.
102p.

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

Orientador: Shinohara, Elvira Maria Guerra

1. Leucemia mieloide crônica 2. Hematologia I. T. II.
Shinohara, Elvira Maria Guerra, orientador.

616.155 CDD

Douglas Vivona

Avaliação da associação dos polimorfismos C1236T, C3435T e
G2677T/A no gene ABCB1 a marcadores de 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

1º.examinador

2º.examinador

São Paulo , ____ de _____ de _____

DEDICATÓRIA

À Deus e Jesus Cristo por me abençoar cada dia com saúde e paz.

Ao meu pai, Jessé Vivona, que tenho certeza que da sua nova morada, nunca deixou de me olhar e estar orgulhoso dessa conquista.

À minha mãe, Laura Garcia Vivona, fiel incentivadora e companheira de todos os momentos.

À minha futura esposa, Lais Castro Dutra, por estar presente desde o primeiro minuto deste trabalho, me apoiando e incentivando a olhar e continuar sempre em frente.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo, que me recebeu de portas abertas.

À minha orientadora Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, pela oportunidade e pela dedicação nas horas mais difíceis.

À Profa. Dra. Rosario D.C. Hirata, por seus conselhos e orientação que foram de extrema importância para realização deste trabalho.

À minhas amigas e companheiras da equipe da LMC, Carol e Luciene. Com certeza sem vocês nada disso teria acontecido.

Aos médicos e funcionários do Hospital Brigadeiro, especialmente à Dra. Maria Aparecida Zanichelli, Dra. Maria Dulce Collassanti, Juliana Fenerich Mauri e Danielle Guzzi Augusto pelo incentivo e colaboração nas coletas e 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.

Aos pacientes que contribuíram de forma anônima para este estudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Hematologia Clínica do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

RESUMO

VIVONA,D. **Avaliação da associação dos polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene ABCB1 a marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica.** 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma expansão clonal da célula progenitora hematopoiética, traduzindo-se por hiperplasia mielóide, leucocitose, neutrofilia, basofilia e esplenomegalia. O cromossomo Filadélfia é característico da doença, sendo produto da translocação t(9;22) (q34;q11), resultando na fusão dos genes *ABL* e *BCR*. Esta fusão gera um gene híbrido que produz uma proteína com elevada atividade tirosinoquinase que tem um papel central da patogenia da LMC. O mesilato de imatinibe (MI) é um derivado da fenilaminopirimidina que inibe a proteína-tirosina quinase *ABL in vitro e in vivo*. O MI interage com transportadores de membrana de efluxo, como o *ATP binding cassette B1 (ABCB1)*. Polimorfismos no gene *ABCB1* têm sido associados com alteração na sua funcionalidade e podem estar envolvidos na resposta ao tratamento farmacológico. Este estudo tem por objetivo investigar a relação dos polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1* com marcadores de resposta ao tratamento com MI, em indivíduos com LMC, e determinar os fatores de predisposição de resposta ao MI. Foram incluídos 118 pacientes portadores de LMC. Foram constituídos dois grupos: Grupo 1 com 70 pacientes com resposta citogenética completa com a dose padrão de MI (400 mg/dia de MI) por até 18 meses e, Grupo 2 com 48 pacientes sem resposta citogenética completa com a dose inicial de 400 mg/dia de MI ou que perderam esta resposta ao longo do tratamento. Amostras de sangue foram obtidas para: quantificação de *BCR-ABL1*, extração de DNA genômico e análise citogenética de banda G. As análises dos polimorfismos foram realizadas por PCR-RFLP. A resposta ao tratamento foi avaliada segundo os critérios da *European LeukemiaNet*. A distribuição da frequência dos genótipos dos polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A foi similar nos dois gêneros e entre brancos e não brancos. Não houve influência dos polimorfismos estudados no risco de desenvolvimento da LMC e na resposta ao MI. O haplótipo *ABCB1* 1236CT/2677GT/3435CT (para os polimorfismos C1236T/G2677T/C3435T no gene *ABCB1*) foi encontrado em 51,7% dos pacientes com resposta molecular maior ($P=0,010$). Houve tendência a maior frequência de pacientes portadores de genótipos 1236 CT e TT no grupo de respondedores (86,7%) quando foi analisada a resposta molecular completa ($p=0,069$). O mesmo aconteceu no grupo de não respondedores quando foi considerado o polimorfismo C1236T. Houve tendência a maior frequência de resposta molecular completa em portadores de genótipo 2677 GT+TT+TA nos dois grupos (respondedores $P=0,074$ e não respondedores $P=0,076$). Em conclusão, os genótipos e haplótipos para os polimorfismos *ABCB1* C1236T, C3435T e G2677T/A estão associados com a resposta molecular em portadores de LMC respondedores ao tratamento com MI.

Palavras-chave: *ABCB1*. Polimorfismo Genético. Mesilato de Imatinibe. Leucemia Mieloide Crônica

ABSTRACT

VIVONA,D. **Evaluation of the association of C1236T, C3435T and G2677T/A polymorphisms on ABCB1 gene to response markers to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia.** 2010. 102 f. Dissertation (Masters) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

The chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal expansion of the hematopoietic progenitor cell, representing myeloid hyperplasia, leukocytosis, neutrophilia, basophilia and splenomegaly. The Philadelphia chromosome is peculiar on the disease, being the result of the translocation t(9; 22) (q34; q11), leading on the fusion of the ABL and BCR genes. This merger creates a hybrid gene that produces a protein with high activity of tyrosine kinase that is the main pathogenesis of CML. The Imatinib mesylate (IM) is a fenilaminopirimidine derivative which inhibits the ABL protein-tyrosine kinase *in vitro* and *in vivo*. The IM interacts with membrane efflux transporters, such as ATP binding cassette B1 (ABCB1). Polymorphisms in the ABCB1 gene have been associated with changes in its functionality and may be involved on the response to drug treatment. This study aims to investigate the relationship of C1236T, C3435T and G2677T / A polymorphisms in ABCB1 gene with response markers for IM treatment in individuals with CML, and to determine the predisposing factors of response to IM. 118 patients with CML were included and divided in two groups. Group 1: 70 patients with complete cytogenetic response and a standard dose of IM (400 mg / day IM) for up to 18 months. Group 2: 48 patients without a complete cytogenetic response and initial dose of 400 mg / day IM or with response lost throughout the treatment. Blood samples were obtained for: quantification of BCR-ABL1, genomic DNA extraction and band G cytogenetic analysis. The analysis of the polymorphisms were performed by PCR-RFLP. The treatment response was evaluated according to European LeukemiaNet criteria. The frequency distribution of genotypes of C1236T, C3435T and G2677T / A polymorphisms were similar in both sexes and between whites and nonwhites. The polymorphisms studied had no influence on the CML development or IM response. The haplotype ABCB1 1236CT/2677GT/3435CT (for C1236T/G2677T/C3435T polymorphisms in the ABCB1) was found in 51.7% patients with major molecular response (P = 0.010). There was a tendency for higher frequency of patients with 1236 CT and TT genotypes in the responders group (86.7%) when the molecular response was analyzed (p = 0.069). The same happened in the nonresponders group when the C1236T polymorphism was considered. There was a tendency for a higher frequency of complete molecular response in patients with 2677 GT + TT + TA genotype in both groups (responders P = 0.074 and nonresponders P = 0.076). In conclusion, genotypes and haplotypes for ABCB1 C1236T, C3435T and G2677T / A polymorphisms are associated with molecular response in patients with CML that respond to IM treatment.

Keywords: ABCB1. Genetic polymorphism. Imatinib mesylate. Chronic Myeloid Leukemia

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: *ATP binding cassette*

ABL: *Abelson murine oncogene*

ATP: Adenosina trifosfato

BCR: *Gene break point cluster region*

CRKL: *Oncogene like protein*

hOCT: Transportador de cátions orgânicos humano

IRIS: *Internacional Study of Interferon versus STI571*

JAK: Janus quinase

LMC: Leucemia Mieloide Crônica

MAPK: Proteínas quinases oncogênicas ativadas

MDR: Resistência a múltiplas drogas

MI: mesilato de imatinibe

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PI3K: Fosfoinositol 3-fosfato quinase

RNA_m: RNA mensageiro

Ph: Philadelphia

P-gp: Glicoproteína P

RCC: resposta citogenética completa

RHC: resposta hematológica completa

RMM: resposta molecular maior

SAPK: proteína quinase ativada por stress

SRC: SRC-kinase Homology

STAT: Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição

t: translocação

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
2.REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Histórico da LMC	15
2.2 Fases da LMC	16
2.2.1 Fase Crônica	16
2.2.2 Fase Acelerada	17
2.2.3 Crise Blástica	18
2.3 Fatores Prognósticos	19
2.4 Diagnóstico Laboratorial	19
2.5 A Biologia Molecular da LMC	19
2.5.1 O Cromossomo Philadelphia	19
2.5.2 O Gene <i>BCR-ABL1</i>	20
2.5.3 Vias de Sinalização Celular Ativadas por <i>BCR-ABL1</i>	21
2.6 Tratamento Farmacológico	25
2.6.1 Hidroxiuréia (HY)	26
2.6.2 Interferon- α (IFN- α)	27
2.6.3 Mesilato de Imatinibe (MI) (Glivec®)	28
2.6.3.1 Estudo IRIS	30
2.7 Interação com transportadores de membrana	32
2.8 Características do gene <i>ABCB1</i> e da proteína codificada por este gene	33
2.8.1 <i>ABCB1</i>	33
2.8.2 Polimorfismos no gene <i>ABCB1</i>	35
2.9 Indução de Resistência ao Mesilato Imatinibe (Glivec®)..	38
3.OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4.MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Casuística	41
4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão	43
4.3 Aspectos Éticos	43
4.4 Amostras Biológicas	43
4.5 Análises Citogenética para a pesquisa de alterações cromossomais	44
4.6 Quantificação do transcrito <i>BCR-ABL</i> por RT-PCR em tempo real	46
4.7 Extração e avaliação do DNA genômico	47
4.8 Avaliação dos Polimorfismos no gene <i>ABCB1</i>	48
4.8.1 Determinação dos genótipos para o polimorfismo <i>ABCB1</i> C1236T	48
4.8.2 Determinação dos genótipos para o polimorfismo <i>ABCB1</i> C3435T	50
4.8.3 Determinação dos genótipos para o polimorfismo <i>ABCB1</i> G2677T/A	51
4.9 Análises Estatísticas	53

5. RESULTADOS	55
5.1 Dados dos pacientes portadores de LMC	55
5.2 Resposta ao tratamento com MI	57
5.3 Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos	57
5.4 Associação entre os polimorfismos e a resposta ao tratamento com MI	59
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
APÊNDICES	85
ANEXOS	89

1.INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma expansão clonal da célula progenitora hematopoiética, traduzindo-se por hiperplasia mieloide, leucocitose, neutrofilia, basofilia e esplenomegalia. No Brasil, esta leucemia corresponde a 15% das leucemias e sua incidência é de 1,6 casos por 100.000 habitantes/ano (BRASIL, 2007). A idade mediana da manifestação da doença localiza-se entre os 45 e 55 anos, com 12 a 30% em idade igual ou superior a 60 anos (FARDEL et al., 1999). Menos de 10% dos casos ocorre em pacientes com menos de 20 anos (BORTOLHEIRO & CHIATTONE, 2008) Há uma discreta predominância no gênero masculino em uma proporção de 1,4:1(VENDRAME-GOLONI, 2006). Cerca de 95% dos pacientes com LMC apresentam o cromossomo Philadelphia (Ph), que é uma anormalidade citogenética caracterizada por translocação recíproca e balanceada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 t (9;22)(q34;q11) (O'DAWYER, 2002). Em nível molecular esta translocação cromossômica é representada pelo rearranjo gênico *BCR-ABL1*, no qual, exons de genes do cromossomo 22 são fundidos aos exons de genes do cromossomo 9. Este processo leva formação de RNA's mensageiros que são traduzidos em uma proteína quimérica de 210 kDa, BCR-ABL1 (DRUKER et al., 2006). A BCR-ABL1 apresenta atividade de tirosina quinase responsável pela expansão clonal das células tronco-hematopoéticas e está relacionada à patogênese da LMC (BAIN, 2002).

Com a descoberta do mesilato de imatinibe (MI) houve uma revolução no tratamento e no prognóstico da doença, pois o MI atua inibindo ou bloqueando a proteína BCR-ABL1 de exercer seu papel na oncogênese (DRUKER et al., 2006); evitando a formação de fenótipos malignos e restaurando o mecanismo de morte celular (DRUKER et al., 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 (MELO, 1999).

Os efeitos do MI no organismo são evidenciados pela normalização da contagem de leucócitos no sangue periférico em 98% dos casos (remissão hematológica), redução do tamanho do baço, remissão citogenética completa (RCC) em 75-85% dos pacientes, não detecção do cromossomo Ph, 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, HOCHHAUS et al., 2009).

No entanto, cerca de 16% dos pacientes apresenta refratariedade ao MI nos primeiros oito anos de tratamento (DEININGER et al., 2009). Diversos mecanismos de resistência ao MI têm sido propostos, tais como: a amplificação gênica do *BCR-ABL1*, a presença de mutações no gene *BCR-ABL1*, variabilidade farmacocinética do paciente relacionada aos transportadores de influxo e efluxo intracelular, e a presença de polimorfismos em genes alvos (JORGENSEN et al., 2002; MAHON et al., 2003; CROSSMAN et al., 2005; HOCHHAUS et al., 2007).

Diversos estudos confirmaram que o MI interage com transportadores de multidroga que medeiam o influxo (SLC22A1, SLCO1A2) e efluxo (ABCB1, ABCG2) do MI (HOUGHTON, 2004; THOMAS et al., 2004). Giles et al., 1999 associou o aumento da expressão do gene *ABCB1* com a fase avançada da LMC, sugerindo que o aumento da expressão deste gene de efluxo estaria relacionado a resistência ao tratamento da LMC. Outro estudo realizado em 90 pacientes com LMC em uso da dose padrão de MI (400mg) demonstrou a associação dos principais polimorfismos do *ABCB1* (C1236T, G2677T/A e C3435T) com a resposta molecular maior,

mostrando que 85% dos pacientes homozigotos para o alelo 1236T obtiveram resposta molecular maior contra 47,7% dos outros genótipos (DULUCQ et al., 2008)

Uma das maiores complicações na terapia farmacológica é a alta variabilidade individual da resposta e sensibilidade a drogas. Com o desenvolvimento de métodos de detecção de polimorfismos, está ficando cada vez mais claro que estas variações afetam a farmacocinética das drogas e são determinantes para esta variabilidade de resposta.

Devido à importância da determinação das causas da variabilidade da resposta ao tratamento da LMC, para que sejam criadas novas estratégias de tratamento e a elucidação de dados discordantes na literatura, se faz necessário novos estudos envolvendo a o transportador ABCB1.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico da LMC

Os primeiros relatos de casos de LMC foram descritos por dois jovens médicos, John Hugues Bennet, no ano de 1845 em Edimburgo, e Robert Virchow, no ano de 1858, em Berlin. Os dois médicos combinavam em suas publicações, detalhes clínicos, informações *post-mortem*, achados microscópicos e noções de fisiopatologia encontrados em seus pacientes. De fato, isto foi muito relevante para compor as características primordiais da leucemia (GEARY, 2000).

Em 1847 Robert Virchow foi quem empregou o termo sangue branco ou *leukäemie* para descrever a aparência pouco característica do sangue destes pacientes, e a inversão da proporção de células brancas e vermelhas. Este termo não foi aprovado de maneira universal, desta forma, Bennet sugeriu que a desordem fosse denominada de leucocitemia. Anos depois, uma monografia relatando 37 casos estudados, foi publicada por Bennet, intitulada de *leucocythaemia* (GEARY, 2000).

Após a monografia de Bennet, Robert Virchow iniciou a investigação da fisiopatologia da leucemia e publicou inúmeros estudos. As observações primordiais de Virchow incluíam objeções à cerca da leucocitose, acompanhada da diminuição de células vermelhas. A causa da doença, segundo ele, estaria no tecido produtor de células brancas. A autópsia de um paciente leucêmico permitiu observação da medula óssea, esta possuía aspecto amarelo esverdeado, o que a diferenciava da aparência vermelha comum. Visto isso, a medula óssea foi então considerada como local produtor de células sanguíneas, este fato se sucedeu no ano de 1870 (RANDOLPH, 2005). Quase uma década depois foram introduzidos os métodos de coloração por Paul Ehrlich. A identificação do mieloblasto e o uso de esfregaços

corados com peroxidase foram um grande impulso para fundar a classificação das leucemias e distinguir e contar os elementos celulares da LMC (MELO, 1999).

A sobrevida dos pacientes, sem nenhum tratamento, era em média de três anos. Deduzia-se que existia uma relação entre o aumento do número de mieloblastos e a taxa de óbito destes pacientes. Ainda que não existisse o perfeito conhecimento para se falar em crise blástica, a esta fase foi atribuído o nome de metamorfose (GEARY, 2000).

Pouco se sabia a cerca da etiologia da LMC, mas o aumento de sua incidência estaria associado com a exposição ao benzeno (RANDOLPH, 2005). A conexão com a radiação foi feita a partir da observação do aumento de casos de LMC nos sobreviventes da catástrofe de Hiroshima e Nagasaki durante a II Guerra Mundial (RANDOLPH, 2005).

2.2. Fases da LMC

As manifestações clínicas da LMC dependem da fase da doença. Ela se inicia por uma fase crônica com duração de quatro a cinco anos, seguida por uma fase acelerada de duração mais curta e, finalmente, uma fase denominada aguda ou crise blástica (SUREDA et al., 2003).

2.2.1 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 e a

eosinofilia pode estar presente. A contagem das plaquetas são normais ou aumentadas, 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. O número de blastos é inferior a 10% e pode ser encontrada monocitose absoluta (SAWYERS, 1999).

2.2.2 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, artralgias e dor abdominal relacionadas ao aumento do baço ou infarto esplênico (SAWYERS, 1999).

As principais características laboratoriais são um aumento da porcentagem de blastos, promielócitos e basófilos na medula óssea e sangue periférico. Na medula óssea pode ocorrer um aumento de fibras de reticulina ou mesmo se estabelecer um 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, desde 1998, 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).

2.2.3 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)

2.3 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 (SUREDA et al., 2003).

2.4 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-ABL 1* 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 com exceção da trombocitemia hemorrágica, a identificação da translocação t(9;22) facilita a conclusão diagnóstica. Já na fase acelerada é encontrado 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 et al., 2006)

2.5 A Biologia Molecular da LMC

2.5.1 O Cromossomo Philadelphia

O cromossomo Philadelphia (Ph) é um cromossomo 22 curto resultante de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22. A marca característica da LMC é este cromossomo, encontrado em 95% dos pacientes (RANDOLPH, 2005).

A descoberta do cromossomo Ph teve grande impacto no diagnóstico da LMC. Sua primeira observação aconteceu no ano de 1960 pelos pesquisadores Nowelle Hungerford da Universidade da Pensilvânia, Philadelphia (NOWELL & HUNGERFORD, 1960).

Afirmava-se que o Ph era cromossomo pequeno e acrocêntrico, originário da deleção do braço longo do cromossomo 22. A princípio, este cromossomo foi observado em 9 casos, sendo posteriormente confirmado por outros estudiosos (GEARY, 2000).

Por mais de uma década, o cromossomo Ph foi a única alteração genética associada a uma neoplasia. Treze anos após a descoberta do cromossomo Ph, a pesquisadora Janet Rowley da Universidade de Chicago, encontrou que a porção do cromossomo 22 não era simplesmente deletada, mas translocada para a região terminal do cromossomo 9, caracterizando uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (ROWLEY, 1973; GEARY, 2000; RANDOLPH, 2005).

A descoberta do Ph foi uma ferramenta que tornou claro o diagnóstico da LMC. A introdução de técnicas de hibridação permitiu observar a translocação cromossômica em nível molecular (RANDOLPH, 2005).

2.5.2 O Gene *BCR-ABL1*

A primeira evidência de envolvimento de mecanismo molecular da LMC foi a formação do gene híbrido (*BCR-ABL1*), localizado no cromossomo 22q-. O gene normal *abl* (*c-abl*) localizado no cromossomo 9 é homólogo ao oncogene viral encontrado em leucemias murinas (*Abelson murine leukemia vírus, v-abl*). Posteriormente, foi demonstrado que o gene híbrido *BCR-ABL1* tinha a capacidade de transformar células em cultura e de ser oncogênico em experimentos de transfecção em ratos (MELO et al., 1999). O gene *ABL* normal codifica uma tirosina

quinase, que é ativa na transdução de sinal. O gene quimérico *BCR-ABL1* codifica uma tirosina quinase aberrante de peso molecular maior do que a codificada pela *ABL* (BAIN, 2002). Esta tirosina quinase liga-se ao ATP e transfere fosfato do ATP para resíduos de tirosina em proteínas específicas. Essas proteínas, agora fosforiladas, tornam-se responsáveis por toda uma série de etapas que levam aos defeitos fisiopatológicos observados na LMC. Por essa razão, se a ligação do ATP com essa tirosina quinase for bloqueada, toda a série de etapas envolvida também será bloqueada. Este mecanismo foi essencial para o desenvolvimento de uma terapia efetiva e seletiva para a LMC (DRUKER et al., 2000).

Na LMC, a fusão clássica dos genes *BCR* e *ABL* é a b2a2 ou b3a3, na qual o exon 2 (b2) ou o exon 3 (b3) do *BCR* e se funde ao exon 2 (a2) do *ABL*, gerando uma oncoproteína de peso molecular de 210 kDa (p210) (BAIN, 2002). Na leucemia linfóide aguda Ph positiva, ocorre uma fusão com produção de uma oncoproteína de menor peso molecular, a p190. O terceiro tipo de translocação gera uma oncoproteína de 230 kDa (p230), associada a uma leucemia neutrofílica rara, com poucas células precursoras circulantes (BAIN, 2002; SATTLER & GRIFFIN, 2003).

2.5.3 Vias de Sinalização Celular Ativadas por BCR-ABL1

A proteína p210BCR-ABL1 é a causa da patogênese da LMC clássica. Constituindo um domínio tirosina quinase ativado, a p210BCR-ABL1 tem papel crítico no desenvolvimento da LMC (WHITE et al., 2006).

O gene *ABL* selvagem codifica a proteína p145. Esta proteína expressa o domínio de tirosina quinase, ou seja, tem importante papel controlador do crescimento celular; e também está envolvida com a indução da apoptose e reparo do DNA (RANDOLPH, 2005).

A p145 é fortemente expressa em células hematopoéticas e participa do processo de transdução de sinais por vias bioquímicas, fosforilando e ativando proteínas nucleares (RANDOLPH, 2005).

O domínio receptor tirosina quinase tem importante papel na transdução de sinais e regulação do crescimento celular. Um segmento N-terminal da proteína ABL selvagem inclui 2 domínios homólogos SRC (SRC-kinase Homology.) , o SH2 e SH3. Estes domínios regulam a atividade tirosina quinase de ABL e fosforilação desencadeada por ela (FARDEL et al., 1999). Também está presente o domínio SH1 codificador da função de quinase da proteína *BCR-ABL1*, crucial para a transformação maligna da LMC (GOLDMAN et al., 2003).

Defeitos na integridade do domínio SH2 diminuem a ligação da fosfotirosina e reduzem a capacidade transformação de ABL (FARDEL et al., 1999), assim o SH2 é um mediador da interação desta fosfotirosina com outros domínios de quinase e substratos celulares (RANDOLPH, 2005).

O domínio SH3 é potencialmente inibitório da atividade quinase na proteína ABL selvagem. Portanto, se acredita que a substituição do primeiro exon da proteína por c-BCR elimine a função deste domínio. (RANDOLPH, 2005). A deleção do SH3, ao contrário de SH2, facilita a transformação maligna causada por ABL (FARDEL et al., 1999).

De acordo com Baselga, 2006, a sobreposição das seqüências codificadoras dos genes *BCR* e *ABL* impulsionam a atividade de tirosina quinase. Esta falta de controle ocasiona a expansão descontrolada dos clones hematopoéticos, suficiente para causar a leucemia. A estrutura da p210BCR-ABL1 permite a interação com diversas proteínas, isto é sugestivo do seu envolvimento em múltiplas vias de sinalização celular. Vários domínios de BCR-ABL1 servem para adaptar proteínas,

semelhantes a fator de crescimento, como a GRB2, CRKL, CBL, SHC e SRC. O domínio SH2 da proteína GRB2 conserva um resíduo de tirosina (Y177) do *BCR* na p210. O Y177 faz a conexão da p210 com a RAS, proteína envolvida com a diferenciação e regulação da proliferação celular, muito importante na patogênese da LMC. Os eventos de sinalização da RAS não estão bem elucidados, mas se sabe que envolvem as MAPKs ou proteínas quinases mitogênicas ativadas. É semelhante também, a ativação da JUN kinase (JNK), via que tem como terminação a ativação da SAPK, proteína quinase ativada por stress (FARDEL et al., 1999) (figura 2).

Vias como JAK-STAT, (*Janus kinase-signal transducers and activators of transcription*) e PI3 (*fosfatidil inositol-3 quinase*) também são fosforiladas na cascata desencadeada por BCR-ABL1, e estimulam o crescimento celular. A JAK-STAT ativa os fatores de transcrição STAT1 e STAT5. As ativações dos STAT's e de RAS contribuem para a proliferação celular independente do controle de citocinas que fazem a regulação normal do crescimento celular. A PI3 promove o aumento da expressão de *BCL-2* e fosforila STAT5, causando a resistência dos clones leucemogênicos à morte celular.(DEINIGER et al, 2000; RANDOLPH, 2005) (Figura 3).

Outra via envolvida na cascata de sinalização ativada pela p210 é a c-MYC, cujo papel na leucemogênese ainda não está claro (FARDEL et al., 1999). Podemos enfatizar que a BCR-ABL1 atua nos três mecanismos envolvidos na transformação maligna da LMC. O primeiro mecanismo é a ativação de vias de sinais mitogênicos, o segundo seria a redução do fator de crescimento dependente da apoptose, causada pela propriedade anti-apoptótica de BCR-ABL1 (DEINIGER et al., 2000; RANDOLPH, 2005) e o último mecanismo se deve a alteração da matriz e estroma medular, pois é sabido que a adesão do estroma regula negativamente a

proliferação celular, assim as células leucêmicas escapam disto (DEINIGER et al., 2000; RANDOLPH, 2005)(Figura 1).

O processo fisiológico de morte celular programada ou apoptose é importante na homeostase dos diferentes tecidos, inclusive, o hematopoético (MAURILLO et al., 2001). Quando este processo é iniciado desencadeia eventos moleculares que culminam na ativação de proteases, denominadas caspases, as quais fazem o desmantelamento e por fim, morte celular (SUDA et al., 1993). A BCR-ABL1 pode bloquear a liberação do citocromo C pela mitocôndria e assim a inibir as caspases. Este evento pode ser mediado pelas proteínas, família BCL2 anti-apoptóticas, BCLX-L e BAD pró-apoptótica. Todas estão envolvidas na inibição da apoptose da LMC (DEINIGER et al., 2000).

Figura 1: Mecanismos patogênicos desencadeados pelo BCR-ABL na LMC

Figura 2: Vias de sinalização celular ativadas pelo BCR-ABL (Deininger et al., 2000)

Figura 3: Vias mitogênicas ativadas pelo BCR-ABL (Deininger et al., 2000)

2.6 Tratamento Farmacológico

O tratamento da LMC baseia-se no emprego de quimioterápicos capazes de promover mielossupressão, levando a redução da leucocitose, da esplenomegalia e da hepatomegalia (BERGANTINI et al, 2005). A obtenção da resposta hematológica seguida da resposta citogenética e molecular são os principais objetivos do tratamento. Portanto, a avaliação da resposta terapêutica baseia-se em:

- Resposta hematológica completa: quando permanecem normais por quatro semanas, no mínimo, a medula óssea ($\leq 5\%$ de blastos (mielócitos ou metamielócitos); o sangue periférico ($< 10.000/\text{mm}^3$ e sem formas imaturas); e as plaquetas ($< 450.000/\text{mm}^3$), além de desaparecerem todos os sinais e sintomas da LMC (BACCARANI et al., 2009)
- Resposta citogenética completa: é definida como a ausência de metáfases Ph positivas em pelo menos 20 células analisadas (BACCARANI et al., 2009)

- Resposta molecular maior: redução de 3 logs ($\leq 0,1\%$) dos níveis de *BCR-ABL1* (BACCARANI et al., 2009)
- Resposta molecular completa: redução de 4,5 logs ($\leq 0,0032\%$) dos níveis de *BCR-ABL1* (BACCARANI et al., 2009)

Os quimioterápicos, Hidroxiuréia (Hydrea) e Bussulfan (Myleran) são medicações orais, que promovem remissão hematológica, mas não interferem no curso natural da doença, ou seja, não impedem a evolução para as fases acelerada e blástica. O interferon- α é uma medicação injetável (subcutânea) que pode proporcionar controle hematológico e citogenético completa nos pacientes, embora quase todos permaneçam com o rearranjo *BCR-ABL1*, evidenciado por técnicas moleculares. O mesilato de imatinibe (MI) é um medicamento oral, que pode levar a normalização do hemograma e a altas taxas de resposta citogenética e molecular. Entretanto, nem todos os pacientes têm boa resposta ao MI e alguns podem desenvolver resistência depois de algum tempo de uso (SOUZA & PAGNANO, 2004). Atualmente, o transplante de medula óssea (TMO) alogênico (aparentado ou não aparentado) é a única modalidade curativa de tratamento para LMC, por induzir remissão molecular com a eliminação dos transcritos *BCR-ABL1* (DOBBIN & GADELHA, 2002).

2.6.1. Hidroxiuréia (Hydrea®)

A Hidroxiuréia (HY) foi introduzida no tratamento da leucemia na década de 70; é um agente inibidor paliativo, que promove o controle da proliferação celular pela inibição da síntese do DNA, pois, atua na fase S do ciclo celular com ação específica na ribonucleotídeo redutase, interferindo assim na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, impedindo a divisão celular (SILVA & SHIMAUTI, 2006).

A HY não parece apresentar efeito sobre a via extrínseca da apoptose celular mas, como todo quimioterápico, é capaz de induzir a apoptose celular por meio do estresse celular e da ativação da via intrínseca (mitocondrial) (SOUZA & PAGNANO, 2004). Essa droga possui poucos efeitos colaterais tais como anemia megaloblástica, úlceras de mucosa e úlceras de perna, que só regredem com a suspensão da droga. A HY atinge um controle hematológico de 50 a 80% dos doentes. Entretanto, a remissão citogenética é rara e tem pouco ou nenhum efeito sobre a progressão da doença (LIMA, 2005).

2.6.2. Interferon- α

O Interferon- α (IFN- α) ou interferon leucocitário é uma citocina produzida por linfócito B, macrófagos e células NK (*Natural Killer*), com atividade antitumoral em malignidades hematológicas e outros tipos de câncer (VIANNA & ALMEIDA, 2006). Dos três grupos de interferons já identificados (interferon-alfa, interferon-beta e interferon-gama), o interferon-alfa é o que tem sido mais utilizado no tratamento de malignidades hematológicas e tumores sólidos. O IFN- α parece exercer um efeito imunomodulatório e antiproliferativo importante sobre as células mononucleares e precursoras (CD34⁺) dos pacientes de LMC. Parece restaurar o número de células da resposta imune circulante, promover ativação de células efectoras (TCD8 e NK) e estimular as células efectoras (TCD8, TCD4 e NK) a secretarem citocinas de padrão Th1 (IL-2 e IFN- γ). Todavia, seu efeito não se restringe apenas à ativação celular; o IFN- α potencializa a apoptose das células CD34⁺, por meio da elevação do número de células efectoras circulantes no sangue periférico que expressam o antígeno FasL (CD56/FasL e TCD8/FasL⁺) e do aumento da susceptibilidade da célula CD34⁺ à apoptose (aumento do número de células CD3/Fas⁺) (CASTRO et al., 2003).

Em resumo, o IFN- α possui um papel chave no impedimento do escape do clone maligno à resposta imune, exercendo-o por meio de dois mecanismos de ação complementares: a citorredução (antiproliferativa e potencialização da apoptose) e a capacidade de potencializar a resposta imune, mediada pelas células T e NK. Entretanto, associado à citarabina, aumenta significativamente a resposta citogenética e a sobrevida dos pacientes. (GUILHOT,1997).

As células na fase crônica da LMC são sensíveis a fatores de crescimento hematopoético e a citocinas. Doentes tratados com IFN- α podem ter significativa redução de células Ph positivas na medula óssea, chegando alguns a apresentar completa remissão citogenética, embora quase todos permaneçam com o rearranjo BCR-ABL, evidenciado por técnicas moleculares (GUILHOT,1997).

Os efeitos colaterais são comuns aos pacientes, devido a sua alta toxicidade. Um grande número de pacientes apresenta sintomas de gripe, dores musculares, fadiga, perda de peso. Porém, outros podem ocorrer alterações neuropsiquiátricas e auto-imunes, como hipotireoidismo ou hipertireoidismo. Muitas vezes esse tratamento leva a um sério comprometimento da qualidade de vida, levando a sua suspensão em quase 20% (VIANNA & ALMEIDA, 2006).

2.6.3 Mesilato de Imatinibe (MI) (Glivec®)

O mesilato de imatinibe - MI (Glivec®) é um derivado da fenilaminopirimidina, age como inibidor da tirosina quinase BCR-ABL1, que bloqueia diferentes vias de sinalização celular que estavam ativadas por esta proteína. Este inibe a ligação do ATP a essa enzima tirosina quinase, bloqueando uma série de etapas que levam aos efeitos fisiopatológicos observados na LMC (figura 4). O MI inibe especificamente a proliferação de células que expressam BCR-ABL1 em ratos, sugerindo que não é um agente antimitótico geral (GOLDMAN et al., 2003). Em

ensaios de formação de colônia usando células progenitoras *ex vivo* de pacientes com LMC, o MI mostrou inibição seletiva de colônias BCR-ABL1 positivas. Além disso, o MI é um potente inibidor de receptor do fator de crescimento de origem plaquetária (PDGF-R), de c-Kit, o receptor SCF, de cFms, do receptor para fator estimulante de macrófagos (M-CSF) (CORTES et al., 2006). Por outro lado, o MI não afeta a transdução do sinal mediado por outros estímulos incluindo fator de crescimento epidérmico, insulina e ésteres de forbol. *In vivo*, o composto mostra atividade antitumoral como um agente único em modelos animais em doses bem toleradas (GOLDMAN et al., 2003).

O MI é bem absorvido e rapidamente depurado em todas as espécies investigadas. Ocorre extensa distribuição tecidual do MI e de seus metabólitos, que mostrou afinidade reversível com o tecido contendo melanina, por exemplo, pele, membranas oculares e cabelo. A ligação do MI a proteínas plasmáticas *in vitro* é de 89-96%, principalmente com a albumina (GOLDMAN et al., 2003).

O principal metabólito do MI é o CGP 74588 que foi observado em animais e em seres humanos. O MI é metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 3A4 e 3A5 (CYP3A4/5). É um inibidor competitivo de CYP3A4/5, CYP2D6 e CYP2C9, com valores K_i indicando que é possível a inibição do metabolismo dependente de CYP3A4/5 ou CYP2D6 de medicações administradas concomitantemente (DRUKER et al., 2000).

A biodisponibilidade média absoluta de MI é de 98% quando administrado na forma de cápsulas. O aumento na área sob a curva (AUC) foi linear e proporcional a dose na faixa de dose entre 25-1000 mg após administração oral (GOLDMAN et al., 2003). Não houve alteração na cinética quando utilizado em doses repetidas, e o acúmulo no organismo foi de cerca de 1,5 a 3 vezes (no estado de equilíbrio)

quando administrado uma vez por dia. Apenas 13% do MI é excretado na urina. A farmacocinética do MI não foi alterada segundo a idade ou o gênero (GOLDMAN et al., 2003).

Figura 4 : Mecanismo de ação do MI (GOLDMAN et al., 2003)

2.6.3.1 Estudo IRIS

A melhor evidência demonstrando uma relação entre repostas citogenéticas e moleculares conseguidas com pacientes de LMC tratados com o MI e o risco de progressão foi obtida pelo *Internacional Study of Interferon versus STI571*. [Estudo Internacional randomizado de Interferon contra STI571] (IRIS). Tratou-se de um ensaio prospectivo, randomizado e de fase III de pacientes recentemente diagnosticados em fase crônica com LMC que comparou 553 pacientes tratados com MI com 553 pacientes tratados com a droga interferon-alfa mais citarabina. Neste ensaio, 400 mg diários do agente único MI demonstraram superioridade sobre

a combinação de interferon-alfa mais citarabina. O MI se saiu significativamente melhor ($P= 0,0001$) do que o esquema combinado e poucos pacientes permaneceram no braço recebendo interferon (O'BRIEN et al., 2003). No acompanhamento de 8 anos dos pacientes tratados com MI no estudo IRIS, os resultados indicavam que a taxa de respostas citogenéticas completas (RCC) aumentou com o passar do tempo e 82 % dos pacientes conseguiram uma RCC. Além disso, a taxa relatada para a sobrevivência livre de progressão em pacientes que apresentavam RCC tomando MI em 8 anos foi de 92% (DEININGER et al., 2009).

Os dados moleculares recolhidos com o IRIS geraram poderosas informações sobre o valor prognóstico de obter uma resposta molecular maior (redução ≥ 3 -log de *BCR-ABL1*), acima e abaixo dos excelentes achados para resposta citogenéticas (HUGHES et al., 2003). Os níveis de transcrito *BCR-ABL1* após 12 meses de terapia com MI declinaram no geral em ≥ 1.000 vezes (3 log) em 40% dos pacientes em comparação com somente 2% daqueles recebendo interferon-alfa mais citarabina (DRUKER et al., 2006). Em pacientes que conseguiram uma RCC e uma redução nos níveis de transcrito de ≥ 3 log em 1 ano, a probabilidade de sobrevivência livre de progressão com 30 meses foi de 100% (DRUKER et al., 2006).

Os achados deste estudo representam um grande progresso e estabelecem uma meta terapêutica ideal de terapia para a LMC, uma redução ≥ 3 log nos níveis de transcrito *BCR-ABL1*. Ao mesmo tempo, entretanto, deve ser ressaltado que o MI não erradica o clone leucêmico (MELO et al., 2003), nos resultados deste estudo apenas 12% dos pacientes com RCC conseguiram uma redução na carga da doença até níveis indetectáveis de transcrito *BCR-ABL1*. (redução $\geq 4,5$ log) (HOCHHAUS et al., 2009). Dados atuais do IRIS postulam que pacientes que

interrompem a terapia com MI, mesmo apresentando níveis indetectáveis do transcrito *BCR-ABL1* provavelmente terão recidiva (HOCHHAUS et al., 2009).

2.7 Interação com transportadores de membrana

Diversos estudos mostraram que o MI é um substrato de transportadores de membrana da classe *ATP binding cassette* (ABC), como o ABCB1 (também chamado de MDR1 ou P-gp) e ABCG2 (também chamado de MXR ou BCRP) que estão relacionados ao efluxo de drogas (HEGEDUS et al., 2002; HAMADA et al., 2003; BURGER et al., 2004; BREEDVELD et al., 2005). Outros estudos demonstraram que expressões elevadas do gene *ABCB1* foram associadas as menores concentrações intracelulares do MI, diminuindo o efeito antiproliferativo e que o uso de inibidores de ABCB1 (verapamil) restaurou as concentrações intracelulares de MI (MAHON et al., 2000; HAMADA et al., 2003; BURGER et al., 2004).

Tem sido proposto que a expressão de *ABCB1* pode não apenas desempenhar um papel de resistência celular de células tumorais ao MI, mas também pode afetar sua captação cerebral. De fato, o uso de camundongos nocautes para os genes *ABCB1* ou a administração concomitantes de inibidores de ABCB1 resultou em menor penetração do MI no cérebro (BREEDVELD 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, uma vez que estas células apresentaram menores concentrações intracelulares de MI, provavelmente pelo maior efluxo mediado pelos transportadores ABCB1 (BURGER et al., 2004), o que poderia explicar os mecanismos de resistência a droga.

2.8 Características do gene *ABCB1* e da proteína codificada por este gene

2.8.1 *ABCB1*

A quimioterapia é o principal tratamento para cânceres sistêmicos, os quais não podem ser curados por cirurgia ou radioterapia. Embora estes métodos possam ser eficazes em alguns casos, a maior parte dos cânceres metastáticos se apresenta resistente a quimioterapia ou, embora responda ao tratamento inicialmente, retorna como um câncer que adquiriu resistência. Esse fenômeno recebeu o nome de resistência a múltiplas drogas por abranger um amplo espectro de agentes citotóxicos (KESSEL et al., 1965).

Uma das características observadas no fenótipo MDR de células cancerosas é a resistência cruzada a drogas que não apresentam relação estrutural ou funcional. Foi observado que células que apresentavam o fenótipo de resistência a múltiplas drogas apresentavam também um aumento da expressão da glicoproteína P (P-gp). A glicoproteína P pertence a subfamília ABCB da superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), que compreende proteínas que transportam uma ampla variedade de substratos, tais como açúcares, aminoácidos, peptídios, íons inorgânicos, além de diversos compostos hidrofóbicos e metabólicos (DEAN et al., 2001).

São conhecidas várias isoformas da glicoproteína P, classificadas em classe I, II, III. As classes I e II estão relacionadas à resistência de múltiplas drogas, enquanto a classe III está envolvida no transporte de fosfolipídeos (DEY, 2006). Em humanos, são descritas duas isoformas, MDR1 (classe 1) e MDR3 (classe 3) codificadas respectivamente pelos genes *ABCB1* e *ABCB4* (GOTTESMAN & PASTAN, 1993). Há uma alta identidade de seqüência entre isoformas humanas, a despeito das diferenças na função de transporte que apresentam, e mesmo entre genes MDR humanos e murinos é observado uma alta homologia. O gene *ABCB1*,

está localizado em 7q21.1 (CALLEN et al., 1987) e é constituído por uma região promotora de 29 exons, totalizando 209 kb (BODOR et al. , 2005)

A estrutura da P-gp consiste de duas metades homólogas constituídas por um domínio transmembrana com seis segmentos hidrofóbicos e um domínio citoplasmático com um sítio de ligação para ATP, totalizando 1280 aminoácidos e 170 KDa (JULIANO&LING, 1976). São conhecidos pelo menos dois eventos pós-transcricionais para P-gp, sendo este glicosilação e fosforilação (GOTTESMANN et al., 1995). Rosenberg et al., 1997, analisaram proteínas isoladas de células de ovário de hamster, sugerindo que a P-gp se assemelha a um cilindro com cerca de 10 nm de diâmetro e até 8 nm de comprimento, com um poro central de 5 nm e atua como bomba de efluxo de drogas dependente de energia (figura 5).

Embora tenha sido inicialmente detectada em células tumorais, a P-gp é também expressa em células de tecidos normais. No trato gastrointestinal, a primeira barreira de defesa do corpo contra a exposição oral a drogas e toxinas, a P-gp apresenta gradiente de expressão crescente do estômago em direção ao duodeno e está presente na membrana apical do epitélio. Hepatócitos apresentam P-gp na superfície canalicular apical e se propõe que façam a excreção para a bile de xenobióticos que não tenham sido eliminados no intestino (LESLIE et al. , 2005). Nos rins, a P-gp é encontrada na superfície apical das células epiteliais dos túbulos proximais, onde medeia a exportação de xenobióticos do sangue para a urina. A atividade da P-gp no fígado e rins parece estar relacionada a eliminação de drogas (KUSUHARA et al.,1998), enquanto no intestino, reduz a absorção das mesmas (WATKINS, 1997).

Figura 5: Imagem tridimensional da glicoproteína P (MARZOLINI et al, 2004)

2.8.2 Polimorfismos no gene *ABCB1*

Variações na forma como diferentes indivíduos respondem a tratamentos farmacológicos são comumente observadas e podem resultar, por exemplo, de variações genéticas em enzimas de metabolização e em proteínas de transporte de drogas (BODOR et al. , 2005). Uma vez que a P-gp é um transportador envolvido na eliminação e absorção de um amplo espectro de drogas, variações em sua atividade ou em sua expressão podem afetar a farmacocinética de medicamentos, reduzindo ou aumentando sua biodisponibilidade. Uma das formas mais comumente estudadas

de variação genética são os polimorfismos moleculares, especialmente os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) (BODOR et al. , 2005).

Hoffmeyer et al., 2000, descreveram 15 SNPs para o gene *ABCB1* e hoje são conhecidos pelo menos 1279 SNPs neste gene, sendo 50 deles na região codificadora (FUNG et al.,2009). O número e a frequência destes SNPs variam pela etnia. Excluindo os SNPs com uma frequência alélica inferior a 5%, foram observados 124 SNPs em caucasianos, 134 em afrodescendentes, 153 em chineses e 166 em japoneses(FUNG et al.,2009).

Destes polimorfismos descritos, três tem sido especialmente estudados, sendo dois silenciosos C1236T, C3435T e um promotor de duas distintas mudanças de aminoácido G2677T/A (Ala893Ser/Thr). Indivíduos caucasianos e asiáticos apresentam maior frequência para o alelo 3435T (37 a 66%) em relação a indivíduos de origem africana (10 a 27%). Por outro lado, a frequência do alelo 2677A é maior em japoneses (15 a 22%) em relação aos caucasianos (2 a 4%)(RODRIGUES et al., 2005). O alelo 1236T é mais frequentemente observado em Asiáticos em comparação aos caucasianos (TANABE et al., 2001)

Demonstrou estudo realizado por Hoffmeyer et al., 2000,em 21 pacientes, que indivíduos com o genótipo homozigoto para o alelo C do polimorfismo C3435T tinham menores concentrações plasmáticas de digoxina, um conhecido substrato da P-gp, do que pessoas com o genótipo homozigoto para o alelo T e/ou com genótipo heterozigoto para este polimorfismo (C3435T). Isto estaria relacionado com uma maior expressão do gene *ABCB1* e, conseqüentemente, uma maior atividade da P-gp, nos indivíduos com o genótipo CC.

Wang et al., 2005, observaram que o alelo T na posição 3435 causa uma redução na expressão de RNAm em amostras de fígado humano, sugerindo que isto

ocorra devido a um efeito deste alelo na estrutura secundária da molécula, afetando a estabilidade do RNAm. Os autores analisaram combinações genótípicas dos três principais polimorfismos, C1236T, G2677T/A e C3435T, observando que apenas 3435T está envolvido neste processo. Outro estudo realizado em pacientes HIV positivos, o genótipo 3435TT foi associado a uma menor expressão do gene *ABCB1* em células mononucleares do sangue periférico e à baixa concentração dos fármacos antivirais (nelfinavir e efavirenz) (FELLAY et al, 2002).

O polimorfismo G2677T/A também foi associado com variações da atividade da P-gp. Experimentos *in vitro* mostraram que células expressando o alelo 2677T apresentavam um aumento na absorção de digoxina quando comparada as que expressavam o alelo 2677G. Além disso, indivíduos portadores do alelo 2677T tinham uma maior atividade de P-gp, medida através da concentração plasmática de fexofenadina, do que aqueles com o alelo 2677G (KIM et al.,2001) Moriya et al., 2002, demonstrou que a expressão de RNAm de *ABCB1* era maior em enterócitos duodenais de indivíduos portadores dos alelos 2677T e 2677A.

Ni et al., 2010 estudaram em 52 pacientes portadores de LMC em uso de MI a associação dos polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T com a resposta citogenética, mostrando que 75% dos pacientes homozigotos para o alelo 1236T eram resistentes ao tratamento contra 31,3% dos outros genótipos, contradizendo os dados relatados por Dulucq et al., 2008 (n=90) onde se observou que o o alelo 1236T era preditivo para a resposta molecular maior. Ilmer et al., 2002 observou também que o genótipo TT dos polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T estão relacionados a uma maior sobrevida em pacientes com leucemia mieloide aguda.

2.9 Indução de Resistência ao Mesilato Imatinibe (Glivec®)

A fase da doença em pacientes com LMC é um fator importante na resposta ao MI. Este fármaco é muito eficiente na fase crônica da LMC devido a presença do BCR-ABL1 pela inibição seletiva desta droga. No entanto, na fase acelerada da LMC ou na LLA Ph+, a combinação de um alto número de células tumorais em proliferação e a instabilidade genética pode levar a um aumento da chance de ocorrência de alterações genéticas secundárias (mutações no gene *BCR-ABL1*, alterações cromossomais tais como: trissomia do 8, deleção do 11q-, entre outras). Vários estudos, realizados nos últimos anos, têm tentado elucidar os mecanismos que expliquem a resistência ao tratamento com MI; (MAHON et al., 2000; BLAGOSKLONNY et al., 2002; JONGENSEN et al., 2002; CROSSMAN et al., 2005; HOCHHLAUS et al., 2007).

Estudos *in vitro* realizados com linhagens celulares resistentes ao MI mostraram que estas apresentam superexpressão do gene *BCR-ABL1* (WEISBERG et al., 2000, MAHON et al., 2000). Além disso, foi descrita a presença de mais 40 mutações neste gene que podem prejudicar a ligação do MI ao BCR-ABL1, seja por interferência no sítio de ligação ou por meio de uma configuração de BCR-ABL1 com afinidade de ligação reduzida para o MI (HOCHHLAUS et al., 2007)(Figura 6).

Dentre as mutações descritas, a T315I causada pela substituição de uma treonina por uma isoleucina, foi relacionada como de mau prognóstico por causar resistência ao MI em pacientes com LMC (RICCI et al., 2002).

Figura 6 : Mapa das mutações no domínio quinase do gene *BCR-ABL1* relacionadas a resistência ao MI. 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 (MELO et al, 2007)

Alguns estudos têm utilizados cultura de células para avaliação a resistência ao MI. A linhagem de células K562 apresenta apenas o rearranjo *BCR-ABL1*, portanto tem sido utilizada para avaliação da fase crônica da doença. A linhagem celular K562/ADM apresenta rearranjo *BCR-ABL1* positivo e alta expressão do gene *ABCB1* é utilizada em ensaios de cultura celular como modelo de crise blástica. KOTAKI et al., 2003 mostraram que células K562/ADM eram mais resistentes aos efeitos antiproliferativos e apoptóticos do MI do que as células K562, provavelmente por conta da alta expressão do gene *ABCB1*. Outro estudo realizado com células K562/ADM mostrou que o uso do inibidor de *ABCB1* MS-209 reduziu o número de progenitores leucêmicos, aumentou a apoptose e aumentou a inibição da transdução de sinal (MAHON et al., 2003). Illmer et al., 2004 confirmaram esses achados em outras linhagens celulares (K562/DOX, K562/VP16 e AR230/MDR), observando que o uso de inibidores de *ABCB1* alteravam o fenótipo resistente ao MI.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a relação dos polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T no gene *ABCB1* com marcadores de resposta ao MI, em indivíduos com LMC.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as frequências dos genótipos dos polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T no gene *ABCB1* em portadores de LMC tratados com MI;
- Estudar a associação dos polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T no gene *ABCB1* e a resposta citogenética e molecular dos pacientes com LMC tratados com o MI.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram incluídos 118 pacientes portadores de LMC de ambos os sexos com idades entre 18 e 80 anos, provenientes do Hospital Brigadeiro e da Santa Casa de São Paulo. Foram constituídos dois grupos, um constituído de 70 pacientes que obtiveram resposta citogenética completa com a dose padrão de MI (400 mg/dia) (Glivec®) em até 18 meses de tratamento, o segundo, constituído por 48 pacientes com LMC que não obtiveram resposta citogenética completa com a dose inicial (400 mg/dia) de MI ou que perderam esta resposta ao longo do tratamento e foram rescalonados para doses de 600 ou 800 mg/dia.

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

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.

Foi aplicado um questionário a cada paciente contendo as seguintes informações: idade, gênero, 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 MI e risco Sokal.

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 BCR-ABL 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 (400mg/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

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos homens e mulheres maiores de 18 anos com diagnóstico de LMC, portadores de cromossomo Ph (diagnóstico feito por análise citogenética) e que foram tratados com o MI (400 mg/dia) por pelo menos seis meses, com aderência ao tratamento. Não foram incluídos os pacientes que tinham a causa da resistência ao MI identificada. Foram excluídos os portadores de outras alterações nos cromossomos diferente do cromossomo Ph, que tenham sido detectados na análise citogenética. Todos os pacientes que apresentaram resistência ao MI realizaram pesquisa de mutações no gene *BCR-ABL1*, de acordo com o protocolo de tratamento do Hospital Brigadeiro e da Santa Casa de São Paulo. Foram excluídos 2 pacientes que possuíam mutação no *BCR-ABL1* (E255K e G250E).

4.3 Aspectos Éticos

Os pacientes portadores de LMC 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 e 3**).

4.4 Amostras Biológicas

Foram coletados 25 mL de sangue, uma única vez, de cada paciente em tubos a vácuo BD Vacutainer System[®] contendo o anticoagulante K₃EDTA que foram utilizados para a extração de DNA para análise dos polimorfismos no gene *ABCB1* e quantificação do transcrito *BCR-ABL1*.

4.5 Análise citogenética para pesquisa de alterações cromossomais

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 et al., 1997.

O material aspirado foi colocado em frascos de cultura (Falcon-Becton Dickison NJ, USA), meio composto de RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA) quantidade suficiente para 5mL, 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 5.000U/mL de penicilina G sódica e 5.000 ug/mL de sulfato de estreptomicina em 0,85% de solução salina, Gibco-BRL, NY, USA) e incubadas em estufa (Hepa Filtered incubator, Forma scientific, USA) a 37°C.

Após 24 horas de incubação, os frascos eram retirados da incubadora e o material transferido para tubos cônicos para centrifuga de 15 mL (Cornig, USA), e adicionado 0,1 ML de colchicina (Gibco-BRL, NY, USA). Os frascos eram homogeneizados e incubados a 37°C em banho-maria (Fanem-modelo 100, São Paulo, Brasil) por aproximadamente uma hora e depois centrifugados a 2000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante era desprezado com auxílio de pipeta pasteur descartável e o precipitado ressuspenso.

Ao material ressuspenso, era acrescentado uma quantidade de solução hipotônica (0,075M de cloreto de potássio, Merck, Rio de Janeiro, Brasil) ate completar 10 mL. Os frascos eram 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 eram lavadas 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 era desprezado e o precipitado ressuspenso em um volume final de uma dois mL.

A partir do material fixado, uma gota era pingada sobre uma lamina limpa (Perfecta, São Paulo). Rapidamente esta lamina era exposta ao bico de Bunsen. As gotas foram lançadas a uma distancia de 15 cm, pois, para esses casos, onde foi efetuada a estimulação através de agentes mitóticos, os cromossomos se dispersam com muita facilidade.

Após gotejamento do material nas laminas, essas eram embrulhadas em papel Flor Post (Ripel, São Paulo, Brasil) e permaneciam assim por 3 a 10 dias. Esta espera é sempre necessária para o envelhecimento da lamina, o que ajuda o bandeamento 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) de 1995.

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.

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

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

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 como para o gene interno padrão, controle negativo, controle positivo e branco foram realizadas uma única vez em cada corrida. Para cada amostra a reação foi realizada com volume final de 15 µL.

Os ciclos para amplificação das amostras foram o seguinte: 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 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 de 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 portadores de 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-ABL1*.

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.

4.7 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% em tampão TE (Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2,0 mM, pH 8,0) em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 4 µL de DNA e 1 µL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100V por 30 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). A visualização das bandas formadas foi feita sob luz UV após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A fotodocumentação do gel foi realizada pelo sistema de captura de imagem ChemImager™ 4400 (v5.5), parte integrante do sistema de digitalização de imagens MultiImage™ Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA).

A quantificação do DNA 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).

4.8 Avaliação de polimorfismos no gene *ABCB1*

Para a determinação dos genótipos foi utilizada a técnica de PCR-RFLP. A seguir, estão descritas informações sobre a genotipagem dos polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A do gene *ABCB1*. Para todos os ensaios de PCR foram realizadas com volume final de 50 µL contendo 200 µM de cada primer, 1 U de Taq Polimerase e tampão 10X (contendo 2mM de MgCl₂). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE de 0,5 X [Tris-HCl 45 mM, H₂BO₃ 45 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0)]. A separação eletroforética foi realizada durante 30 minutos, a 100V, 60 mA em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA) empregando fontes EPS 301 (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). As bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5mg/mL), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001)

Como controle de qualidade, a leitura dos genótipos de cada polimorfismo foi realizada por dois observadores diferentes. Dez amostras que já tinham sido previamente genotipadas através do método utilizado em nosso laboratório foram repetidas e confirmadas por sequenciamento de DNA para os polimorfismos *ABCB1* C1236T, G2677T/A e C3435T.

4.8.1 Determinação dos genótipos para o polimorfismo *ABCB1* C1236T

A determinação do genótipo para o polimorfismo *ABCB1* C1236T foi realizada por amplificação do fragmento de interesse, por reação em cadeia pela polimerase (PCR), seguida de restrição enzimática utilizando a enzima *HaeIII* (New England BioLabs Inc.). Os iniciadores utilizados são aqueles descritos por Cascorbi et al., 2001. O tamanho do fragmento amplificado foi 366 pb. O programa de amplificação utilizado foi desnaturação

inicial à 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificação (desnaturação à 94°C por 30 segundos, hibridação à 60°C durante 30 segundos e extensão final à 72°C por 30 segundos) e extensão final à 72°C por 7 minutos. Após confirmação da amplificação um volume de 20 µL do produto da PCR foi incubado a 37 °C com 5U de *HaeIII* por 3 horas. A identificação dos fragmentos obtidos após a ação da enzima de restrição foi realizada por separação em gel de agarose a 3% submerso em tampão TBE 0,5X (Tris-EDTA-Borato). Para a observação do tamanho dos fragmentos e fotodocumentação do gel foi utilizado o mesmo procedimento descrito para a observação dos produtos de PCR. O genótipo CC apresenta fragmentos de 269 pb, 62 pb e 35 pb; o genótipo TT apresenta fragmentos 269 pb, e 97 pb; e o heterozigoto (CT) apresenta 269 pb, 97 pb, 62 pb. e 35 pb conforme mostra a figura 7.

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos da PCR digeridos pela enzima de restrição *HaeIII* do polimorfismo C1236T após coloração com brometo de etídeo. Genótipos: **1= CT; 2= TT; 3= CT; 4= CC; 5= CT; 6= CC; 7=CT; *** marcador de tamanho de DNA de 50 pares de base.

4.8.2 Determinação dos genótipos para o polimorfismo *ABCB1* C3435T

A genotipagem do polimorfismo *ABCB1* (C3435T) foi realizada por amplificação do fragmento de interesse, utilizando os iniciadores descritos por Rodrigues et al., 2005. O tamanho do fragmento amplificado foi 302 pb, a digestão foi feita pela enzima de restrição *Mbol* (New England BioLabs Inc.). O programa de amplificação utilizado foi desnaturação inicial à 96°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 95°C por 45 segundos, hibridação à 62°C durante 45 segundos e extensão final à 72°C por 1 minuto) e extensão final à 72°C por 7 minutos. Após confirmação da amplificação um volume de 20 µL do produto da PCR foi incubado a 37 °C com 5U de *Mbol* por 3 horas. A identificação dos fragmentos obtidos após a ação da enzima de restrição foi realizada por separação em gel de agarose a 3% submerso em tampão TBE0,5X (Tris-EDTA-Borato). Para a observação do tamanho dos fragmentos e fotodocumentação do gel foi utilizado o mesmo procedimento descrito para a observação dos produtos de PCR. O genótipo homozigoto selvagem (CC) apresenta fragmentos de 88 pb, 172 pb e 42 pb; o genótipo homozigoto mutado (TT) apresenta fragmentos de 214 pb e 88 pb; por fim o genótipo heterozigoto (CT) apresenta 88 pb, 214 pb. e 172 pb e 42 pb, conforme mostra figura 8.

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos da PCR digeridos pela enzima de restrição *MboI* do polimorfismo C3435T após coloração com brometo de etídeo.

Genótipos: 1= CT; 2= TT; 3= CT; 4= CC; 5= CT; 6= TT; *: marcador de tamanho de DNA de 50 pares de base.

4.8.3 Determinação dos genótipos para o polimorfismo *ABCB1* G2677T/A

Para a determinação deste polimorfismo foram realizadas duas etapas, a primeira para determinação dos indivíduos que apresentavam o alelo T e, na segunda, para confirmação dos indivíduos que apresentavam o alelo A. Na identificação do alelo T, foram utilizados os primers descritos por Rodrigues et al., 2005 para amplificação de um fragmento de 231 pb. O programa de amplificação utilizado foi o mesmo utilizado para genotipagem do polimorfismo C1236T, apenas com a temperatura de anelamento dos primers ocorrendo a 58 °C. Após confirmação da amplificação um volume de 20 µL foi encubado a 37 °C com 5U de *BshnI* (New England BioLabs Inc.) por 3 horas. A

identificação dos fragmentos obtidos após a ação da enzima de restrição foi realizada por separação em gel de poliacrilamida a 8% submerso em tampão TBE1X (Tris-EDTA-Borato). Para a observação do tamanho dos fragmentos no gel foi utilizada a técnica de coloração com nitrato de prata (AgNO_3) e a fotodocumentação foi realizada por fotografia em luz branca. O genótipo GG apresenta um fragmento de 204 pb, o genótipo TT apresenta um fragmento de 231 pb e o genótipo GT apresenta fragmentos de 231 pb e 204 pb conforme mostra a figura 9.

Na identificação do alelo A, foram utilizados os primers descritos por Rodrigues et al., 2005 para amplificação de um fragmento de 231 pb. O programa de amplificação utilizado foi o mesmo utilizado para genotipagem do polimorfismo C1236T, apenas com a temperatura de anelamento dos primers ocorrendo a 60 °C. Após confirmação da amplificação um volume de 20 µL foi encubado a 37 °C com 5U de *RsaI* (New England BioLabs Inc.) por 3 horas. A identificação dos fragmentos obtidos após a ação da enzima de restrição foi realizada por separação em gel de poliacrilamida a 8% submerso em tampão TBE1X (Tris-EDTA-Borato). Para a observação do tamanho dos fragmentos no gel foi utilizada a técnica de coloração com nitrato de prata (AgNO_3) e a fotodocumentação foi realizada por fotografia em luz branca. O genótipo GG apresenta um fragmento de 124 pb e 107 pb, o genótipo GA apresenta um fragmento de 124 pb, 107 pb, 82 e 25 pb e o genótipo AA apresenta fragmentos de 124 pb, 82 pb e 25 pb conforme mostra a figura 9.

Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% dos produtos da PCR digeridos pelas enzimas de restrição *BshnI* e *RsaI* Genótipos: 1=TA ; 2= TA; 3= GT; 4=GG ; 5= GG; 6= GG; 7=TT;8= GT ; : *marcador de tamanho de DNA de 50 pares de base.

4.9 Análises Estatísticas

O banco de dados e as análises estatísticas foram realizados utilizando o programa computacional SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

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

A avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi determinada em pacientes portadores de LMC e controles utilizando o Programa MS-DOS QBasic V.1.1 (Microsoft Informática Ltda., São Paulo, Brasil).

As médias das variáveis numéricas (idade, número de hemácias, de leucócitos, de plaquetas e tempo de diagnóstico) foram comparadas utilizando o teste t de Student. Para as frequências das variáveis categóricas (tratamento anterior ao MI, resposta ao MI, respostas citogenética e molecular) foram realizadas pelos testes de Qui-quadrado, teste Exato de Fischer ou Likelihood ratio..

Modelos de regressão logística univariada foram utilizados para avaliar a associação dos genótipos e/ou de alelos variantes dos polimorfismos estudados a probabilidade de desenvolver LMC. Também foram utilizados estes modelos para determinar a probabilidade de atingir a resposta molecular maior ou a resposta molecular completa (variáveis dependentes) segundo os haplótipos para os polimorfismos *ABCB1* C1236T, G2677T/A e C3435T (variável independente).

No intuito de aumentar o poder estatístico, os outros haplótipos diferentes do haplótipo 1236CT/2677GT/3435CT, para os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1*, foram agrupados e denominado como outros. Estas frequências foram mostradas em gráficos utilizando as frequências relativas e os *Odds ratios* com seus respectivos intervalos de confiança de 95%, cujos modelos de regressão logística tiveram como variável dependente ter a resposta molecular maior ou completa e como variáveis independentes os haplótipos para os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1* (haplótipo 1236CT/2677GT/3435CT versus outros). O haplótipo outros foi considerado referência.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.050$

5. RESULTADOS

5.1 Dados dos pacientes portadores de LMC

Foram incluídos 118 pacientes portadores de LMC sendo 63 homens e 55 mulheres. Todos os pacientes estavam na fase crônica da doença.

Destes pacientes, 59,3% (N=70) eram 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 tratamento (em média) vieram a perder a resposta (resistência secundária).

As características destes indivíduos estão descritas na **Tabela 1**. 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 Hidroxiuréia. O risco Sokal foi avaliado em apenas 78 pacientes, sendo 28,2% baixo risco, 52,5% risco intermediário e 19,3% alto risco.

Os pacientes portadores de LMC apresentaram distribuições similares quanto à idade, escolaridade, cor da pele, índice massa corpórea (IMC), renda per capita, tempo de diagnóstico, medicações anteriores, número de células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas) e resposta ao MI ($p>0,050$), segundo o gênero. Dentre as variáveis estudadas, apenas o fato de ter ocupação foi diferente entre os gêneros ($p<0,001$). A grande maioria das mulheres estudadas era dona de casa. Não foram observadas ocupações associadas à lavoura ou uso de agrotóxicos e toda população vivia em zona urbana.

Tabela 1 – Distribuição da idade, cor de pele, número de células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas), tempo de diagnóstico, tratamento prévio e resposta ao MI dos pacientes portadores de LMC incluídos no estudo

	Total	Homens N=63	Mulheres N= 55	P valor
Idade (anos completos)*	49,9 (±17,3)	52,5 (± 13,1)	47,3 (± 15,5)	0,203
Cor da pele				
Branca	95 (80,5)	49 (77,8)	46 (83,6)	0,862
Parda	13 (11,0)	8 (12,7)	5 (9,1)	
Negra	8 (6,7)	5 (7,9)	3 (5,5)	
Amarela	2 (1,7)	1 (1,6)	1 (1,8)	
Hemácias (.10 ⁶ /mm3)*	3,87 (±0,70)	4,04 (±0,63)	3,70 (±0,43)	0,202
Leucócitos (/mm3)*	5.350 (±2.400)	5.600 (±2.500)	5.100 (±2.300)	0,897
Plaquetas (.10 ³ /mm3)*	192 (±85,5)	188 (± 82,9)	197 (± 81,21)	0,503
Tempo de diagnóstico (meses)*	75,4 (±43,3)	77,7 (± 47,9)	72,9 (± 39,8)	0,739
Tratamento anterior ao MI**				
Hidroxiuréia	40 (34,5)	20 (32,3)	20 (37)	0,365
Interferon-α	7 (6,0)	6 (9,7)	1 (1,9)	
Hidroxiuréia+	63 (54,3)	33 (53,2)	30 (55,6)	
Interferon-α	6 (5,2)	3 (4,8)	3 (5,6)	
Nenhum				
Resposta ao MI**				
Respondedor	70 (59,3)	34 (54)	36 (65,5)	0,205
Não Respondedor	48 (40,7)	29 (46)	19 (34,5)	

* Os valores são médias (± desvio-padrão) e ** frequências absolutas e relativas entre parenteses
As comparações foram realizadas entre os gêneros (*teste t de *Student* ou **teste de Qui quadrado)

5.2 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 2**. As respostas citogenética, molecular maior e molecular completa foram diferentes entre os pacientes respondedores e não respondedores ($p < 0,050$).

Tabela 2 – Avaliação da resposta ao tratamento ao MI dos pacientes incluídos no estudo segundo critérios da *European Leukemianet*

	Total de Pacientes	Respondedor	Não Respondedor	P valor
	N=118	N=70	N=48	
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).

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

5.3 Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos

A distribuição dos genótipos e de alelos dos polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1* nos indivíduos portadores de LMC e dos controles estudados está apresentada na **Tabela 3**. Foram observadas as seguintes frequências de alelos mutados nos pacientes com LMC, 1236T= 41,1%, 3435T=

37,3%, 2677T= 32,2% e 2677A=2,1% e nos controles 1236T= 36,6%, 3435T= 40%, 2677T= 32,9% e 2677A=2,9% (**Tabela 3**). Nenhum paciente ou controle apresentou genótipo *ABCB1* 2677AA.

A distribuição dos genótipos (dos portadores de 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 todos os polimorfismos estudados. Também não foi observada diferença na distribuição dos genótipos segundo o gênero para ambos os grupos ($p>0,050$). Os genótipos e os alelos variantes dos polimorfismos estudados não foram associados ao risco de ter leucemia mieloide crônica através da análise de regressão logística.

Quando o grupo de pacientes com LMC foi classificado segundo a cor da pele, em branco e não brancos (negros, pardos e amarelos), não foi encontrada diferença significativa em relação à distribuição dos genótipos e de alelos ($p>0,050$).

Os haplótipos do gene *ABCB1* (para os polimorfismos C1236T/ C3435T/ G2677T/A) mais frequentes para o grupo LMC foram: 1236CT/ 3435CT/ 2677GT (39,8%); 1236CC/ 3435CC/ 2677GG (23,7%) e outros haplótipos (36,4%). Já para o grupo controle, os haplótipos mais frequentes foram: 1236CT/ 3435CT/ 2677GT (23,3%); 1236CC/ 3435CC/ 2677GG (22,5%) e outros haplótipos (54,2%). Houve diferença significativa entre as frequências dos haplótipos nos dois grupos (LMC e grupo controle, $P=0,010$).

Tabela 3 - Distribuição de genótipos e de alelos para os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1* entre pacientes portadores de LMC e controles saudáveis.

Polimorfismos	LMC N=118	Controles N=120	Odds Ratio	95% CI	P valor
C1236T					
CC	39 (33,1)	51 (42,5)	1,00	-	
CT	61 (51,7)	50 (41,7)	0,81	0,37-1,73	0,584
TT	18 (15,3)	19 (15,8)	1,28	0,61-2,71	0,506
Frequência alélica					
C	58,9%	63,4%	1,00	-	
T	41,1%	36,6%	0,66	0,39-1,13	0,134
C3435T					
CC	43 (36,4)	42 (35,0)	1,00	-	
CT	62 (52,5)	60 (50,0)	1,41	0,61-3,25	0,411
TT	13 (11,1)	18 (15,0)	1,43	0,64-3,17	0,372
Frequência alélica					
C	62,7%	60,0%	1,00	-	
T	37,3%	40,0%	1,06	0,62-1,81	0,814
G2677T/A					
GG	48 (40,7)	55 (45,8)	1,00	-	
GT	56 (47,5)	42 (35,0)	0,58	0,09-3,60	0,567
TT	9 (7,6)	16 (13,3)	0,88	0,14-5,56	0,901
TA	2 (1,7)	5 (4,2)	0,37	0,05-2,60	0,323
GA	3 (2,5)	2 (1,7)	0,26	0,02-3,02	0,285
Frequência alélica					
G	65,8%	64,2%	1,00		
T	32,2%	32,9%	1,22	0,36-4,10	0,746
A	2,1%	2,9%	0,77	0,46-1,31	0,897

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

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

5.4 Associação entre os polimorfismos e a resposta ao tratamento com MI

Para análise do efeito dos polimorfismos genéticos estudados, 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 (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Frequência de genótipos e de alelos para os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1* em pacientes respondedores e não respondedores ao MI

Polimorfismos	Não Respondedor N=48	Respondedor N=70	P valor
C1236T			
CC	15 (31,3)	24 (34,3)	0,731
CT+TT	33 (68,8)	46 (65,7)	
C3435T			
CC	19 (39,6)	24 (34,3)	0,557
CT+TT	29 (60,4)	46 (65,7)	
G2677T/A			
GG	20 (41,7)	28 (40,0)	0,856
GA+GT+TT+TA	28 (58,3)	42 (60,0)	

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

O teste exato de Fischer foi usado para comparar as frequências dos genótipos nos pacientes respondedores e não respondedores

Não foi encontrada associação entre os polimorfismos e a resposta molecular maior ($p \geq 0,050$) nos grupos respondedor e não respondedor (**Tabela 5**).

Houve tendência a maior frequência de pacientes portadores de genótipos CT e TT no grupo de respondedores (86,7%) quando foi analisada a resposta molecular completa ($p=0,069$) (**Tabela 6**). O mesmo aconteceu no grupo de não respondedores quando foi considerado o polimorfismo C1236T (**Tabela 6**). Houve tendência a maior frequência de resposta molecular completa em portadores de genótipo 2677 GT+TT+TA nos dois grupos (respondedores $P=0,074$ e não respondedores $P=0,076$) (**Tabela 6**).

Tabela 5 – Frequência de genótipos para os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1* segundo a resposta molecular maior nos pacientes respondedores e não respondedores ao MI

Polimorfismos	Resposta Molecular Maior					
	Respondedor		P valor	Não respondedor		P valor
C1236T (N=118)	Sim	Não		Sim	Não	
CC	18 (31,0)	5 (41,7)	0,475*	7 (36,8)	10 (34,5)	0,867*
CT+TT	40 (69,0)	7 (58,3)		12 (63,2)	19 (65,5)	
C3435T (N=118)						
CC	20 (34,5)	4 (33,3)	0,939*	7 (36,8)	12 (41,4)	0,753*
CT+TT	38 (65,5)	8 (66,7)		12 (63,2)	17 (58,6)	
G2677T/A (N=115)						
GG	23 (39,7)	5 (41,7)	0,897*	6 (31,6)	13 (44,8)	0,359*
GT+TT+TA	35 (60,3)	7 (58,3)		13 (68,4)	16 (55,2)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa)

*Teste do Qui quadrado

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

Tabela 6 – Frequência de genótipos para os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1* segundo a resposta molecular completa nos pacientes respondedores e não respondedores ao MI

Polimorfismos	Resposta Molecular Completa					
	Respondedor		P valor	Não Respondedor		P valor
C1236T (N=118)	Sim	Não		Sim	Não	
CC	2 (3,3)	21 (38,2)	0,069*	0 (0)	17 (37,8)	0,098**
CT+TT	13 (86,7)	34 (61,8)		3 (100,0)	28 (62,2)	
C3435T (N=118)						
CC	3 (20,0)	21 (38,2)	0,189*	1 (33,3)	18 (40,0)	0,817**
CT+TT	12 (80,0)	34 (61,8)		2 (66,7)	27 (60,0)	
G2677T/A (N=115)						
GG	3 (20,0)	25 (45,5)	0,074*	0 (0)	19 (42,2)	0,076**
GT+TT+TA	12 (80,0)	30 (54,5)		3 (100)	26 (57,8)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa)

*Teste do Qui quadrado; **Likelihood ratio

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

Dos pacientes que alcançaram a resposta molecular completa, 15 eram respondedores e 3 não respondedores (resistência primária) a dose padrão de MI (**Tabela 7**). Os três pacientes receberam 400mg/dia de MI por 12 meses, após este período a dose foi escalonada para 800mg/dia.

Tabela 7: Características dos 3 pacientes não respondedores que apresentaram resposta molecular completa

Paciente	Idade	Sexo	Tempo de tratamento	Dose do MI	C1236T	C3435T	G2677T/A
G050	51	M	60	800 mg	CT	CT	GT
G020	46	F	29	800 mg	CT	CC	GT
G018	47	M	47	800 mg	CT	CT	GT

Sexo: M = Masculino, F = Feminino; Tempo de tratamento = em meses após o escalonamento

Dos pacientes respondedores ao MI e que apresentaram resposta molecular maior, 51,7% eram portadores do haplótipo 1236CT/2677GT/3435CT, para os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1*, sendo esta frequência maior do que aquela encontrada nos pacientes não respondedores ao MI e com resposta molecular maior (8,3%, $p=0,010$), **Tabela 8**. Os pacientes portadores do haplótipo 1236CT/2677GT/3435CT, para os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1*, apresentaram 11,8 vezes maior chance (IC 95%: 1,42-97,3; $p=0,022$) de alcançar a resposta molecular maior quando comparado com aqueles respondedores ao MI e portadores de outros haplótipos (**Figura 10**).

A grande maioria dos pacientes que alcançaram RMC (66,7%) eram respondedores ao MI e apresentavam haplótipo 1236CT/2677GT/3435CT, para os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1*, **Tabela 9**.

Pacientes respondedores ao MI e portadores do haplótipo 1236CT/2677GT/3435CT, para os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1*, apresentaram 3,24 vezes maior chance (IC 95%: 0,97-10,79; $p=0,056$) de alcançar a resposta molecular completa quando comparado com aqueles respondedores ao MI e portadores de outros haplótipos (**Figura 11**).

Não foi observada diferença na distribuição dos genótipos segundo a cor da pele (brancos e não brancos) nos pacientes respondedores e não respondedores ao MI segundo a resposta citogenética ou a resposta molecular ($p>0,050$).

Tabela 8: Frequência dos haplótipos para os polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T no gene *ABCB1* em pacientes que alcançaram a resposta molecular maior segundo a resposta ao tratamento com MI

Haplótipos	Resposta Molecular Maior					
	Respondedores		P valor	Não Respondedores		P valor
	Sim	Não		Sim	Não	
CC-CC-GG	15(25,9)	2 (16,7)	0,010*	3 (15,8)	8 (27,6)	0,481*
CC-CC-GT	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (3,4)	
CC-CC-GA	1 (1,7)	0 (0)		1 (5,3)	0 (0)	
CC-CT-GG	2 (3,4)	2 (16,7)		1 (5,3)	2 (6,9)	
CC-CT-GT	0 (0)	1 (8,3)		0 (0)	0 (0)	
CT-CC-GG	3 (5,2)	1 (8,3)		2 (10,5)	1 (3,4)	
CT-CC-GT	0 (0)	0 (0)		1 (5,3)	1 (3,4)	
CT-CT-GG	1 (1,7)	0 (0)		0 (0)	2 (6,9)	
CT-CT-GT	30(51,7)	1 (8,3)		9 (47,4)	7 (24,1)	
CT-CT-TA	2 (3,4)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
CT-TT-GT	0 (0)	0 (0)		1 (5,3)	2 (6,9)	
CT-TT-TT	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (3,4)	
TT-CC-GT	0 (0)	1 (8,3)		0 (0)	0 (0)	
TT-CC-TT	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (3,4)	
TT-CT-GT	0 (0)	1 (8,3)		0 (0)	0 (0)	
TT-CT-TA	0 (0)	1 (8,3)		0 (0)	0 (0)	
TT-TT-GT	1 (1,7)	0 (0)		0 (0)	1 (3,4)	
TT-TT-TT	3 (5,2)	2 (16,7)		1 (5,3)	2 (6,9)	
Total	58 (100)	12 (100,0)		19 (100)	29 (100)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa)

*Likelihood ratio

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

Portadores de LMC (N=118)

Respondedores ao MI (N=70)

Não Respondedores ao MI (N=48)

Figura 10: Frequência relativa dos haplótipos para os polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T no gene *ABCB1* em pacientes que alcançaram a resposta molecular maior segundo a resposta ao tratamento com MI.

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

Tabela 9: Frequência dos haplótipos para os polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T no gene *ABCB1* em pacientes que alcançaram a resposta molecular completa

Haplótipos	Resposta Molecular Completa					
	Respondedores		P valor	Não Respondedores		P valor
	Sim	Não		Sim	Não	
CC-CC-GG	2 (3,3)	15 (27,3)	0,097*	0 (0)	11 (24,4)	0,814*
CC-CC-GT	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (2,2)	
CC-CC-GA	0 (0)	1 (1,8)		0 (0)	1 (2,2)	
CC-CT-GG	0 (0)	4 (7,3)		0 (0)	3 (6,7)	
CC-CT-GT	0 (0)	1 (1,8)		0 (0)	0 (0)	
CT-CC-GG	0 (0)	4 (7,3)		0 (0)	3 (6,7)	
CT-CC-GT	0 (0)	0 (0)		1 (33,3)	1 (2,2)	
CT-CT-GG	0 (0)	1 (1,8)		0 (0)	2 (4,4)	
CT-CT-GT	10 (66,7)	21 (38,2)		2 (66,7)	14 (31,1)	
CT-CT-TA	1 (6,7)	1 (1,8)		0 (0)	0 (0)	
CT-TT-GT	0 (0)	0 (0)		0 (0)	3 (6,7)	
CT-TT-TT	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (2,2)	
TT-CC-GT	0 (0)	1 (1,8)		0 (0)	0 (0)	
TT-CC-TT	0 (0)	0 (0)		0 (0)	1 (2,2)	
TT-CT-GT	1 (6,7)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
TT-CT-TA	0 (0)	1 (1,8)		0 (0)	0 (0)	
TT-TT-GT	1 (6,7)	0 (0)		0 (0)	1 (2,2)	
TT-TT-TT	0 (0)	5 (9,1)		0 (0)	3 (6,7)	
Total	15 (100,0)	55 (100,0)		3 (100,0)	45 (100,0)	

Os dados apresentados são: frequência absoluta (frequência relativa)

*Likelihood ratio

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

Portadores de LMC (N=118)

Respondedores ao MI (N=70)

Não Respondedores ao MI (N=48)

Figura 11: Frequência relativa dos haplótipos para os polimorfismos C1236T, G2677T/A e C3435T no gene *ABCB1* em pacientes que alcançaram a resposta molecular completa segundo a resposta ao tratamento com MI.

Resposta molecular completa = transcritos BCR-ABL1 $\leq 0,0032\%$

6. DISCUSSÃO

A maioria dos pacientes com LMC está sendo beneficiada com a introdução da terapia alvo com o MI, que tem como objetivo impedir a fosforilação da proteína BCR-ABL1, interrompendo assim, a ativação de outras proteínas responsáveis pela apoptose e diferenciação celular. O estudo IRIS mostrou que após 96 meses de tratamento com MI, não houve progressão da doença em nenhum dos pacientes que mantiveram a resposta citogenética completa (RCC) e a resposta molecular maior (RMM) (DEININGER et al, 2009). Portanto, a obtenção e a manutenção de tais respostas são primordiais para a sobrevida dos pacientes tratados com MI.

Apesar deste avanço, alguns pacientes não apresentam resposta satisfatória, necessitando, assim, do reconhecimento de alguns fatores determinantes da resposta terapêutica. As mutações no domínio quinase do gene *BCR-ABL1* são a principal causa de resistência ao tratamento com MI, pois interferem na ligação da droga ao seu alvo, diminuindo a sua eficácia (BRANFORD et al, 2002). No presente estudo, foram excluídos todos os pacientes que tinham alguma mutação no gene de fusão *BCR-ABL1*, uma vez que cerca de 55% dos pacientes portadores de LMC tratados com MI, e resistentes a este, apresentam mutação no gene *BCR-ABL1* (HUGHES et al, 2009). Ainda não existe um consenso sobre as causas que levam a resistência ao MI em pacientes que não possuem mutações no gene *BCR-ABL1*.

O transporte do MI está relacionado à P-gp, produto da expressão do gene *ABCB1* (BURGER et al., 2004; MAHON et al., 2003; THOMAS et al., 2004). A superexpressão deste gene ou a presença de polimorfismos poderiam levar a uma menor concentração intracelular de MI, prejudicando a resposta ao tratamento.

Considerando que 16% dos portadores de LMC não respondem à dose padrão do MI, e que mutações no gene *ABCB1* poderiam ser a causa dessa

resistência, propomos o presente estudo com os objetivos de verificar a relação dos polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1* entre indivíduos respondedores e não respondedores à dose padrão de MI (400mg/dia) e comparar as frequências dos genótipos entre indivíduos que obtiveram a resposta molecular maior e resposta molecular completa na vigência do tratamento com MI.

Os dados sobre a resposta ao tratamento ao MI na população estudada mostraram uma taxa de 100% de resposta hematológica completa (RHC), 81,4% de resposta citogenética completa (RCC), 65,3% de resposta molecular maior (RMM) e 15,3% de resposta molecular completa (RMC). Estes dados são semelhantes aos apresentados pelo estudo IRIS no qual foram observadas taxas de respostas de 98% para RHC, 82% para RCC, 66% de RMM e 12% de RMC ($p < 0,050$) (HOCCHAUS et al, 2009).

A análise comparativa entre os pacientes respondedores à dose padrão de MI e os que não respondem mostrou que o escalonamento da dose colabora para as respostas citogenética completa (54,2%) e molecular maior (54,1%); no entanto, as taxas de resposta não alcançam as observadas nos pacientes respondedores à dose padrão. Estes resultados já foram mostrados em outro estudo que avaliou o aumento de dose de MI para 800 mg/dia MI em pacientes resistentes à dose padrão, sendo que naquele estudo a taxa de resposta foi de 33% nos pacientes com escalonamento de dose (KANTARJIAN et al., 2009). Surpreendentemente no presente estudo foi observada taxa maior de resposta citogenética quando foi feito escalonamento de dose nos pacientes brasileiros (54,2%). É possível que o perfil genético e/ou outros fatores ambientais possam estar influenciando nesta resposta.

No presente estudo, as frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A no gene *ABCB1* foram similares entre homens e

mulheres e não foram encontradas diferenças nas frequências entre indivíduos com cor de pele branca e não branca nos portadores de LMC.

A frequência do alelo 1236T, em nosso estudo, foi de 41,1% nos portadores de LMC e 36,6% no grupo controle, resultados estes semelhantes aos encontrados em outros estudos envolvendo indivíduos descendentes europeus (HOFFMEYER et al., 2000, DULUCQ et al., 2008) ($p > 0,050$) e em brasileiros (SCHEINER et al, 2010), porém, a frequência do alelo 1236T foi menor que aquelas encontradas em populações chinesas e japonesas (TANABE et al, 2001, CHOWBAY et al., 2003) ($p < 0,050$).

Com relação ao polimorfismo G2677T/A, as frequências dos alelos 2677T e 2677A foram de 32,2% e 2,1% nos portadores de LMC e 32,9% e 2,9% no grupo controle, respectivamente. Estas frequências foram similares ($p > 0,050$) às observadas em estudos envolvendo descendentes europeus (CASCORBI et al., 2001), brasileiros (RODRIGUES et al., 2005) e malasianos (CHOWBAY et al., 2003). A frequência do alelo 2677A nos pacientes brasileiros foi menor (2,1%) que aquela observada na população japonesa ($p < 0,050$) (HORINOUCI et al., 2002), uma vez que o alelo 2677A é frequente em japoneses (15 – 22%) (TANABE et al., 2001; MORIYA et al., 2002).

A frequência do alelo 3435T observada em nosso estudo foi de 37,3% nos portadores de LMC e 40% no grupo controle. Estas frequências são semelhantes a outros dois estudos brasileiros que avaliaram a frequência deste polimorfismo em pacientes hipercolesterolêmicos e indivíduos saudáveis (RODRIGUES et al., 2005; SCHEINER et al, 2010). A frequência também é semelhante àquela encontrada em indivíduos europeus saudáveis (CASCORBI et al., 2001) ($p > 0,050$).

O alelo 3435T é raro em populações africanas (KIM et al, 2001; AMEYAW et al, 2001; SCHAEFFELAR et al., 2001). A frequência deste alelo nos pacientes portadores de LMC e no grupo controle foi maior que aquela encontrada no estudo de Kim et. al. (2001) ($p < 0,050$).

Alguns estudos reportaram que os polimorfismos genéticos do gene *ABCB1* poderiam afetar a expressão e a função da P-gp em indivíduos saudáveis (HOFFMEYER et al. , 2000; KIM et al., 2001). Os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A têm sido associados ao risco de desenvolvimento de câncer, assim como à variabilidade de resposta aos tratamentos quimioterápicos (JAMROZIAK et al, 2004; KIMCHI-SARFATY et al, 2007; LESCHZINER et al, 2007).

Na amostra analisada, não foram observadas diferenças nas frequências genotípicas entre portadores de LMC e no grupo controle. Este foi o primeiro estudo que avaliou a associação dos polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A ao risco de ter LMC. Outros estudos envolvendo doenças oncohematológicas, associaram o alelo 3435T à suscetibilidade de desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda em crianças (JAMROZIAK et al, 2004). O genótipo 2677TT foi correlacionado ao risco de desenvolvimento de leucemia linfocítica crônica-B (PENNA et al., 2010). Estudos com indivíduos portadores de mieloma múltiplo e outras doenças mieloproliferativas não encontraram associação entre estes polimorfismos e o risco de desenvolvimento da doença (GOREVA et al., 2003; JAMROZIAK et al, 2009)

O polimorfismo C3435T é encontrado no segundo domínio de ligação de ATP do lado intracelular da P-gp e tem sido relacionado à diminuição da expressão do gene *ABCB1* e à alteração da farmacocinética de drogas como digoxina e fexofenadina (HOFFMEYER et al., 2000; FUNG et al., 2009). Wang et al., 2005,

mostraram que os transcritos de células de portadores do alelo 3435T do polimorfismo C3435T eram mais rapidamente degradados em relação aos que possuíam o alelo selvagem, na avaliação da expressão *in vitro* em células de ovário de hamster chinês (CHO). Uma possível explicação para este fato é que este polimorfismo estaria ligado a outro SNP na região promotora do gene *ABCB1*, o que poderia afetar a transcrição e diminuir as concentrações de RNAm (FUNG et al., 2009). Outra explicação para o impacto deste polimorfismo seria a mudança na conformação da proteína, alterando o domínio de ligação do ATP (FUNG et al., 2009).

Estudos envolvendo pacientes portadores de LMC não demonstraram influência deste polimorfismo na resposta à dose padrão de MI (DULUCQ et al., 2008; KIM et al., 2009). Os resultados de nosso estudo confirmam estes achados quando o polimorfismo foi avaliado isoladamente, uma vez que não se observou nenhuma influência tanto na resposta citogenética como nas respostas moleculares no tratamento com MI. Porém, quando foram avaliados os efeitos dos haplótipos para os três polimorfismos (C1236T, C3435T e G2677T/A) nos pacientes deste estudo, 51,7% dos pacientes respondedores à dose padrão do MI e que alcançaram a RMM eram portadores do haplótipo 1236CT/ 3435CT/ 2677GT. Dulucq et al., 2008 mostrou que o haplótipo (1236CC/ 3435CC/ 2677GG) está associado à menor frequência de RMM em pacientes portadores de LMC tratados com a dose padrão de MI (400mg/dia).

Em contraste, outro estudo realizado em pacientes portadores de LMA observou que os heterozigotos mutados para os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T/A apresentavam uma maior expressão de *ABCB1* e menor taxa de

remissão completa (ILMER et al., 2002). Ni et al. (2010) correlacionou o alelo 3435T à maior resistência a dose padrão de MI.

Outros dois estudos avaliaram a influência dos polimorfismos C1236T, 2677T/A e C3435T na resposta ao MI, porém não encontraram nenhuma associação que indicasse algum valor preditivo da resposta ao MI (KIM et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2010).

Alguns estudos sugerem que o haplótipo 1236CT/ 3435CT/ 2677CT estaria associado à redução da atividade da P-gp (CHOWBAY et al., 2003; SAI et al., 2006) porém, o mecanismo não está elucidado. No presente estudo, foi encontrada maior frequência de portadores deste haplótipo em respondedores à dose padrão de MI e com resposta molecular maior, o que sugere que a diminuição da atividade P-gp estaria associada à maior concentração intracelular de MI, o que teria como consequência a resposta molecular maior.

A substituição da serina por treonina, como consequência do polimorfismo G2677T/A, foi associada à alteração no transporte de drogas, uma vez que esta troca poderia afetar a atividade ATPase induzida por drogas (SAKURAI et al, 2007). De fato, foi mostrado que indivíduos portadores do alelo mutado 2677T do polimorfismo do gene *ABCB1* tiveram concentrações plasmáticas mais elevadas de fexofenadina que aqueles portadores do alelo 2677G (KIM et al., 2001).

O polimorfismo C1236T está localizado no primeiro domínio ABC, entre o *Loop A* e o domínio *Walker A* (FUNG et al., 2009). Alguns resíduos de aminoácidos (Y401 e S440N) que estão ao redor deste SNP são essenciais para a ligação e hidrólise do ATP (SAKURAI et al., 2007). Esta mutação não foi relacionada à

alteração na expressão da proteína ou na concentração de RNAm (WANG et al., 2005).

Em nosso estudo, observamos tendência à maior frequência dos alelos 1236T e 2677T entre os pacientes que possuíam resposta molecular completa e eram respondedores à dose padrão de MI. Dulucq et al. (2008), observaram que, dos pacientes homozigotos para o alelo 1236T, 85% alcançaram a RMM. Diferentemente dos achados de Dulucq et al. (2008), no presente estudo não foi possível confirmar o efeito do alelo 1236T na resposta molecular, porém, como dado inédito na literatura mostramos em nosso estudo o efeito deste alelo na resposta molecular completa naqueles pacientes respondedores à dose padrão de MI. O efeito deste alelo é também evidenciado quando há o haplótipo 1266CT/ 3435CT/ 2677GT, para o qual foi observada tendência ($P=0,056$) à maior frequência de portadores deste haplótipo em respondedores ao MI e com resposta molecular completa. De fato, já foi descrito anteriormente por Dulucq et al. (2008) que pacientes portadores do alelo 1236T apresentavam concentração sérica de MI maior que 1000 ng/mL. Tem sido preconizado que concentrações de 1002 ng/mL de MI como ideal para obtenção destas respostas citogenética e molecular (PICARD et al., 2007).

No entanto, um estudo chinês mostrou que pacientes portadores do alelo 1236T possuíam maior resistência ao MI, sugerindo que o aumento do risco de resistência ao MI estaria associado à presença do alelo T. Uma explicação para este resultado controverso poderia ser a maior frequência deste alelo em população oriental associado ao número reduzido de pacientes incluídos no estudo ($N= 52$).

Também como resultado controverso apresentado na literatura foi mostrado que pacientes portadores de LMC e com RCC apresentam maior frequência de alelo 2677A na China (NI et al , 2010). De fato, naquele estudo foi encontrado 23,1% de

pacientes portadores de genótipos 2677GA e 2677AA. Este achado confirma a alta frequência do alelo 2677A na China e é diferente do que foi encontrado no presente estudo, uma vez que não foi encontrado o genótipo 2677AA na população brasileira tanto nos pacientes como no grupo controle. O genótipo 2677GA foi encontrado em 2,5% e 1,7% em pacientes e grupo controle, respectivamente.

O presente estudo mostra que o haplótipo 1236CT/ 3435CT/2677TT no gene *ABCB1* está associado à resposta molecular maior em pacientes respondedores à dose padrão de MI, no entanto outros fatores farmacocinéticos e genéticos, além dos polimorfismos no gene *ABCB1*, tais como CYP3A5, SLC22A1 e outros transportadores plasmáticos poderiam estar interagindo e explicando a variabilidade de resposta ao MI. O conhecimento destes marcadores farmacogenéticos será extremamente útil no tratamento da LMC.

7. CONCLUSÃO

A distribuição das frequências genóticas dos polimorfismos *ABCB1* C1236T, C3435T e G2677T/A dos indivíduos portadores de LMC estudados foi similar à observada em outros estudos envolvendo pacientes eurodescendentes e brasileiros.

O haplótipo *ABCB1* 1236CT-2677GT-3435CT está associado à resposta molecular maior, enquanto a presença dos alelos 1236T, 2677T estão correlacionados à resposta molecular completa, mostrando assim o valor destes polimorfismos na predição da resposta molecular em portadores de LMC tratados com MI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ameyaw M.M., Regateiro F., Li T. et al. MDR1 pharmacogenetics: frequency of C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity **Pharmacogenetics** 11: 217-221, 2001

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

Baselga J. Targeting tyrosine kinase in cancer: the second wave **Science** 312:1175-1178, 2006

Baccarani, M., Saglio, G., et al.. Evolving concepts in 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.

Baccarani, M., Cortes J., Pane F. et al. Chronic myeloid leukemia: an update on concepts and management recommendations of European LeukemiaNet **Journal of Clinical Oncology** 27:6041-6052, 2009

Bergantini, A. P. F., Curist E., et al. Leucemia mielóide crônica e sistema Fas-FasL. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, 27 (2): 120-125, 2005.

Blagosklonny M.V. STI- 571 must select for drug-resistant cells but no cells breathe fire out of its nostrils like a dragon. **Leukemia** 16:570-572, 2002

Bodor M., Kelly E.J., Ho R.J. Characterization of the MDR1 gene. **AAPS Journal** 7:E1-5, 2005

Branford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR-ABL in patients with chronic myeloid leukemia or positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib resistance **Blood** 99:3472-3475, 2002

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. p. 97.2007

Bortolheiro T.C. & Chiatton C.S. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**. 30:3-7. 2008

Breedveld P., Pluim D., Cipriani G. The effect of BCRP1 on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate : implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. **Cancer Research** 65(7):2577-2582, 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

Callen D.F., Baker E., Simmers R.N., Seshadri R., Roninson I.B. Localization of the human multiple drug resistance gene MDR1, to 7q21.1. **Human Genetic** 77:142-144, 1987

Cascorbi, I., Gerloff, T., Johne, A., et al.. requencey of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. **Clinical Pharmacology and Therapeutics** 2001; 69: 169-74.

Castro F. A., Palma P.V., Morais F.R. et al. Immunological effects of interferon-alpha on chronic myelogenous leukemia. **Leukemia Lymphoma**, 44 (12): 2061-2067, 2003.

Chowbay B., Cumaraswamy S., Cheung Y.B. et al. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporine disposition in heart transplant recipients **Pharmacogenetics** 13:89-95, 2003 .

Cortes J.E, Talpaz M., Kantarjian H. Chronic myelogenous leukemia: a review. **American Journal of Medicine** 100:555-570,1996

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

Crossman L.C., Druker B.J., Deininger M.W.N., hOCT1 and resistance to imatinib. **Blood** 106:1133-1134, 2005

Dean M., Rzhetsky A., Allikmets R. The human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily. **Genome Research** 11:1156-1166, 2001

Deininger M. W. N. Goldman J. M.; Melo J. V. The molecular byology of chronic myeloid leukemia. **Blood** 96:3343-3356, 2000.

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.

Dey S. Single nucleotide polymorphisms in human P-glycoprotein: its impact on drug delivery and disposition. **Expert Opinion Drug Delivery** 3: 23-35, 2006

Dobbin, J. D. A. & Gadelha, M. I. P. - Mesilato de imatinibe para tratamento da Leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**., 48 (3): 429-438, 2002.

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

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 **New England Journal of Medicine** 355(23) :2408-2417,2006

Dulucq S., Bouchet S., Turcq B., Lippert E., Etienne G., Reiffers J., Molimard M., Krajcinovic M., Mahon, F. Multidrug Resistance Gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia **Blood** 112(5): 2024-2027, 2008

Fallay J., Marzolini C., Meaden E.R. et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1 infected individuals with allelic variants of multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study **Lancet** 359:30-36, 2002.

Fardel, S., Talpaz, M., Estrov Z.M.,D. et al. The biology of chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, 341:164-171, 1999.

Fung L.K., Gottesman M.M A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function **Biochimica et Biophysica Acta** 1794:860-871, 2009

Geary, C.G. The story of chronic myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, 110:2-11, 2000

Giles F.J., Kantarjian J., Cortes D., Thomas M.. Multidrug Resistance protein expression in chronic myeloid leukemia. **Cancer** 86:805-813, 1999

Goldman JM, Marin D, Olavarria E, Apperley JF Clinical Decisions for chronic myeloid leukemia in imatinib era. **Seminars in Hematology** 40:98-103, 2003

Goreva O.B., Grishanova A.Y., Mukhin O.V., et al. Possible prediction of the efficiency of chemotherapy in patients with lymphoproliferative diseases based on MDR1 gene G2677T/A and C3435T polymorphisms **Bulletin of Experimental Biology and Medicine** 136:183-185, 2003

Gottesman M. & Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by multidrug transporter. **Annual Review of Biochemistry** 62:386-427, 1993

Gottesman M.M, Hrycina C.A., Schoenlein P.V, Germann U.A., Pastan I., Genetic analysis of the multidrug transporter. **Annual Review of Genetics** 29:607-649, 1995

Guilhot, F., Chastang L., Michallet M. et al. - Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. **New England Journal of Medicine**, 337 (4): 223-229, 1997

Hamada A., Miyano H., Watanabe H. Interaction of Imatinib Mesilate with Human P-glycoprotein. **Journal Pharmacology Experiment Therapy** 307:824-828, 2003

Hegedus T., Orfi L., Seprodi A. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. **Biochemistry Biophysics Acta** 1587:318-325, 2002

Hochhaus A., Erben P., Ernst T. Resistance to targeted therapy in chronic myelogenous leukemia. **Seminars in Hematology** 44 suppl1:S15-S24, 2007

Hochhaus A., O'Brien S.G., Guilhot F. et al. Six-Years follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. **Leukemia** 23:1054-1061, 2009

Hoffmeyer S., Burk O., Von Richter O., Arnold H.P., Brockmoller J., John A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 97: 3473-3478, 2000

Horinouchi M., Sakaeda T., Nakamura T., et al. Significant genetic linkage of MDR1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: function relevance to pharmacokinetics of digoxin. **Pharmaceutical Research** 19:1581-1585, 2002

Houghton P.J., Germain G.S., Harwood F.C. et al. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2(BCRP) transporter and reverse resistance to topotecan and SN-38 in vitro **Cancer Research** 64:2333-2337, 2004

Hughes T., Kaeda J., Branford S. et al., Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, 349:1423-1432, 2003.

Hughes T., Saglio G., Branford S. et al. 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

Illmer, T., Schuler, U.S., Thiede, C., Schwarz, U.I., et al. MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukaemia patients. **Cancer Research** 62:4955-62, 2002

Illmer T., Platzbecker U., Freiberg-Richter J P-glycoprotein mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. **Leukemia** 18:401-408, 2004

Jamroziak K., Mlynarski W., Balcerczak E. et al. Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. **European Journal of Hematology** 5:314-321, 2004

Jamroziak K., Balcerczak E., Calka K., et al. Polymorphisms and haplotypes in the multidrug resistance 1 gene (MDR1/ABCB1) and risk of multiple myeloma. **Leukemia Research** 33:332-335, 2009

Jeannesson E., Albertini L., Siest G. et al. Determination of ABCB1 polymorphisms and haplotypes in a French population. **Fundamental and Clinical Pharmacology** 21:411-418, 2007

Jorgensen H.G., Elliot M.A., Allan E.K. Alpha (1)-Acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patient does not mediate significant in vitro resistance to STI571. **Blood** 99:713-717,2002

Juliano R.L., & Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cells mutants. **Biochemistry Biophysics Acta** 455:152-162, 1976

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

Kantarjian H.M., Pasquini R., Lévy V. et al. Dasatinib or high dose of imatinib for chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at dose of 400 to 600 milligrams daily. **Cancer** 15: 4136-4147, 2009

Kessel D., Botterill V., Wodinski I Uptake as a determinant of the methotrexate response in mouse leukemia. **Science** 150:752-754, 1965

Kimchi-Sarfaty C.,Marple A.H., Shinar S., et al. Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. **Pharmacogenomics** 8:29-39, 2007

Kim R.B, Leake B.F, Choo E.F. et al. Identification of functionally variant *MDR1* alleles among European Americans and African Americans. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 70: 189-199, 2001

Kim D.H., Sriharsha L., Xu W. et al. Clinical relevance of pharmacogenetic approach using multiple candidates genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia **Clinical Cancer Research** 15:4750-4758, 2009

Kotaki M., Motoji T., Takanashi M. Anti-proliferative effect of the abl tyrosine kinase inhibitor STI571 on the P-glycoprotein positive K562/ADM cell line. **Cancer Letters** 199:61-68, 2003

Kusuhara, H., Suzuki H., Naito M., Tsuruo T., Sugiyama Y. Charecterization of efflux transporter of organic anions in mouse brain capillary endothelial cell line. **Journal Pharmacology Experimental Therapy** 285:1260, 1998

Leschziner G.D., Andrew T., Leach J.P., Chadwick A.J. et al. Common ABCB1 polymorphisms are not associated with multidrug resistance in epilepsy using a gene-wide taggind approach **Pharmacogenetic Genomics** 17:217-220, 2007

Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P.C Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicological Appliance in Pharmacology** 204:216-237, 2005

Lima, M. - Imatinibe Mesilato no Brasil. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia.**, 27 (3): 153-158, 2005.

Marzolini C., Paus E., Buclin T., Kim R.B. Polymorphisms in human MDR1: recent advances and clinical relevance. **Clinical Pharmacology Therapy** 75:13-33, 2004

Maurillo L., Del Poeta, G., et al. Quantitative analyses of Faz and bcl-2

expression in hematopoietic precursors. **Haematologica**,86:237-43, 2001.

Mahon F.X., Deininger M.W.N., Schulteis B. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. **Blood** 96: 1079-1090, 2000

Mahon F.X., Belloc F., Lagarde V. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. **Blood** 101: 2368-2373, 2003.

Melo J.V. Chronic myeloid leukemia. Education Program, **American Society of Hematology** , 1999

Melo J.V.; Hughes T.P.; Apperley J.F. Chronic Myeloid leukemia **American Society Hematology**, 33:132-152, 2003.

Melo J.V., Chuah C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia **Cancer Letters** 249:121-132, 2002

Mittelman F., Mertens F., Johansson B. A Breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia **Nature Genetics** 15: 417-447, 1997

Moriya Y., Nakamura T., Horinouchi M, et al. Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1 and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 25:1356-1359, 2002

Ni L.N., Li J.Y., Miao K.R. et al. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia. **Medical Oncology** 323:585-589, 2010

Nowell P. & Hungerford, D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia **Science**, 132:1497-1500, 1960

O'Brien S.G.; Larson, G.F. et al., Imatinib compared with interferon and lowdose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine** 348:994-1004, 2003.

O'Dawyer M.E., Mauro M.J., Kurilik G., Mori, M., Balleisen S., Olson S., Magenis E., Capdeville R., Druker B.J. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate in accelerated phase CML. **Blood** 100:1628-1633, 2002

Penna G., Allegra A., Alonci A., et al. MDR1 polymorphisms (G2677T and C3435T) in chronic lymphocytic leukemia : an impact on susceptibility and prognosis **Medical Oncology** Published Online on 22 May, 2010

Picard S., Titier K., Etienne G. et al. Through imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard dose imatinib in chronic myeloid leukemia **Blood** 109:3496-3499, 2007

Randolph, T.R. Chronic myelocytic leukemia . part I: history, clinical representation, and molecular biology. **Clinical Laboratory Science**,18:1-12, 2005

Ricci C., Scappini B., Divoky V. Mutation in the ATP binding pocket of the ABL kinase domain in an STI571 resistant BCR/ABL positive cell line. **Cancer Research** 62:5995-5998, 2002

Rodrigues A.C, Rebecchi I.M, Bertolami M.C., Faludi A.A, Hirata M.H., Hirata R.D. High Baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with MDR1 haplotypes in Brazilian Hypercholesterolemic individuals of European descent. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 38(9): 1389-1397, 2005

Rowley J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giensa staining. **Nature**, 243:290-293, 1973.

Sai K., Miyake H., Moriya M. et al. Genetic variation and haplotype structures of the ABCB1 gene in Japanese population and expanded haplotype block covering the distal promoter region and associated ethnic differences. **Annals of Human Genetics** 70:605-622, 2006

Sakurai A., Onishi H., Hirano M. et al. Quantitative structure activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1. **Biochemistry** 46:7678-7693, 2007

Sattler M. & Griffin J.D. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. **Seminars in Hematology** 40:3-10, 2003

Schaeffeler E., Eichelbaum M., Brinkmann U. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. **The Lancet** 358:383-384, 2001

Scheiner M.A, Damasceno A.M., Maia R.C ABCB1 single nucleotide polymorphisms in the Brazilian population **Molecular Biology Reports** 37:111-118, 2010

Silva, M. C. & Shimauti, E. L. T. - Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**., 28 (2): 144-148, 2006.

Souza, C. A. & Pagnano, K. - Os desafios no tratamento da Leucemia mielóide crônica na era do mesilato de imatinibe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 26 (4): 282-284, 2004.

Suda, T., Takahashi , E.T. et al. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell**,.4:.11, 2002.

Sawyers C.L. Chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine** 340:1330-1338, 1999

Sokal J., Baccarani M., Russo D. et al. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia **Seminars of Hematology** 25:49-61, 1988

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

Takahashi N., Wakita H., Miura M. et al. Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese with chronic-phase chronic myeloid leukemia. **Clinical Pharmacological Therapy** 88: 809-813, 2010

Tanabe M., Ieiri I., Nagata N., et al. Expression of P-glycoprotein in Human Placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR1) gene **Pharmacology and Experimental Therapeutics** 297:1137-1143, 2001

Thomas J., Wang L., Clark R.E. Active transport of imatinib into and out of the cells: implications of drug resistance **Blood** 104:3739-3735, 2004

Vendrame-Goloni CB Alterações cromossômicas e frequência do rearranjo gênico BCR/ABL ao diagnóstico, tratamento com mesilato de imatinibe e após transplante de medula óssea em leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** 28:79-80, 2006

Vianna, J. C. C. & Almeida, E. C. P. D. Leucemia mielóide crônica: tratamentos empregados nas diferentes fases da doença. **Revista Saúde e Ambiente**, 1 (2): 60-69, 2006.

Wang D., Johnson A.D., Papp A.C., Kroetz D.L., Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435>T affect mRNA stability. **Pharmacogenetics Genomics** 15:693-704, 2005

Watkins P.B. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. **Advance Drug Delivery Review** 27:161-170, 1997

Weisberg E., Griffin J. Mechanism of resistance to the Abl tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL transformed hematopoietic cell lines. **Blood** 95:3498-3505, 2000

White D.L. Saunders V.A., Dang P., et al.. OCT-1 mediated influx is a key determinant intracellular of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity of imatinib. **Blood** 108:697-704, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

APÊNDICE B – FORMULARIO DE COLETA DE DADOS DOS PACIENTES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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 as diferenças na sequência do DNA de cada indivíduo (polimorfismos) nos genes SLC22A1 e ABCB1, 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 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 (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 da Testemunha

Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS DOS PACIENTES

FORMULÁRIO - PACIENTES LMC

Data da coleta: _____
 Hospital: _____ Registro: _____
 Nome: _____ Iniciais: _____
 Data de nascimento: _____ Idade: _____
 Sexo (F) (M) Grupo étnico _____ Ocupação _____
 Anos estudados _____ Renda familiar _____
 Número de pessoas na família: _____ Renda per capita: _____
 Peso _____ altura _____ IMC: _____

Fase da doença: _____
 Medicamento 1: _____ tempo 1: _____
 Medicamento 2: _____ tempo 2: _____
 Glivec desde: _____ Dose: _____

Data de diagnóstico LMC: _____ Tempo da doença: _____
 Resposta hematológica: _____
 Resposta citogenética: _____
 Número de transcritos: _____
 Resposta molecular: _____
 Sokal: _____

Hemácias: _____
 Leucócitos: _____
 Blastos: _____ %: _____
 Basófilos: _____ %: _____
 Eosinófilos: _____ %: _____
 Neutrófilos: _____ %: _____

Plaquetas: _____
 Phi: _____

Tempo de uso do glivec: _____

Resistência: _____

Med atual: _____ dose do medicamento atual: _____

ANEXOS

ANEXO 1 – CÓPIA DA APROVAÇÃO DO CEP DA FCF/USP

ANEXO 2 – CÓPIA DA APROVAÇÃO DO CEP DO HOSPITAL BRIGADEIRO

ANEXO 3 – CÓPIA DA APROVAÇÃO DO CEP DA SANTA CASA DE SÃO PAULO

ANEXO 4- FICHA DO ALUNO

ANEXO 5- INSTRUÇÕES PARA DEFESA FCF/USP

ANEXO 1 – CÓPIA DA APROVAÇÃO DO CEP 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 mieloide crônica" apresentado por Vossa Senhoria.

Atenciosamente,

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
 Assistência Técnica Acadêmica

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF 04/12022009
Protocolo CEP nº 487

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
FBC

I - Identificação

Projeto de Pesquisa:	Estudo da expressão gênica e de polimorfismos nos genes MDR1 e hOCT1 e sua relação com a resistência ao tratamento com mesilato de ematinib em pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC)
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Instituição:	FCF-USP
Área Temática Especial:	Genética Humana
Patrocinadores:	FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo

A leucemia mielóide crônica (LMC) pode ser tratada com sucesso com o mesilato de imatinib (MI). Entretanto, pacientes tornam-se eventualmente refratários ao tratamento. Atribui-se o principal mecanismo de resistência a mutações do gene BCR-ABL. Todavia, outros mecanismos foram aventados como a variabilidade farmacogenética, a presença de polimorfismos ou a reduzida atividade de bombas de influxo (hOCT1) e efluxo (MDR1) intracelular. Devido à importância das causas de resistência no tratamento da LMC, pretende-se avaliar nesses pacientes a expressão gênica de genes de transportadores (hOCT1 e MDR1) envolvidos, bem como seus principais polimorfismos.

Os objetivos do presente estudo são:

1. Avaliar as frequências dos genótipos dos polimorfismos C1236T, G2677/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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

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 de predição para a resistência ao MI considerando-se as variáveis idade, sexo, grupo étnico, risco Sokal, polimorfismos nos genes MDR1 e hOCT1.

Tipo de estudo:

Caso-caso transversal.

Descrição da Casuística:

Pretende-se estudar 90 pacientes, homens e mulheres com mais do que 18 anos e diagnóstico de LMC, provenientes do Hospital Brigadeiro.

De acordo com o projeto, serão coletados 25 mL de sangue, uma única vez, para: (1) determinação do hemograma, (2) extração e avaliação do DNA genômico, (3) extração e avaliação do RNA e síntese do DNA complementar (cDNA), (4) realização de estudos genéticos dos genes hOCT e MDR1 (polimorfismos T1236C, G2677T/A e C3435T no gene MDR1 e T-43G e A1222G no gene hOCT1), (5) avaliação da expressão do genes BCR-ABL, hOCT1 e MDR1, (6) dosagem da concentração sérica do mesilato de imanitib, (7) **determinação do mielograma** (para tanto está prevista aspiração de medula óssea no projeto, mas não no TCLE) e (8) **análise citogenética para pesquisa de cromossomo Filadélfia e outras alterações cromossômicas** (só prevista no projeto, mas não no TCLE).

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

Os critérios de inclusão dos participantes são:

Serão incluídos no projeto homens e mulheres com mais do que 18 anos e com diagnóstico de LMC, portadores de cromossomo Filadélfia e que foram tratados com o MI por ao menos 3 meses.

Serão critérios de exclusão:

Serão excluídos os seguintes pacientes: (1) aqueles que não apresentarem cromossomo Filadélfia; (2) aqueles que não tenham sido tratados com MI; (3) aqueles que tenham apresentado alguma intolerância ou resistência ao MI antes de 3 meses de tratamento e (4) aqueles com alterações em outros cromossomos que não o Filadélfia, e que tenham sido detectados na análise citogenética.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

III – SITUAÇÃO DO PROTOCOLO: PROJETO APROVADO

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
- Comunicar ao CEP eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
- Comunicar e justificar a interrupção do projeto;
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 12 de fevereiro de 2009.

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

ANEXO 2 – CÓPIA DA APROVAÇÃO DO CEP DO HOSPITAL BRIGADEIRO

via do fax

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
cephb@terra.com.br
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

SH-HB

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 recorda-lhe 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

ANEXO 3 – CÓPIA DA APROVAÇÃO DO CEP DA SANTA CASA DE SÃO PAULO

29 Jun 2009 11:07

11-21767259

p.2

**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 frequências 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

de predição para a resistência ao MI considerando as variáveis idade, sexo, grupo étnico, risco Sokal, polimorfismos nos genes MDR1 e hOCT1.

Critérios de inclusão e exclusão

Serão incluídos homens e mulheres maiores de 18 anos com diagnóstico de LMC, portadores de cromossomo Filadélfia (diagnóstico feito por análise citogenética) e que foram tratados com o mesilato de imatinib por pelo menos 3 meses. Serão excluídos os pacientes que não apresentarem cromossomo Filadélfia, ou que não tenham sido tratados com mesilato de imatinib ou que apresentaram alguma intolerância ou resistência a esta droga antes de 3 meses de tratamento. Serão excluídos também, os pacientes portadores de outras alterações nos cromossomos diferente do cromossomo Filadélfia, que tenham sido detectados na análise citogenética.

Aspectos Éticos

Os pacientes portadores de LMC serão informados sobre os objetivos do projeto e consultados sobre a vontade de participar da pesquisa. Sendo favoráveis, os pacientes assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Este projeto de pesquisa será submetido a avaliação dos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e do Hospital Brigadeiro.

RESULTADOS ESPERADOS

1. 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 mesilato de Imatinib;
2. Avaliar se existe interação entre polimorfismos nos genes hOCT1 e MDR1 em pacientes resistentes ao mesilato de imatinib;
3. Determinar os fatores de predição para a resistência ao MI considerando as variáveis idade, sexo, grupo étnico, risco Sokal, os genótipos para os polimorfismos nos genes MDR1 e hOCT1;
4. Defesa da Dissertação de Mestrado do aluno Douglas Vivona junto ao Programa de Pós-Graduação da FCF-USP;
5. Divulgação dos resultados em Congressos Nacionais e Internacionais;
6. Publicação de artigos científicos em revistas estrangeiras e nacionais

IV COMENTÁRIOS

Trata-se de pesquisa clínica e prospectiva, de risco baixo, envolvendo Santa Casa de Misericórdia de SPaulo, Hospital Brigadeiro SP e Faculdade de ciências Farmacêuticas da USP, SP, envolvendo 385 sujeitos, sendo 80 na Santa Casa de

29 Jun 2009 11:08

11-21767259

p. 4

SPaulo, que deveram se submeter à análise laboratorial, entrevistas e questionários, além da análise de prontuários. Não envolve risco ambientais, não consta o orçamento detalhado, e os serviços atendimento ambulatorial referem estrutura para realização da pesquisa. Cronograma de execução da pesquisa 2 anos após aprovação do comitê. Constan a carta da Comissão científica do Hemocentro SCasa SP, página de rosto, o TCLE está em linguagem clara e acessível ao sujeito leigo da pesquisa, constam a carta de aprovação do CEP Hospital Brigadeiro,

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 Kelske Ono
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
ISCMSP

ANEXO 4- FICHA DO ALUNO

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6962662/1 - Douglas Vivona

Email: dovivona@hotmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)

Data de Nascimento: 28/07/1982

Cédula de Identidade: RG - 21.136.362-5 - SP

Local de Nascimento:

Nacionalidade:

Graduação: Bacharel em Farmácia - Universidade Metodista de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2007

Curso: Mestrado

Programa: Farmácia (Análises Clínicas)

Área: Análises Clínicas

Data de Matrícula: 13/07/2009

Início da Contagem de Prazo: 13/07/2009

Data Limite: 13/01/2012

Orientador: Prof(a). Dr(a). Elvira Maria Guerra Shinohara - 13/07/2009 até o presente. E.Mail: emguerra@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 13/07/2009

Prazo para Realização do Exame de Qualificação: 03/10/2010

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 14/09/2010

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 13/07/2009
 Mudança de Regulamento em 06/08/2009
 Matrícula de Acompanhamento em 01/07/2010

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6962662/1 - Douglas Vivona

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BIO5709-3/2	Doença Genética: da Mutação ao Fenótipo (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	28/07/2009	29/09/2009	120	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5757-2/1	Tópicos em Análises Clínicas II	17/08/2009	29/11/2009	30	2	80	A	N	Concluída
BIO5781-3/1	Análise Funcional dos Produtos Gênicos (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	19/08/2009	16/12/2009	120	8	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/3	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	19/08/2009	30/11/2009	120	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5793-9/2	Tópicos em Análises Clínicas I	08/03/2010	21/06/2010	30	2	80	A	N	Concluída
BIO5784-3/1	Organização do Genoma Humano (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	13/08/2010	25/11/2010	120	0	0	-	N	Matrícula cancelada
EDM5791-5/5	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	18/08/2010	30/11/2010	120	0	0	-	N	Aguardando avaliação

EDM5105-1/1	Docência no Ensino Superior e Complexidade: Contextos, Formação e Práticas (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	20/08/2010	30/11/2010	120	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBA5897-1/1	Nutrigenômica do Câncer	30/08/2010	05/09/2010	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5709-4/3	Biologia Molecular em Análises Clínicas	20/09/2010	24/10/2010	75	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5736-2/1	Alterações Bioquímicas e Moleculares nas Anemias	27/09/2010	31/10/2010	60	4	90	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

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	18
Estágios:			
Total:	0	25	18

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.

Faculdade de Educação
Programa de Pós-Graduação em Educação

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o(a) aluno(a) **Douglas Vivona**,
código USP 6962662, cursou a disciplina “**EDM 5791 – Metodologia do Ensino Superior**”, ministrada pela Profª. Drª. Myriam Krasilchik, no período de 18/08/2010 a 30/11/2010.

São Paulo, 12 de novembro de 2010.

Bruna Pozzi Rufato
Téc. Administrativo
NF 6708766

Avenida da Universidade, 308 – São Paulo – SP CEP 05508-040
Fone – (11) 3091-3519 e-mail – posfe@usp.br
www.fe.usp.br

ANEXO 5- INSTRUÇÕES PARA DEFESA FCF/USP

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. Não serão permitidas correções na dissertação/tese. Assim, havendo extrema necessidade, poderá ser incluída uma errata.

4. A sessão de defesa será aberta ao público.

5. 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.

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

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

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

São Paulo, 11 de dezembro de 2009.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

Presidente da CPG/FCF/USP