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

**Estudo da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 e sua relação
com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em
pacientes com leucemia mieloide crônica**

Douglas Vivona

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo

2013

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

**Estudo da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 e sua relação
com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em
pacientes com leucemia mieloide crônica**

Douglas Vivona

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

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

Vivona, Douglas

V863e Estudo da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 e sua relação com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica / Douglas Vivona. -- São Paulo, 2013.
166p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Guerra-Shinohara, Elvira Maria

1. Leucemia mieloide crônica 2. DNA : Polimorfismo genético
I. T. II. Guerra-Shinohara, Elvira Maria, orientador.

616.155 CDD

Douglas Vivona

Estudo da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 e sua relação com
marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com
leucemia mieloide crônica

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Orientadora/Presidente

1°.examinador

2°.examinador

3°.examinador

4°.examinador

São Paulo , ____ de _____ de _____

DEDICATÓRIA

À Deus e Jesus Cristo por me acompanhar a cada momento

Ao meu pai, Jessé Vivona, fiel incentivador da minha educação, grande pai e companheiro, de onde ele estiver com certeza estará orgulhoso desta conquista.

À minha mãe, Laura Garcia Vivona, exemplo de mãe e amor.

À minha esposa, Lais Dutra Vivona, companheira e parceira de todos os dias que acompanhou toda esta batalha do começo ao fim.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo, que me acolheu nestes últimos 5 anos.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo por ter fomentado toda a pesquisa e bolsa para realização deste projeto.

À minha orientadora Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, por todas oportunidades, conselhos e ajuda durante minha pós-graduação.

À minhas amigas e companheiras da equipe da LMC, Carol e Luciene. Vou levar para sempre no coração, este espaço é pouco para agradecer tudo que vocês fizeram por mim.

À Alice Rodrigues por toda ajuda durante os ensaios de atividade. Durante este período tiver a oportunidade de conhecer uma ótima pessoa, grande pesquisadora e companheira. Obrigado por tudo.

À Renata Albuquerque por toda ajuda na citometria de fluxo.

À Dra. Maria Aparecida Zanichelli e Dra. Dulce Collassanti que sempre me incentivaram na obtenção do conhecimento.

À Dra. Renata Nunes por toda ajuda na seleção dos pacientes na segunda fase deste projeto.

À toda equipe do hemocentro da Santa Casa de São Paulo, em especial ao Dr. Carlos Sérgio Chiattoni, Dra. Vania Hungria, Gislaine, Bruna e Jéssica, pelo

espaço e liberdade que nos deram para a seleção e acompanhamento dos pacientes.

Aos pacientes que contribuíram de forma anônima para este estudo.

Aos meus amigos 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. **Estudo da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 e sua relação com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica** 2013. 166 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma expansão clonal da célula tronco hematopoética, traduzindo-se por hiperplasia mieloide, 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 codifica uma proteína com elevada atividade tirosinoquinase e tem um papel central na patogenia da LMC. O mesilato de imatinibe (MI) é um derivado da fenilaminopirimidina que inibe a proteína tirosinoquinase BCR-ABL1 *in vitro* e *in vivo*. O MI interage com transportadores de membrana de influxo, como o *organic cation solute carrier 22 ,member 1* (SLC22A1,hOCT1); e de efluxo, como *ATP binding cassette B1* (ABCB1, MDR1, P-gp). Os polimorfismos ABCB1 c.1236C>T, C.3435C>T e c.2677G>T/A têm sido associados com a alteração da função da P-gp. Este estudo teve por objetivo investigar a relação da expressão do RNAm de ABCB1 e SLC22A1 com marcadores de resposta ao tratamento com MI e avaliar a atividade funcional da P-gp em células mononucleares de pacientes com diferentes haplótipos para os polimorfismos ABCB1 c.1236C>T, c.3435C>T e c.2677G>T/A. Foram incluídos 118 pacientes com LMC para o estudo da expressão do RNAm de SLC22A1 e ABCB1 e para o estudo da atividade da P-gp foram selecionados 28 pacientes de acordo com os haplótipos dos polimorfismos ABCB1 c.1236C>T, c.3435C>T e c.2677G>T/A. Para o estudo da expressão do RNAm de SLC22A1 e ABCB1 foram constituídos dois grupos: Grupo 1 com 70 pacientes com resposta citogenética completa com a dose padrão de MI (400 mg/dia de MI) em 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. Para o estudo da atividade funcional da P-gp, dos 118 pacientes incluídos, foram selecionados 10 pacientes que apresentaram o haplótipo 1236CC/3435CC/2677GG, 10 pacientes que apresentaram o haplótipo 1236CT/3435CT/2677GT e 8 pacientes que apresentaram o haplótipo 1236TT/3435TT/2677TT. A resposta ao tratamento foi avaliada segundo os critérios da *European LeukemiaNet*. Amostras de sangue foram obtidas para: quantificação de *BCR-ABL1*, extração do RNAm total, análise citogenética de banda G, dosagem da concentração plasmática de MI e análise da atividade e expressão da P-gp. A análise da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 foi feita por PCR em tempo real, a análise da atividade e expressão da P-gp foram feitas por citometria de fluxo e a dosagem da concentração plasmática de MI foi realizada por eletroforese capilar. **Resultados:** A expressão de *ABCB1* e *SLC22A1* foi analisada nos 118 pacientes incluídos e foi similar entre os grupos de resposta. A elevada expressão do gene SLC22A1 foi associada àqueles pacientes que alcançaram a resposta molecular maior (RMM) no grupo respondedor (P=0,009). Não houve associação entre a expressão de *ABCB1* e a resposta ao MI. Nenhum dos genes foi associado à resposta molecular completa (RMC). No estudo da atividade da P-gp foi observada uma maior atividade nos pacientes que apresentavam o haplótipo 1236CC/3435CC/2677GG quando comparado àqueles

que possuíam o haplótipo com alelo mutado. Não houve diferença na expressão do RNAm dos genes SLC22A1 e ABCB1, expressão da P-gp e concentração plasmática de MI entre os grupos de haplótipos. Os pacientes que não alcançaram a RMM apresentaram uma maior taxa de efluxo mediado pela P-gp quando comparado aos indivíduos que alcançaram esta resposta (64,7% vs. 45,7%; $P=0,001$). Os indivíduos que alcançaram a RMM e RMC apresentaram maior mediana de expressão do gene SLC22A1. Os pacientes sem RMM apresentaram menor concentração plasmática de MI quando comparados aos que alcançaram esta resposta (0,51 $\mu\text{g/mL}$ vs. 1,42 $\mu\text{g/mL}$; $P=0,001$). Não foi observada associação entre a concentração plasmática de MI e a RMC. Em conclusão os pacientes respondedores a dose padrão de 400mg/dia de MI e que alcançaram a RMM apresentam maior expressão de RNAm de SLC22A1 e os portadores dos haplótipos 1236CT/3435CT/2677GT e 1236TT/3435TT/2677TT exibem menor efluxo mediado pela P-gp apresentando maior frequência de RMM.

Palavras-chave: ABCB1, SLC22A1, Imatinibe, P-gp

ABSTRACT

VIVONA, D. **Study of the expression of SLC22A1 and ABCB1 genes and their relationship with markers of response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia** 2013. 166 p. Thesis (Ph.D) - School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2013.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal expansion of hematopoietic stem cell, translating into myeloid hyperplasia, leukocytosis, neutrophilia, basophilia and splenomegaly. The Philadelphia chromosome is characteristic of the disease, being the product of the translocation t(9;22)(q34;q11), resulting in the fusion of the BCR and ABL genes. This fusion generates a hybrid gene that encodes a protein with elevated tyrosine kinase activity and plays a central role in the pathogenesis of CML. Imatinib mesylate (IM) is a derivative of fenilaminopirimidine that inhibits BCR-ABL1 fusion protein tyrosine kinase *in vitro* and *in vivo*. IM interacts with uptake membrane transporters, such as cation organic solute carrier 22, member 1 (SLC22A1, hOCT1) and efflux as ATP binding cassette B1 (ABCB1, MDR1, P-gp). ABCB1 polymorphisms c.1236C>T, c.3435C>T and c.2677G>T/A have been associated with altered function of P-gp. This study aimed to investigate the relationship between mRNA expression of ABCB1 and SLC22A1 with markers of response to treatment with IM and evaluate the functional activity of P-gp in mononuclear cells of patients with different haplotypes for ABCB1 c.1236C>T, c.3435C>T and c.2677G>T/A polymorphisms. This study included 118 patients with CML to study the mRNA expression of SLC22A1 and ABCB1 and to study the P-gp activity, 28 patients were selected according to the haplotypes of ABCB1 c.1236C>T, c.3435C>T and c.2677G>T/A polymorphisms. To study the mRNA expression of SLC22A1 and ABCB1, two groups were constituted: Group 1 with 70 patients with a complete cytogenetic response with standard-dose IM (400 mg/day) in 18 months, and group 2 with 48 patients without complete cytogenetic response with the initial dose of IM (400 mg/day) or have lost this response during treatment. To study the P-gp functional activity, 10 patients with haplotype 1236CC/3435CC/2677GG, 10 patients with haplotype 1236CT/3435CT/2677GT and 8 patients with haplotype 1236TT/3435TT/2677TT were enrolled. Treatment response was assessed according to European LeukemiaNet criteria. Blood samples were obtained for: quantification of BCR-ABL1, mRNA extraction, G band cytogenetic analysis, measurement of IM plasma levels and P-gp activity and expression. The ABCB1 and SLC22A1 gene expression analysis was made by real-time PCR, analysis of P-gp activity and protein expression were performed by flow cytometry and determination of plasma Levels of IM was performed by capillary electrophoresis. Results: Expression of *ABCB1* and *SLC22A1* were analyzed in 118 patients included and was similar between the response groups. Higher expression of the *SLC22A1* gene was associated with those patients who achieved a major molecular response (MMR) in the responder group (P=0.009). There was no association between *ABCB1* expression and IM response. None of the studied genes was associated with complete molecular response (CMR). In the study of P-gp activity we observed greater activity mediated by P-gp in patients with 1236CC/3435CC/2677GG haplotype when compared to those with the mutated allele. There was no difference in mRNA expression of *SLC22A1* and *ABCB1* genes, P-gp expression and IM plasma levels between haplotypes groups. Patients who did not achieve MMR showed a higher rate of efflux mediated by P-gp compared to

individuals who did achieve this response (64.7% vs. 45.7%, $P=0.001$). Individuals who achieved MMR and CMR had higher median of SLC22A1 expression. Patients without MMR had lower IM plasma levels compared with those who achieved this response (0.51 $\mu\text{g/mL}$ vs. 1.42 $\mu\text{g/mL}$, $P=0.001$). No association was observed between IM plasma levels and CMR. In conclusion patients responders to standard dose of IM (400 mg/day) and who achieved MMR have higher SLC22A1 mRNA expression and the carriers of 1236CT/3435CT/2677GT 1236TT/3435TT/2677TT haplotypes exhibit lower efflux mediated by P-gp with higher frequency of MMR.

Keywords : ABCB1, SLC22A1, Imatinib, P-gp

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	16
1.1	Fisiopatologia da LMC	17
1.1.2	O Gene BCR-ABL1	18
1.2	Vias de Sinalização Celular Ativadas por BCR-ABL1	19
1.3	Fases da LMC	22
1.3.1	Fase crônica	22
1.3.2	Fase acelerada	22
1.3.3	Crise blástica	23
1.4	Fatores prognósticos	24
1.5	Diagnóstico laboratorial	25
1.6	Tratamento farmacológico	25
1.7	Mesilato de Imatinibe (MI) (Glivec®)	27
1.8	Monitoramento do número de transcritos <i>BCR-ABL1</i>	30
1.9	Indução de resistência ao Mesilato Imatinibe (Glivec®)	33
1.9.1	Mecanismos <i>BCR-ABL1</i> dependentes	33
1.9.2	Mecanismos <i>BCR-ABL1</i> independentes	36
1.10	Interação com transportadores de membrana	36
1.11	Características dos genes SCL22A1 e ABCB1 e das proteínas codificadas por estes genes	37
1.11.1	<i>SLC22A1</i> (hOCT1)	37
1.11.2	<i>ABCB1</i> (MDR1,P-gp)	39
1.12	Polimorfismos no gene ABCB1	44
2.	OBJETIVO GERAL	50
2.1	Objetivos Específicos	50
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.2	Critérios de inclusão e exclusão	53
3.3	Aspectos Éticos	53
3.4	Amostras Biológicas	54
3.5	Análise citogenética para pesquisa de alterações cromossomais	54
3.6	Quantificação do transcrito <i>BCR-ABL1</i> por RT-PCR em tempo real	56
3.7	Extração do RNAm e síntese do DNA complementar (cDNA)	57

3.8	Escolha do gene de referência	58
3.9	Avaliação das eficiências dos ensaios	58
3.10	Escolha do gene endógeno	59
3.11	Eficiência	59
3.12	Determinação da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1	60
3.13	Expressão da P-gp por citometria de fluxo	61
3.14	Atividade funcional da P-gp por citometria de fluxo	62
3.15	Dosagem plasmática do Mesilato de Imatinibe	62
3.16	Análises Estatísticas	64
4.	RESULTADOS	66
4.1	Resposta ao tratamento com MI	70
4.2	Expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 em pacientes (grupo total, respondedores e não respondedores) ao diagnóstico (Pré-tratamento) e durante o tratamento com MI	71
4.3	Comparação das expressões de RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 nos grupos de respondedores e não respondedores a dose padrão de MI	73
4.3.1	Expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 em pacientes (grupo total, respondedores e não respondedores) com e sem resposta molecular maior (RMM)	74
4.3.2	Expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 em pacientes grupo total, respondedores e não respondedores) com e sem resposta molecular completa (RMC)	77
4.3.3	Expressão de RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 nos subgrupos com resistência primária e secundária quando comparadas com o grupo respondedor	79
4.4	Análise da atividade funcional da P-gp	80
4.4.1	Características dos indivíduos incluídos no estudo da atividade funcional da P-gp	80
4.4.2	Determinação da atividade funcional da P-gp nos 3 grupos de Pacientes	82
4.4.3	Expressão do RNAm do gene ABCB1 e expressão da P-gp nos grupos A e B	84

4.4.4	Expressão do RNAm do gene SLC22A1 nos grupos A e B	85
4.4.5	Concentração plasmática do MI nos grupos A e B	86
4.4.6	Correlação entre o número de transcritos BCR-ABL1, atividade e expressão da P-gp, expressão do RNAm do gene ABCB1 e SLC22A1 e concentração plasmática do MI	87
4.4.7	Efeito da atividade funcional e expressão da P-gp, expressão do RNAm do gene ABCB1 e SLC22A1 e concentração plasmática do MI em grupos de pacientes segundo a resposta molecular maior (RMM) e completa (RMC)	90
5.	DISCUSSÃO	92
5.1	Expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1	94
5.2	Análise da atividade funcional da P-gp	99
6.	CONCLUSÃO	110
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
	APÊNDICES	124
	ANEXOS	130

1.INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal que surge da transformação neoplásica das células progenitoras pluripotentes, resultando em uma granulocitose progressiva. Descrita pela primeira vez em 1845 pelos patologistas Bennet, Craigie e Virchow (WONG & WITTE, 2004), a LMC foi a primeira doença neoplásica a ser associada a uma mutação cromossômica adquirida, o cromossomo Philadelphia (Ph) (NOWELL & HUNGERFORD, 1960). Este cromossomo resulta de uma translocação balanceada recíproca entre o cromossomo 9 e o cromossomo 22 $t(9;22)(q34;q11)$ (ROWLEY, 1973) e dá origem ao oncogene de fusão BCR-ABL1. O clone anômalo proveniente desta se expande e infiltra o parênquima medular, de modo lento e progressivo, em detrimento da proliferação das células normais. (KANTARJIAN et al., 2006).

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).

A exposição à radiação é um fator associado ao desenvolvimento da LMC. 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). Pacientes que receberam irradiação terapêutica para o tratamento do câncer possuem pequeno, mas significativo risco de desenvolverem

leucemia. Não há influência familiar ou étnica. Os vírus, substâncias químicas e outros fatores ambientais não têm sido associados a esta patologia (GOLDMAN, 2008).

1.1 Fisiopatologia da LMC

A LMC caracteriza-se, pela proliferação de células granulocíticas que mantêm sua capacidade de diferenciação e maturação. 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 $t(9;22)(q34;q11)$ (**Figura 1**) (O'DAWYER, 2002). Esta translocação justapõe o oncogene ABL (*Abelson Leukemia Virus*), localizado no cromossomo 9q34, ao gene BCR (*Breakpoint Cluster Region*), localizado no cromossomo 22q11. Em condições normais, o gene BCR codifica uma proteína com função relacionada à regulação do processo de sinalização e divisão celular, enquanto o gene ABL codifica uma proteína tirosinoquinase que participa da regulação do ciclo celular e da resposta a estresse genotóxico (GOLDMAN, 2008).

Em nível molecular a translocação cromossômica $(9;22)(q34;q11)$ 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 à formação de RNAs mensageiros que são traduzidos em uma proteína quimérica de 210 kDa, BCR-ABL1 (DRUKER et al., 2006). A BCR-ABL1 apresenta atividade tirosinoquinase elevada, responsável pelo aumento da proliferação e do bloqueio da apoptose na célula progenitora hematopoética.

Figura 1: Translocação, $t(9;22)(q34;q11)$, resultando no cromossomo Philadelphia (LYDON, 2009)

1.1.2 O Gene BCR-ABL1

O gene híbrido BCR-ABL1 é responsável pelo processo molecular que determina a transformação da célula progenitora hematopoética normal em maligna. A célula leucêmica BCR-ABL1 apresenta uma mieloproliferação contínua, resultante de três mecanismos principais: alteração da adesão das células progenitoras às células estromais e à matriz extracelular, manutenção de um sinal mitogênico constante e resistência a apoptose celular. A tirosinoquinase BCR-ABL1 confere à célula leucêmica uma alta resistência à morte celular, independentemente do agente indutor deste processo. Esta tirosinoquinase liga-se ao ATP e transfere fosfato deste para resíduos de tirosina em proteínas específicas. Essas proteínas, agora fosforiladas, tornam-se responsáveis por toda uma série de etapas que levam aos efeitos fisiopatológicos observados na LMC. Por essa razão, se a ligação do ATP com essa tirosinoquinase 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).

1.2 Vias de Sinalização Celular Ativadas por BCR-ABL1

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

O domínio receptor tirosinoquinase 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 tirosinoquinase 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, acredita-se 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 sequências codificadoras dos genes BCR e ABL impulsiona a atividade de tirosinoquinase. Esta falta de controle ocasiona a expansão descontrolada dos clones hematopoéticos, que é 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 sabe-se que envolvem as MAPKs (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)**.

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, desencadeiam morte celular (SUDA et al., 2002). 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 (DEININGER et al., 2000).

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 STATs 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.(DEININGER et al., 2000; RANDOLPH, 2005). O conhecimento destas vias de sinalização proporcionou o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da LMC (**Figura 3**).

Figura 2: Vias de sinalização celular ativadas BCR-ABL1 (GOLDMAN et al., 2003)

Figura 3: Vias de sinalização inibidas pelo MI e outros fármacos (GOLDMAN et al., 2003)

1.3 Fases da LMC

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

1.3.1 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 é normal ou aumentada, 30% dos pacientes exibem trombocitose e menos de 10% apresentam trombocitopenia. A medula óssea mostra intensa hiperplasia granulocítica, exibindo morfologia praticamente 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).

1.3.2 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 o 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 grupo 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 a 20% e persistente trombocitopenia ($<100.000/\text{mm}^3$) não relacionada à terapia (BACCARANI et al., 2006).

1.3.3 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 transição da forma crônica para a crise blástica é provavelmente resultado de evolução clonal das células BCR-ABL1 positivas com desregulação de múltiplos genes (SILLABER et al., 2004). As anormalidades cromossômicas mais frequentes na evolução clonal citogenética são a trissomia 8, cromossomo Ph adicional, e isocromossomo 17, mas outras anormalidades podem ocorrer. Pacientes que têm apenas evolução clonal como critério da fase acelerada tem melhor prognóstico do que pacientes que apresentam outros fatores adicionais (SILLABER et al., 2004).

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 mieloide (CORTES et al., 1996)

Quando a crise blástica ocorre de forma extramedular, uma variedade de sintomas e sinais podem se estabelecer, dependentes dos sítios envolvidos. Os mais frequentes são linfonodos, superfície de serosas, pele, tecidos moles, mamas, gastrointestinal ou genitourinário, esqueleto e sistema nervoso central (CORTES et al., 1996)

1.4 Fatores prognósticos

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

1.5 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 evidência neoplásica sistêmica. A identificação do cromossomo Ph ou identificação do gene híbrido BCR-ABL1 em leucócitos por técnicas de biologia molecular definem o diagnóstico. Já na fase acelerada é encontrado aumento do número de basófilos e blastos. A fase aguda caracteriza-se por presença de 20% ou mais de blastos no sangue periférico ou medula óssea (CORTES et al., 2006)

1.6 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 (RHC): quando permanecem normais por quatro semanas, no mínimo, a medula óssea ($\leq 5\%$ de blastos (mielócitos ou metamielócitos); o sangue periférico (leucócitos $<10.000/\text{mm}^3$ 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 (RCC): é definida como a ausência de metáfases Ph positivas em pelo menos 20 células analisadas (BACCARANI et al., 2009)
- Resposta molecular maior (RMM): redução de 3 logs ($\leq 0,1\%$) dos níveis de *BCR-ABL1* (BACCARANI et al., 2009)

- Resposta molecular completa (RMC): 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.

Com a descoberta do mesilato de imatinibe (MI) houve uma mudança 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).

Antes do desenvolvimento do MI, a sobrevida dos pacientes era de 5 a 6 anos após o diagnóstico (AGRAWAL et al., 2010). Desse modo, o MI mudou a história natural da LMC aumentando consideravelmente a sobrevida dos pacientes (**Figura 4**).

Figura 4. Curva de sobrevivência dos pacientes com LMC em várias terapias durante o período de 1983 a 2009, conforme observado pelo Grupo Alemão de Estudos em LMC (HEHLMANN, 2009 adaptado). IFN: interferon α , SCT: *allogeneic stem cell transplantation*.

Entretanto, nem todos os pacientes têm boa resposta ao MI e alguns podem desenvolver resistência depois de algum tempo de uso (SOUZA & PAGNANO, 2004). 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).

1.7 Mesilato de Imatinibe (MI) (Glivec®)

O mesilato de imatinibe - MI (Glivec®) é um derivado da fenilaminopirimidina, age como inibidor da tirosinoquinase BCR-ABL1, bloqueando assim diferentes vias de sinalização celular que estavam ativadas por esta proteína. Este inibe a ligação do ATP a essa enzima tirosinoquinase, bloqueando uma série de etapas que levam aos efeitos fisiopatológicos observados na LMC (**Figura 5**).

Figura 5: Mecanismo de ação do MI (GOLDMAN et al., 2003)

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 monócitos (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 encontrado 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).

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 (DRUKER et al., 2006, GOLDMAN et al., 2003, HOCHHAUS et al., 2009).

No entanto, cerca de 20% 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 (CROSSMAN et al., 2005, HOCHHAUS et al., 2007, JORGENSEN et al.; 2002; MAHON et al., 2003).

Com a identificação destas falhas ao tratamento foram desenvolvidos inibidores de tirosinoquinase de segunda geração como Nilotinibe, Dasatinibe e Busotinibe. O Ponatinibe representa atualmente o TKI de última geração e é o único que atua contra a mutação T315I (EIRING et al., 2011). Paralelo ao avanço destes fármacos, maiores avanços foram alcançados no que diz respeito ao monitoramento e padronização dos critérios de resposta ao MI (SANTOS et al., 2011).

1.8 Monitoramento do número de transcritos BCR-ABL1

Antes da era imatinibe, as metas do tratamento farmacológico eram obter a resposta hematológica completa e a remissão citogenética completa. Após a introdução do MI na prática clínica, a resposta molecular se tornou o novo objetivo. Assim, os métodos moleculares tornaram-se essenciais para a avaliação da resposta à terapêutica em pacientes com LMC devido ao fato da frequência de RCC nestes pacientes que fazem uso de MI ser muito elevada (91% após 8 anos de tratamento) (DEININGER et al. 2009).

Os dados moleculares recolhidos com o estudo IRIS (*International Randomized Study of Interferon and STI-571*) 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). (Figura 6) Em pacientes que conseguiram atingir a 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*.

Figura 6: Cinética da queda do número de transcritos *BCR-ABL1* em 4 pacientes incluídos no estudo IRIS (A-D) tratados com MI por 1 ano após diagnóstico de LMC-FC (TANG et al., 2011)

As recomendações da *European Leukemianet* determinam a importância da monitoração molecular de pacientes com LMC na fase crônica. Ficou determinado que os pacientes que não atingissem a RMM em 18 meses de tratamento seriam classificados como resposta subótima. Baseado nestas recomendações ficou determinado pelo consenso brasileiro, que amostra obtida de pacientes em resposta

subótima deve ser analisada para a presença de mutações no gene ABL (BACCARANI et al., 2009, BENDIT, 2008)

1.9 Indução de resistência ao Mesilato Imatinibe (Glivec®)

Apesar dos avanços obtidos com a utilização do MI no tratamento dos pacientes com LMC, a resistência clínica depois da administração regular do fármaco obedece a múltiplas causas e, assim, células *BCR-ABL1* positivas persistem na medula óssea e sangue periférico de alguns pacientes (BENDIT, 2008).

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 à 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 ao 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) (QUINTÁS-CARDAMA et al., 2009).

A resistência ao MI pode ser dividida em resistência primária e secundária. A resistência primária é definida como a incapacidade de alcançar RHC em três meses, resposta citogenética em seis meses, resposta citogenética parcial em 12 meses, ou RCC em 18 meses (BACCARANI et al., 2009). Resistência secundária é caracterizada pela perda da resposta citogenética ao longo do tratamento com MI (BACCARANI et al., 2009; QUINTÁS-CARDAMA et al., 2009). Estes critérios para definição de falha de tratamento e resposta são estabelecidos pelo grupo de

especialistas da *LeukemiaNet*, baseado nos resultados do estudo IRIS (DEININGER et al., 2009).

Uma vez que o MI é atualmente a primeira linha de terapia para a LMC, a resistência aos inibidores da tirosinoquinase BCR-ABL1 tornou-se um problema terapêutico significativo e por isso, o estudo e caracterização dos mecanismos moleculares por detrás da resistência é neste momento fundamental. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a resistência ao MI. Estes mecanismos podem ser divididos em: *BCR-ABL1* dependentes e *BCR-ABL1* independentes (QUINTÁS-CARDAMA et al., 2009).

1.9.1 Mecanismos *BCR-ABL1* dependentes

Cerca de 55% dos casos de resistência podem ser explicados por mutações no gene BCR-ABL1 (HUGHES et al., 2009). Foram descritas a presença de mais de 100 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 ao MI (HOCHHLAUS et al., 2007) (**Figura 7**). Estas mutações podem dificultar a atividade do MI devido a alterações na conformação da tirosinoquinase o que leva ao rompimento de pontos de contato do fármaco com a proteína. As mutações encontradas com mais frequência são Y253, E255 e T315I (BRANFORD, 2007, BIXBY & TALPAZ, 2009).

Figura 7: Mapa das mutações no domínio quinase do gene *BCR-ABL1* relacionadas a resistência ao MI (APPERLEY, 2007). **(A)** Incidência de mutações em números absolutos e porcentagem do total. **(B)** Incidência mutações em ordem de frequência. p=alça de fosfato, b=sítio de ligação do MI, c=domínio catalítico, a=alça de ativação. Verde: mutações detectadas em 2 a 15%, Azul: mutações detectadas em 16 a 37 % e Vermelho: mutações detectadas em mais de 38% dos indivíduos com mutação.

As diferentes mutações pontuais não têm todas o mesmo significado clínico. Mutações no *P-loop* tendem a conferir níveis de resistência mais elevados, enquanto que outras apenas diminuem a sensibilidade ao MI o que, em alguns casos, pode ser ultrapassado com um aumento da dose do fármaco (HOCHHAUS et al., 2009). A mutação T315I, substituição de uma treonina por uma isoleucina no aminoácido 315

da quinase, foi a primeira mutação descrita em doentes (BENDIT, 2008). Esta substituição aminoacídica impede efetivamente a ligação do IM à proteína BCR-ABL1 e atualmente, é a única mutação descrita que torna as células leucêmicas totalmente insensíveis ao fármaco (APPERLEY, 2007). Esta mutação confere resistência também ao tratamento com os inibidores de tirosinoquinase de segunda geração Nilotinibe e Dasatinibe. Estudos recentes com doentes acompanhados ao longo do tempo têm mostrado que o perfil mutacional é dinâmico, isto é, o mesmo doente pode ter mais que uma mutação e a porcentagem de clones com cada mutação pode variar ao longo do tempo (GRANT et al., 2010).

As mutações pontuais não são induzidas pela atividade inibitória do IM, no entanto, a presença do IM após a aquisição da mutação atua como um mecanismo de seleção dos clones insensíveis ao tratamento que, por expansão clonal, levam progressivamente à ineficácia terapêutica do IM (APPERLEY, 2007).

A amplificação do gene BCR-ABL1 e a sua superexpressão como mecanismo de resistência ao IM foi descrita inicialmente em linhagens celulares resistentes ao fármaco (MAHON et al., 2000). Posteriormente, em estudo com 9 doentes sem resposta ao tratamento com IM observou-se que em 3 casos havia amplificação do gene BCR-ABL1 (GRANT et al., 2010).

O aumento da expressão do gene BCR-ABL1 pode resultar na duplicação do cromossomo Ph, na ocorrência de múltiplas cópias do gene BCR-ABL1 dentro do mesmo cromossomo, de ambos os fenômenos ou ainda da desregulação transcricional do gene (APPERLEY, 2007). A resistência em doentes surge quando o aumento de transcritos de *BCR-ABL1* se traduz num aumento da quantidade de proteína. Assim, as concentrações terapêuticas de IM deixam de ser suficientes para inibir toda a proteína BCR-ABL1 existente nas células (HOCHHAUS et al., 2009).

Em alguns casos, o aumento da dosagem diária de IM pode superar este mecanismo de resistência (BENDIT, 2008).

Outros mecanismos envolvidos na resistência ao IM são considerados independentes da proteína BCR-ABL1 e estão envolvidos maioritariamente em casos de resistência primária.

1.9.2 Mecanismos *BCR-ABL1* independentes

O IM é administrado por via oral e, assim como outros medicamentos pode estar sujeito a não aderência ao tratamento, a variações na metabolização, seja por inativação enzimática ou até mesmo por indução da expressão das isoenzimas do citocromo P450 CYP3A4/A5, bem como a ligação a proteínas plasmáticas a alfa1 glicoproteína ácida 1 (AGP1), falhas nos mecanismos apoptóticos devido a superexpressão da família SRC quinases, persistência de células-tronco quiescentes leucêmicas que exibem a refratariedade aos inibidores de tirosinoquinase, evolução clonal que se caracteriza por alterações cromossômicas adicionais ao Ph, mecanismos epigenéticos ou variações na expressão dos transportadores de membrana que fazem o influxo e efluxo do fármaco (APPERLEY, 2007, IBRAHIM et al., 2011, WANG et al., 2008).

1.10 Interação com transportadores de membrana

Diversos estudos mostraram que o IM é um substrato de transportadores de membrana relacionados ao efluxo de drogas como os da classe *ATP binding cassette* (ABC), como o ABCB1 (também chamado de MDR1 ou P-gp) e ABCG2 (também chamado de MXR ou BCRP) (BURGER et al., 2004, HAMADA et al., 2003, HEGEDUS et al., 2002) e de influxo como o SLC22A1 (também chamado de hOCT1) (THOMAZ et al., 2004).

1.11 Características dos genes SLC22A1 e ABCB1 e das proteínas codificadas por estes genes

1.11.1 SLC22A1 (hOCT1)

Os transportadores cátions orgânicos também conhecidos como *Organic Cation Transporters* (OCTs) são responsáveis pelo influxo de cátions orgânicos. Esses cátions podem ser substâncias endógenas (por exemplo, dopamina) ou exógenas (procaína, cimetidina e MI), as quais em pH fisiológico, são positivamente carregadas. Devido ao amplo espectro das dimensões e estruturas moleculares destes cátions orgânicos, os OCTs são definidos como transportadores poliespecíficos. Após o desenvolvimento de técnicas de expressão clonal, foram identificados três subtipos de transportadores de OCT (OCT1, OCT2 e OCT3), todos transportadores eletrogênicos, reversíveis e independentes de Na⁺, cuja força se dá pelo gradiente eletroquímico do cátion orgânico transportado (CIARIMBOLI, 2008).

O primeiro subtipo isolado e identificado em rins de ratos foi nomeado como *rat organic cation transporter* (rOCT1). Esse transportador está presente na membrana basolateral dos túbulos proximais renais e de hepatócitos. O rOCT1 codifica uma proteína de 556 aminoácidos com uma estrutura secundária com 12 domínios transmembrana (GRUNDERMANN et al., 1994) (**Figura 8**). O gene do *human organic cation transporter* (hOCT1) foi identificado através da homologia do cDNA humano contra o rOCT1 (GORBOULEV et al., 1997). Em contraste ao rOCT1, o hOCT1 é expresso principalmente no fígado, granulócitos basófilos e em células tumorais e está localizado no cromossomo 6q26 (GORBOULEV et al., 1997). O gene do hOCT1, também denominado SLC22A1, é ativado pelo *hepatocyte nuclear factor-4alpha* (HNF-4alpha) e suprimido por ácidos biliares (CIARIMBOLI, 2008).

Figura 8: Modelo da topologia do SLC22A1 (hOCT1) na membrana plasmática (CIARIMBOLI,2008 adaptado)

A expressão do gene SLC22A1 e de outros transportadores de influxo pode determinar a concentração intracelular do fármaco e, conseqüentemente, a resposta ao MI. Alguns estudos avaliaram o efeito do MI nos transportadores de influxo SLC22A1 (THOMAS et al., 2004; GAO et al., 2005; LEE et al., 2005). O uso de inibidores reduziu a concentração intracelular de MI sugerindo que a captação deste fármaco foi mediada pelo transportador hOCT1 (THOMAS et al., 2004).

Efeito de transportadores de captação foram observados por White et al. (2007) que realizaram um estudo em 99 pacientes recém diagnosticados para LMC avaliando a atividade do SLC22A1 *in vitro* através do uso de MI marcado com C14 na presença e ausência da inibição do transportador pelo prazosin. Pacientes com maior atividade de SLC22A1 mostraram respostas moleculares mais precoces do que aqueles com menor atividade. Portanto, a atividade e possíveis polimorfismos já estabelecidos no gene SLC22A1 podem ser fatores de resistência ao MI (KERB et al., 2002).

A baixa expressão do gene *SLC22A1* foi associada à resistência ao MI em pacientes com LMC (CROSSMAN et al., 2005), mostrando que a expressão diferencial de *SLC22A1* e de outros transportadores de membrana podem determinar as concentrações intracelulares e, conseqüentemente, podem afetar a resposta ao MI.

1.11.2 *ABCB1* (MDR1, P-gp)

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 à 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 sequência 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 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 9**).

Figura 9: Imagem tridimensional da glicoproteína P (WOLF et al., 2011 adaptado)

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 enquanto no intestino, reduz a absorção das mesmas (WATKINS, 1997). **(Figura 10)**

Células do sistema imunológico também expressam P-gp e diversos dados sugerem um papel importante desta na resposta imunológica. Chaudhary et al., 1992, analisaram a expressão de P-gp constatando que há um gradiente de expressão desta proteína nas células do sistema imunológico, sendo a expressão em células CD56+>CD8+>CD4+. Da mesma forma, outro estudo observou que a P-gp é mais expressa em células CD56+(NK) e CD8+(linfócito T citotóxico) quando comparada a células CD4+ (linfócitos T auxiliar), Cd19+ (linfócitos B) e Cd 14+(monócitos), enquanto células CD15+ (granulócitos) apresentam baixa expressão da proteína na superfície (FISCHER et al., 2001).

Figura 10: Distribuição da P-gp em diferentes tecidos. (MARZOLINI et al., 2004)

Alguns estudos têm utilizado cultura de células para avaliação a resistência ao MI mediada por *ABCB1*. 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 da P-gp, 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 da P-gp alteravam o fenótipo resistente ao MI.

Outros estudos demonstraram que expressões elevadas do gene ABCB1 foram associadas a menores concentrações intracelulares do MI, diminuindo o efeito antiproliferativo e que o uso de inibidores da P-gp (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 o gene ABCB1 ou a administração concomitantes de inibidores da P-gp 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.

1.12 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).

Este gene é altamente polimórfico e Hoffmeyer et al., 2000, descreveram inicialmente 15 SNPs (*single nucleotide polymorphism*) e hoje são conhecidos pelo menos 1279 SNPs neste gene, sendo 50 deles na região codificadora (FUNG et al., 2009).

Destes polimorfismos descritos, três tem sido especialmente estudados, sendo dois silenciosos c.1236C>T, c.3435C>T e um promotor de duas distintas mudanças de aminoácido c.2677G>T/A (Ala893Ser/Thr) (**Figura 11**). Hoffmeyer et al., 2000, estudaram 15 SNPs no gene ABCB1 porém apenas um apresentou correlação entre os níveis de expressão e atividade da P-gp: o da posição 3435 (éxon 26), onde ocorrerem as variantes alélicas C e T, ambas codificando o aminoácido isoleucina. Neste estudo indivíduos com o genótipo homozigoto para o alelo C do polimorfismo c.3435C>T 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 (c.3435C>T). Isto estaria relacionado com uma maior expressão do gene ABCB1 e,

consequentemente, uma maior atividade da P-gp, nos indivíduos com o genótipo CC. Entretanto, Chowbay et al., 2005 realizaram uma meta-análise avaliando estudos que genotiparam o polimorfismo C.3435C>T em indivíduos que faziam uso de digoxina e não foi observada influência deste polimorfismo na expressão de ABCB1 ou na farmacocinética da digoxina.

Figura 11: Localização dos polimorfismos c.1236C>T, c.3435C>T e c.2677G>T/A na P-gp (adaptado Tanabe et al., 2001)

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 genotípicas dos três principais polimorfismos, c.1236C>T, c.2677G>T/A e c.3435C>T, observando que apenas 3435T está envolvido neste processo. Entretanto, outros estudos não observaram nenhuma influência deste polimorfismo na expressão do gene ABCB1 em células hepáticas e intestinais (ALBERMANN et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006).

Indivíduos homozigotos para a variante 3435C foram associados com o aumento expressão de P-gp enquanto os portadores do genótipo 3435TT

apresentaram menor expressão deste transportador (SIDDIQUI et al., 2003). Estudos clínicos demonstraram que o genótipo 3435CC está associado com a maior probabilidade de remissão em pacientes portadores de LMA (KIM et al., 2006) e ao maior tempo de tratamento com imunossupressores em pacientes pediátricos submetidos a transplante de coração (ZHENG et al., 2002). O genótipo 3435TT foi associado a menor expressão de P-gp em linhagens celulares de carcinoma de ovário (SAUER et al., 2002). Recentemente, em estudo realizado com 113 pacientes tratados com o antidepressivo Venlafaxine, 73,3% dos portadores do genótipo 3435TT obtiveram remissão da doença enquanto apenas 12,5% dos portadores do genótipo 3435CC alcançaram a remissão com o tratamento com o antidepressivo (SINGH et al., 2012).

Além da associação dos polimorfismos no gene ABCB1 e a resistência a drogas, nos últimos anos foi identificada a relação entre o alelo 3435T e a suscetibilidade a algumas doenças, tais como infecções no trato gastrointestinal, doença de Parkinson, hipotensão induzida por nortriptilina, tumor renal epitelial e leucemia linfóide aguda (JAMZORIAK et al., 2004, LEE et al., 2005, SCHAEFFELER et al., 2001). Outros estudos não observaram associação entre polimorfismo c.3435C>T e o câncer gástrico, doença inflamatória intestinal e o câncer de pulmão (DOGU et al., 2012, DUDAREWICZ et al., 2012, OLIVEIRA et al., 2012).

A distribuição do polimorfismo c.3435C>T é significativamente influenciada pela etnicidade. A frequência de indivíduos portadores do genótipo 3435CC é maior entre a população de origem africana quando comparada aos caucasianos e asiáticos. (AMEYAW et al. 2001). A elevada frequência do alelo 3435C pode estar

associada à alta incidência de resistência a quimioterapia e a tumores mais agressivos em indivíduos de origem africana (DONG et al., 2009).

O polimorfismo c.1236C>T 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). Recentemente, o alelo 1236T foi associado ao maior tempo de sobrevida em pacientes portadores de leucemias submetidos ao TMO alogênico e a maior concentração do antiretroviral efavirenz em pacientes portadores de HVI (KOH et al., 2012; SWART et al., 2012)

O polimorfismo c.2677G>T/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). Estes dados foram confirmados por outro estudo que observou em portadores do haplótipo 2677TT/3435TT uma área sob a curva (AUC) de fexofenadina 47% maior quando comparada com portadores do haplótipo 2677GG/3435CC (YI et al., 2004). 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. O genótipo 2677GG foi associado a maior probabilidade de remissão completa em portadores de LMA (KIM et al., 2006). Os alelos 2677T/A foram preditores positivos

para a neurotoxicidade do tacrolimus em pacientes submetidos a transplante de fígado (YAMAUCHI et al., 2002). A frequência deste polimorfismo é variável entre diversos grupos étnicos, porém o alelo 2677A é mais comum entre indivíduos de origem japonesa e coreana (KIM et al., 2001)

Dulucq et al., 2008 estudaram em 90 pacientes portadores de LMC que eram tratados com MI a associação dos polimorfismos c.1236c>T, c.2677G>T/A e c.3435C>T com a resposta citogenética e molecular, mostrando que dos pacientes homozigotos para o alelo 1236T, 85% alcançaram a resposta molecular maior (RMM). Além disto, 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). Recentemente, foi demonstrado que pacientes portadores do genótipo 3435CC, possuíam um *clearance* de imatinibe significativamente maior quando comparado a indivíduos portadores dos genótipos 3435CT e 3435TT (YAMAKAWA et al., 2011), evidenciando assim, a importância destes polimorfismos na variabilidade individual na farmacocinética do imatinibe.

A possível associação dos polimorfismos c.1236C>T, c.2677G>T/A e c.3435C>T à alteração na expressão do gene ABCB1 levaram a especulações sobre a possível ligação entre eles. Diversos estudos indicam a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre estes 3 polimorfismos (ILLMER et al. 2004; MARZOLINI et al., 2004, FUNG et al. 2009). Foi observado nestes estudos que mais de 60% dos indivíduos analisados, independente da sua origem e etnia, apresentavam combinação de genótipos CC-CC-GG, CT-CT-GT e TT-TT-TT nas posições 1236, 3435 e 2677, respectivamente, Fung et al., 2009 não observaram alterações na expressão do RNAm e no comprimento da proteína P-gp em linhagem celulares que

expressavam os haplótipos selvagem e mutados, porém foi demonstrado que os haplótipos que continham os alelos mutados apresentavam importantes alterações estruturais que resultariam em mudanças na conformação de sítios de ligação de substratos e diminuição da atividade da P-gp.

Dados preliminares deste projeto mostraram que os pacientes portadores do haplótipo 1236CT/3435CT/2677GT, para os polimorfismos c.1236C>T, c.3435C>T e c.2677G>T/A no gene ABCB1, apresentaram 11,8 vezes maior chance de alcançar a resposta molecular maior quando comparado com aqueles respondedores ao MI e portadores de outros haplótipos. Este achado sugere que a possível diminuição da atividade da P-gp ligada a este haplótipo estaria associada à maior concentração intracelular de MI, o que teria como consequência a resposta molecular maior (VIVONA et al., 2012). Entretanto, nenhum estudou avaliou até o momento a influência dos haplótipos dos SNPs c.1236C>T, c.3435C>T e c.2677G>T/A na atividade funcional da P-gp em amostras clínicas de pacientes portadores de LMC tratados com MI.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a relação da expressão de genes de transportadores de membrana (*ABCB1* e *SLC22A1*) com marcadores de resposta ao MI, em indivíduos com LMC.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de RNAm dos genes *ABCB1* e *SLC22A1* em leucócitos de pacientes com LMC tratados com MI entre os grupos de respondedores e não respondedores
- Estudar a associação da expressão de RNAm dos genes *ABCB1* e *SLC22A1* e a resposta molecular maior e completa dos pacientes com LMC tratados com o MI, nos grupos total, respondedor e não respondedor
- Avaliar a atividade funcional da P-gp em amostras de leucócitos mononucleares de pacientes com diferentes haplótipos para os polimorfismos c.1236C>T, c.3435C>T e c.2677G>T/A.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 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 formados 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 de MI (400 mg/dia) ou que perderam esta resposta ao longo do tratamento e foram reescaloados para doses de 600 ou 800 mg/dia.

Dos 118 pacientes incluídos, foi possível obter amostras de RNA de 30 pacientes ao diagnóstico. Tais amostras foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Fabiola Attié de Castro, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, e analisadas no intuito de comparar a expressão basal dos genes ABCB1 e SLC22A1 com a expressão durante o tratamento com MI.

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

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, uso de outros medicamentos, risco Sokal, uso de bebidas alcoólicas e fumo.

Para avaliação da atividade funcional da P-gp, 28 pacientes foram selecionados de acordo com os genótipos ABCB1 c.1236C>T, c.3435C>T e

c.2677G>T. Os pacientes foram pareados quanto tempo de uso e dose do MI. Foram formados 3 grupos, o primeiro com 10 pacientes que apresentaram o haplótipo 1236CC/3435CC/2677GG (selvagem, grupo 1), o segundo, constituído por 10 pacientes que apresentaram o haplótipo 1236CT/3435CT/2677GT (heterozigoto, grupo 2) e o terceiro com 8 pacientes que apresentaram o haplótipo 1236TT/3435TT/2677TT (mutado, grupo 3).

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

Resposta	Definição
Hematológica	Contagem de plaquetas < 450 x 10 ⁹ /L Contagem de leucócitos <10 x 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	Completa – Transcrito não detectável
(Razão do transcrito do gene BCR-ABL de acordo com a escala internacional)	Maior: ≤ 0,1%

Quadro 2: Critérios de falha do tratamento segundo a *European LeukemiaNet* para pacientes com LMC tratados com MI (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

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos homens e mulheres maiores de 18 anos com diagnóstico de LMC, portadores de cromossomo Philadelphia (Ph), diagnóstico feito por análise citogenética, e que foram tratados com o 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 tais como: 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).

3.3 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). Os pacientes que participaram do estudo inicial e possuíam critérios para participar do estudo de atividade da P-gp foram convidados para nova coleta e reconsentidos através da aplicação de um novo 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.

3.4 Amostras Biológicas

Foram coletados 25 mL de sangue, uma única vez, de cada paciente. Deste sangue, 5 mL foram coletados em tubos a vácuo BD Vacutainer System[®] contendo o anticoagulante K₃EDTA, utilizados para realização do hemograma e estudos citogenéticos. O restante foi coletado em tubo PAXgene[®] para extração do RNAm (estudos de expressão gênica do ABCB1 e SLC22A1) em leucócitos de pacientes com LMC tratados com MI.

Para análise da atividade e expressão da P-gp e expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 foram coletados 25 mL de sangue de cada paciente, sendo que 20 mL foram coletados em tubos BD CPT[®] contendo Ficoll-Paque para separação das células mononucleares. Os outros 5 mL foram coletados em tubo a vácuo BD Vacutainer System[®] contendo o anticoagulante K₃EDTA para avaliação da concentração plasmática do MI. A coleta para dosagem da concentração plasmática de MI foi feita após 24 horas (± 2 horas) da última dose do MI, segundo o protocolo de Larson e colaboradores (2008).

3.5 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 um a dois mL.

A partir do material fixado, uma gota era colocada 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 envolvidas 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 bandejamento 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.

3.6 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 15µL.

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.

3.7 Extração do RNAm e síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a análise da expressão do RNAm dos genes *SLC22A1* e *ABCB1* entre respondedores e não respondedores ao MI, o sangue periférico dos pacientes foi coletado em tubos PAXgene® e congelados a -80°C e para o estudo da atividade da P-gp foram coletadas amostras em tubos BD CPT® e o RNAm foi extraído no mesmo dia da coleta. O RNAm foi extraído através do *PAXGENE Blood RNA Kit* (PreAnalytix/Qiagen, Alemanha) para o estudo da expressão do RNAm dos genes *SLC22A1* e *ABCB1* e para os pacientes incluídos no estudo da atividade da P-gp, o RNAm das células mononucleares foi extraído com o *RNeasy mini kit* (PreAnalytix/Qiagen, Alemanha). A concentração e a pureza do RNAm foram determinadas por espectrofotometria a 230nm utilizando o espectrofotômetro

Nanodrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA™ Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O ensaio de RT-PCR foi realizado em termociclador *Mastercycler Gradient* modelo 22331 (Eppendorf, Hamburg, Germany) com as seguintes etapas: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

3.8 Escolha do gene de referência

A análise da expressão gênica foi feita pelo método de quantificação relativa usando um gene como controle endógeno. Para a escolha deste gene de referência foi utilizado o programa geNorm™ (VANDESOMPELE et al., 2002). Foram testados 5 genes listados na tabela abaixo:

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

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

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

3.9 Avaliação da eficiência dos ensaios:

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

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

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

3.10 Escolha do gene endógeno

Foram selecionados 5 controles endógenos listados na **Tabela 1**. Foi realizada PCR em tempo real, utilizando amostras de pacientes respondedores e não respondedores, para cada um dos cinco genes endógenos escolhidos. A expressão relativa de cada um dos genes foi calculada e, a seguir, estes dados foram inseridos no programa geNormTM (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Segundo o programa, o gene considerado com menor estabilidade de expressão (M) para as amostras foi o *B2M* (M=0,823), com estabilidade intermediária foram os genes *HMBS* (M=0,641), *SDHA* (M=0,634) e *HPRT1* (M=0,459) e os genes com maior estabilidade foram *GAPDH* (M=0,652) e *UBC* (M=0,598). Tais coeficientes foram considerados adequados para a condução dos experimentos, pois estão dentro do valor de estabilidade de expressão aceitável para matrizes complexas ($M \leq 1$), como o sangue, de acordo com Hellemans e colaboradores (2007). Escolhemos o *GAPDH* para ser utilizado como controle interno.

3.11 Eficiência

Foram realizados testes de PCR quantitativa, onde foram utilizadas diluições seriadas de cDNA (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) a partir de um *pool* de cDNA de pacientes respondedores e não respondedores ao MI. Os dados da concentração de

cDNA versus C_T para cada gene originou uma curva padrão, cujo coeficiente angular da reta foi utilizado para o cálculo da eficiência. As eficiências de amplificação foram de 101,6%, 104,2%, 102,1% para os genes GAPDH e ABCB1 e SLC22A1 respectivamente (**Quadro 3**).

Quadro 3: Eficiência da reação de PCR quantitativa para os genes estudados

	<i>GAPDH</i>	<i>ABCB1</i>	<i>SLC22A1</i>
Coeficiente Angular	-3,218	-3,115	-3,265
r^2	0,921	0,946	0,942
Eficiência (%)	101,6	104,2	102,1

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

3.12 Determinação da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1

A determinação da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 foi feita por PCR em tempo real utilizando o sistema Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) segundo a metodologia descrita por Hirayama e colaboradores (2008). Estes ensaios estão descritos na **Tabela 2**.

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

Gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>ABCB1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hs00184500_m1	67
<i>SLC22A1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hs00427552_m1	79
<i>GAPDH</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hs00266705_g1	74

pb: pares de bases

Os valores quantitativos da expressão dos genes foram obtidos pelos valores do C_T ou limiar da amplificação, que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de

quantificação relativa (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Expressão} = 2^{-\Delta C_T}$$

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

Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram realizados controles sem amostra (controle negativo) para avaliar possíveis contaminações dos reagentes com os produtos de PCR. Os valores obtidos pelo método $2^{-\Delta C_T}$ foram multiplicados por 1.000 para melhor representação.

3.13 Expressão da P-gp por citometria de fluxo

Amostras de células mononucleares de pacientes dos 3 grupos foram testadas para a expressão da P-gp que foi quantificada utilizando anticorpo monoclonal de camundongo anti-P-gp humano 17F9. O protocolo foi adaptado de Rodrigues e colaboradores (2006).

Resumidamente, células mononucleares (1×10^6) foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído a 1% por 15 minutos à temperatura ambiente. Após 1 lavagem com PBS, as células foram incubadas com anticorpo primário anti-P-gp 17F9 por 40 min em temperatura ambiente. Então as células foram lavadas 1 x com PBS e incubadas com o anticorpo secundário, anticorpo de carneiro anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluorescência (FITC). A intensidade de fluorescência foi medida por citometria de fluxo no citometro FACSCanto II (BD,EUA), em comprimento de onda de 585 nm, o qual detecta fluorescência verde (FITC/17F9). Como controle negativo foi usado PBS ao invés do anticorpo primário.

Os resultados foram expressos como a razão entre a intensidade média de fluorescência (IMF) das células tratadas com anticorpo primário 17F9 e o anticorpo secundário marcado com FITC dividido pela IMF das células tratadas apenas com o anticorpo secundário (controle negativo). Razões maiores que 1,1 foram consideradas positivas para expressão da P-gp (ALBERMANN et al, 2005).

3.14 Atividade funcional da P-gp por citometria de fluxo

A atividade funcional da P-gp foi avaliada pela capacidade das células fazerem o efluxo celular de Rodamina (Rh123), substrato da P-gp, por citometria de fluxo (Lee & Piquette–Miller, 2001). Células (1×10^6) foram incubadas com Rh123 ($1 \mu\text{M}$) em PBS a 37°C por 15 minutos, no escuro. A seguir as células foram incubadas na presença e ausência do inibidor da P-gp, PSC-833 ($50 \mu\text{M}$), por uma hora a 37°C . A fluorescência da Rh123 foi determinada por citometria de fluxo através do aparelho FACSCantoll (BD, EUA), em comprimento de onda de 585 nm. A medida da atividade da P-gp nesse experimento de acumulação celular de Rh123, foi calculada pelas fórmulas abaixo, sendo o PSC-833 utilizado como controle positivo de inibição.

$$\% \text{ efluxo Rh123} = \frac{[\text{Rh123}]^{0\text{min}} - [\text{Rh123}]^{60\text{min}}}{[\text{Rh123}]^{0\text{min}}}$$

Efluxo mediado pela P-gp = % efluxo Rh123(ausência de PSC-833) - % efluxo Rh123 (presença de PSC-833)

3.15 Dosagem plasmática do Mesilato de Imatinibe

A dosagem do mesilato de imatinibe e de seu metabólito no plasma de todos pacientes que participaram do estudo da atividade funcional da P-gp foi feita no Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da Faculdade

de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP empregando a técnica de eletroforese capilar (AJIMURA et al., 2011).

O procedimento de preparação de amostra foi baseado na extração líquido-líquido que tem como princípio a partição do soluto entre duas fases imiscíveis: uma fase aquosa e outra orgânica. O plasma foi mantido congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongelado à temperatura ambiente no momento da análise.

Em tubo de extração foram transferidos 25 μL da solução de padrão interno e o solvente foi evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido. Foi adicionado 1 mL de plasma de paciente e o tubo foi agitado por 30 segundos em *mixer*, em seguida foram adicionados 200 μL de NaOH 1mol/L, 4 mL do solvente orgânico MTBE e o tubo foi novamente agitado por 2 minutos em *mixer*.

Após este tempo, os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 1800 *g*. A fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica foi recolhida em tubos de vidro de fundo cônico. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido, o resíduo reconstituído em 50 μL de solução metanol/água (30:70) e analisado por eletroforese capilar.

Foi preparada uma solução estoque de imatinibe pesando-se uma massa do fármaco correspondente a 5,0 mg (base livre), seguida da diluição em balão volumétrico de 5 mL com metanol, obtendo-se uma solução de concentração 1 mg/mL. A partir desta solução estoque foram preparadas soluções de trabalho também em metanol nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80, 100, e 200 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram armazenadas em tubos de vidro, protegidas da luz, sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

No preparo das amostras para condução dos estudos em eletroforese capilar, 25 μL da solução-padrão do fármaco foram transferidos para um tubo, o solvente foi

evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi reconstituído em 50 μ L de solução metanol/água (30:70 v/v) com o auxílio de um *mixer*.

A amostra para obtenção do espectro de absorção do mesilato de imatinibe foi preparada transferindo-se 500 μ L da solução padrão de concentração 100 μ g/mL para balão de 10 mL e completando-se o volume com metanol. O espectrofotômetro foi designado para operar no modo de varredura. Antes da varredura espectral da amostra, preparada em metanol como descrito acima, efetuou-se a correção da linha de base preenchendo-se uma cubeta de cristal de quartzo com este solvente, ou seja, o branco da amostra. Logo após, a cubeta foi lavada e preenchida com a solução do fármaco e submetida à varredura no intervalo de comprimento de onda correspondente a região do ultravioleta.

As análises eletroforéticas foram realizadas em um aparelho de eletroforese capilar da Agilent Technologies (Waldbrook, Alemanha), composto por um analisador modelo G1600A e um detector de arranjo de diodos. As injeções foram realizadas por um amostrador automático. O equipamento foi controlado pelo *software* Chemstation 3D-CE, versão A.08.03, que foi também usado na aquisição e tratamento dos dados. Espectrofotômetro UV-Vis da marca Femto (São Paulo, Brasil), modelo 800XI, controlado por computador, foi utilizado para a obtenção do espectro de absorção do mesilato de imatinibe.

3.16 Análises Estatísticas

A construção do banco de dados e análise estatística foram realizadas utilizando o programa computacional SPSS versão 17.0 (IBM,EUA).Os gráficos foram obtidos pelo programa GraphPad versão 5.04 (GraphPad Software, EUA).

Para descrever o perfil da amostra segundo as diversas variáveis em estudo, serão feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (Sexo, etc.) e estatísticas descritivas (com medidas de posição e dispersão) das variáveis contínuas (idade, variáveis hematológicas, bioquímicas, etc).

As variáveis numéricas foram comparadas utilizando o teste t de student ou Mann-Whitney. A comparação das variáveis categóricas (tratamento anterior ao MI, resposta citogenética e molecular) foi feita pelos testes de qui-quadrado ou *likelihood ratio*.

Para avaliação da diferença de expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 entre o grupo de pacientes respondedores a dose padrão de MI e não respondedores e a atividade da P-gp entre os grupos com diferentes haplótipos, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Correlações de Spearman foram realizadas entre as variáveis: atividade e expressão da P-gp, expressão do RNAm dos genes SLC22A1 e ABCB1, número de transcritos BCR-ABL1 e concentração plasmática do MI. Foram consideradas fortes correlações valores acima de 0,7, moderadas entre 0,7 e 0,3 e fracas abaixo de 0,3.

Modelos de regressão linear múltipla (com ou sem critério de seleção de variáveis – stepwise) foram usados para avaliar os fatores de predição para a resistência ao MI (considerada como variável dependente) e foram utilizadas as seguintes variáveis independentes: idade, sexo, grupo étnico, risco Sokal, expressão de genes de transportadores de membrana (*ABCB1* e *SLC22A1*).

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

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 3**. A avaliação do risco Sokal não foi realizada no grupo total de pacientes com LMC, pois alguns pacientes chegavam ao centro de avaliação previamente tratados com Hidroxicarbamida (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 segundo o gênero ($P>0,050$). 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.

Quando os grupos de resposta foram analisados separadamente, os grupos de respondedores e não respondedores tiveram distribuição similar quanto à idade, escolaridade, cor da pele, ocupação, índice massa corpórea (IMC), renda per capita,

exceto o tempo de uso do MI e tempo de diagnóstico da doença que foram maiores no grupo de respondedores ($P < 0,05$) (**Tabela 4**).

Tabela 3 – Distribuição da idade, escolaridade (em anos estudados), ocupação, renda per capita, cor de pele, IMC, tempo de tratamento com MI, tratamento prévio com outros medicamentos e tempo de diagnóstico dos pacientes portadores de LMC incluídos no estudo.

	Respondedor N=70		P valor	Não respondedor N= 48		P valor
	Homens N= 34	Mulheres N=36		Homens N=29	Mulheres N=19	
Idade*	51,4 (±15,6)	47,4 (±15,9)	0,297	53,9 (±11,0)	47,2 (±15,7)	0,092
Anos estudados*	7,4 (±3,7)	8,5 (±4,5)	0,288	7,9 (±3,9)	5,7 (±3,5)	0,067
Renda per capita*	1048,5 (±1091,1)	1493,9 (±2019,9)	0,259	1225,1 (±1232,9)	572,0 (±365,5)	0,013
Cor de pele declarada**						
Branco	27 (79,4%)	29 (80,6%)	0,905	22 (75,9%)	17 (89,5%)	0,223
Não Branco	7 (20,6%)	7 (19,4%)		7 (24,1%)	2 (10,5%)	
Ocupação**						
Sim	28 (87,5%)	14 (42,4%)	<0,001	23 (82,1%)	6 (33,3%)	0,001
Não	4 (12,5%)	19 (57,6%)		5 (17,9%)	12 (66,7%)	
IMC*	26,0 (±4,1)	26,2 (±4,6)	0,872	26,1 (±4,8)	27,3 (±4,6)	0,405
Tempo de tratamento com MI (em meses)*,a	50,9 (± 32,5)	54,3 (±35,4)	0,675	31,8 (±26,3)	43,9 (±27,7)	0,136
Tratamento anterior**						
Hidroxiuréia	12 (36,4%)	16 (45,7%)	0,042	8 (27,6%)	4 (21,1%)	0,543
Interferon-α	5 (15,2%)	0 (0%)		1 (3,4%)	1 (5,3%)	
Hidroxiuréia+ Interferon-α	13 (39,4%)	17 (48,6%)		20 (69,0%)	13 (68,4%)	
Nenhum	3 (9,1%)	2 (5,7%)		0 (0%)	1 (5,3%)	
Tempo de diagnóstico da doença	65,4 (±45,2)	70,0 (±48,7)	0,681	92,3 (±47,6)	78,6 (±28,7)	0,267

*As variáveis numéricas estão representadas por média e desvio padrão

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

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

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

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

Tabela 4– Distribuição da idade, escolaridade (em anos estudados), ocupação, renda per capita, cor de pele, IMC, tempo de tratamento com MI, tratamento prévio com outros medicamentos e tempo de diagnóstico dos pacientes respondedores e não respondedores ao MI

	Total N=118	Respondedor N=70	Não respondedor N= 48	P valor
Idade*	50,1(±14,8)	49,4 (±15,8)	51,2 (±13,4)	0,506
Anos estudados*	7,6 (±4,1)	8,0 (±4,1)	7,0 (±3,9)	0,207
Renda per capita*	1150,4 (±1428,4)	1277,6 (±1639,9)	961,1 (±1024,5)	0,242
Cor de pele declarada**				0,866
Branco	95 (80,5%)	56 (80,0%)	39 (81,3%)	
Não Branco	23 (19,5%)	14 (20,0%)	9 (18,7%)	
Ocupação**	71 (64,0%)	42 (64,6%)	29 (63,0%)	0,865
Sim	40 (36,0%)	23 (35,4%)	17 (37,0%)	
Não				
IMC*	26,3 (± 4,53)	26,08 (±4,37)	26,54 (±4,79)	0,583
Tempo de tratamento com MI (em meses)*	46,1 (±32,2)	52,7 (±33,9)	36,6 (±27,3)	0,025
Tratamento anterior**				
Hidroxiureia	40 (34,5)	28 (41,2)	12 (25,0)	0,058
Interferon-α	7 (6,0)	5 (7,4)	2 (4,2)	
Hidroxiureia + interferon-α	63 (54,3)	30 (44,1)	33 (68,8)	
Nenhum	6 (5,2)	5 (7,4)	1 (2,1)	
Tempo de diagnóstico da doença	75,53 (±45,5)	67,77 (±46,8)	86,85 (±41,4)	0,025

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

4.1 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 5**. As respostas citogenética, molecular maior e molecular completa foram diferentes entre os pacientes respondedores e não respondedores ($P < 0,050$).

Tabela 5 – Avaliação da resposta ao tratamento ao MI dos pacientes incluídos no estudo segundo critérios da *European Leukemianet*

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

Os valores são frequências absolutas (relativas).

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

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

4.2 Expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 em pacientes (grupo total, respondedores e não respondedores) ao diagnóstico (Pré-tratamento) e durante o tratamento com MI

Dos pacientes analisados ao diagnóstico e durante o período de tratamento, 12 alcançaram a RCC e 18 se tornaram resistentes ao tratamento com a dose padrão de MI (400mg/dia). Não houve diferença na expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 ao diagnóstico e durante o tratamento com MI (**Figura 12A e 12B**). A expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 ao diagnóstico não foi preditiva para resposta ao tratamento com MI, uma vez que a expressão ao diagnóstico de pacientes não diferiu entre respondedores e não respondedores (**Figura 12C e 12D**).

Figura 12. Comparação da expressão do RNA_m dos genes ABCB1 **(A)** e SLC22A1 **(B)** no grupo total nos períodos pré-tratamento e durante o tratamento com MI. Comparação da expressão do RNA_m dos genes ABCB1 **(C)** e SLC22A1 **(D)** no período pré-tratamento entre os respondedores e não respondedores.

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

4.3 Comparação das expressões de RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 nos grupos de respondedores e não respondedores a dose padrão de MI

A expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 foi determinada em todos os pacientes incluídos neste estudo. A **Figura 13** mostra a expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 em respondedores e não respondedores ao MI. Não houve diferença de expressão dos genes entre os grupos de resposta ao MI (**tabela 6**).

Figura 13. Expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 entre os respondedores e não respondedores a dose padrão de 400mg/dia de MI

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

Tabela 6. Expressão do RNAm de ABCB1 e SLC22A1 entre os grupos de resposta ao MI

Expressão do RNAm	Respondedor (N= 70) Mediana (P25-P75)	Não respondedor (N=48) Mediana(P25-P75)	P valor*
Gene ABCB1	15,9 (8,6– 22,7)	14,1 (9,0- 20,9)	0,478
Gene SLC22A1	5,9 (3,9-11,2)	5,8 (3,4- 9,9)	0,370

Os valores apresentados são medianas (percentil 25 e 75%).* teste Mann- Whitney.Os valores obtidos pelo método 2-ΔCt foram multiplicados por 1.000 para melhor representação.

4.3.1 Expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 em pacientes (grupo total, respondedores e não respondedores) com e sem resposta molecular maior (RMM)

A distribuição dos valores da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 no grupo total e também nos pacientes respondedores e não respondedores, segundo a RMM, está apresentada nas **figuras 14 e 15**.

A expressão do gene ABCB1 foi semelhante tanto no grupo total quanto nos grupos de resposta quando foi avaliada a RMM (**Figura 14**). Para o gene SLC22A1 foi observada maior expressão apenas no grupo respondedor com RMM (**Figura 15**).

Figura 14. Expressão do RNAm do gene ABCB1 em pacientes com resposta molecular maior (RMM).

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

Figura 15: Expressão do RNAm do gene SLC22A1 em pacientes com resposta molecular maior (RMM).

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

4.3.2 Expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 em pacientes (grupo total, respondedores e não respondedores) com e sem resposta molecular completa (RMC)

Não houve diferença significativa nas taxas de expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 em pacientes com ou sem RMC no grupo total, grupo de respondedor e não respondedor à dose padrão de MI (**Figuras 16 e 17**).

Figura 16: Expressão do RNAm do gene ABCB1 em pacientes com resposta molecular completa (RMC)

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

A resposta molecular completa é dada quando o número de transcritos *BCR-ABL1* está $\leq 0,0032\%$.

Figura 17. Expressão do RNAm do gene SLC22A1 em pacientes com resposta molecular completa (RMC)

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

A resposta molecular completa é dada quando o número de transcritos *BCR-ABL1* está $\leq 0,0032\%$.

Considerando que poderia haver diferença entre as expressões de RNAm nos genes estudados quando o grupo não respondedor fosse subdividido em resistência primária e secundária, foram realizadas as seguintes análises.

4.3.3 Expressão de RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 nos subgrupos com resistência primária e secundária quando comparadas com o grupo respondedor

O grupo não respondedor foi dividido em indivíduos com resistência primária e secundária e foram comparados com grupo de respondedores ao MI frente à expressão do gene ABCB1 e SLC22A1 (**Figura 18**). Não houve diferença na expressão de *ABCB1* e *SLC22A1* entre os grupos de resistência.

Figura 18. Expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 entre os respondedores e não respondedores com resistência primária e secundária ao MI.

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

4.4 Análise da atividade funcional da P-gp

Como explicado no item Materiais e Métodos, para os resultados apresentados a seguir, os grupos formados com indivíduos portadores dos haplótipos ABCB1 1236CC/3435CC/2677GG, 1236CT/3435CT/2677GT e 1236TT/3435TT/2677TT serão denominados grupos 1, 2 e 3, respectivamente.

4.4.1 Características dos indivíduos incluídos no estudo da atividade funcional da P-gp

Foram incluídos 28 pacientes portadores de LMC no estudo da atividade funcional da P-gp sendo 10 homens e 18 mulheres, todos na fase crônica da doença e em uso da dose padrão de 400mg/dia de MI. As características destes indivíduos estão apresentadas na **tabela 7**. Os pacientes incluídos apresentaram distribuições similares quanto à idade, número de células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas) tempo de diagnóstico, tratamento prévio ao MI e tempo de uso do MI ($p>0,050$), segundo os diferentes grupos de haplótipo.

Tabela 7 – Distribuição da idade, número de células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas), tempo de diagnóstico, tratamento prévio e tempo de uso do MI dos pacientes portadores de LMC incluídos no estudo de atividade da P-gp

	Grupo 1 N=10	Grupo 2 N= 10	Grupo 3 N=8	P valor
Idade (anos completos)*	50,2 (30,2-57,0)	53,4 (33,4-67,0)	54,0 (35,1-70,0)	0,327
Hemácias (.10 ⁶ /mm3)*	4,55 (4,21-5,12)	4,20 (3,85-5,00)	4,35 (4,1-5,0)	0,895
Leucócitos (/mm3)*	5.250 (4.300-5.800)	4.700 (3.620-6.175)	3.750 (3.300-6.523)	0,897
Plaquetas (.10 ³ /mm3)*	200 (180-237)	195 (180-248)	192 (150-220)	0,195
Tempo de diagnóstico (meses)*	62,5 (59,7-100)	66,0 (59,0-109,2)	65,0 (61,0-81,0)	0,932
Tratamento anterior ao MI**				
Interferon-α	6 (60,0)	5 (50,0)	4 (50,0)	0,879
Nenhum	4 (40,0)	5 (50,0)	4 (50,0)	
Tempo de uso MI (meses)*	59,5 (53,7-72,0)	59,5 (52-75)	63,0 (50-77)	0,901

* Os valores são medianas (mediana P25-P75) e ** frequências absolutas e relativas entre parênteses. Para comparação dos 3 grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Grupo1:1236CC/3435CC/2677GG

Grupo 2: 1236CT/3435CT/2677GT

Grupo 3: 1236TT/3435TT/2677TT

Todos os pacientes estavam em resposta hematológica e citogenética completa.

Não houve diferença entre as respostas molecular maior e completa nos 3 grupos

(P> 0,050) (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Avaliação da resposta ao tratamento ao MI dos pacientes incluídos no estudo de atividade funcional da P-gp segundo critérios da *European Leukemianet* (BACCARANI et al, 2009)

	Grupo 1 N=10	Grupo 2 N= 10	Grupo 3 N=8	P valor
Resposta Citogenética				
Completa	10 (100,0)	10 (100,0)	8 (100,0)	1,000
Resposta Hematológica				
Sim	10 (100,0)	10 (100,0)	8 (100,0)	1,000
Resposta Molecular				
Maior				
Sim	8 (80,0)	9 (90,0)	7 (87,5)	0,804
Não	2 (20,0)	1 (10,0)	1 (12,5)	
Resposta Molecular				
Completa				
Sim	2 (20,0)	1 (10,0)	2 (25,0)	0,694
Não	8 (80,0)	9 (90,0)	6 (75,0)	

Os valores são frequências absolutas (relativas). Para comparação entre os três grupos foi utilizado o teste de qui-quadrado.

Grupo1:1236CC/3435CC/2677GG

Grupo 2: 1236CT/3435CT/2677GT

Grupo 3: 1236TT/3435TT/2677TT

4.4.2 Determinação da atividade funcional da P-gp nos 3 grupos de pacientes

Para avaliar o efeito dos diferentes dos haplótipos (ABCB1 1236CC/3435CC/2677GG, 1236CT/3435CT/2677GT e 1236TT/3435TT/2677TT) na atividade funcional da P-gp, o efluxo de Rh123 foi medido por citometria de fluxo em células mononucleares dos pacientes incluídos neste estudo.

Primeiramente foram analisados os resultados com os 3 grupos separados e em virtude de não haver diferença significativa entre o grupo 2 e grupo 3 nas análises de atividade e expressão da P-gp, expressão do RNAm de SLC22A1 e ABCB1 e concentração plasmática de MI, estes 2 grupos foram agrupados

passando a serem denominados como grupo A (Grupo 1, selvagem, 1236CC/3435CC/2677GG) e grupo B (Grupo 2, heterozigoto, 1236CT/3435CT/2677GT + Grupo 3, mutado, 1236TT/3435TT/2677TT).

A mediana de efluxo de Rh123 nos grupos A e B foi de 59,1% (54,8-69,5) e 38,3% (27,4-47,9), respectivamente. Foi observada uma maior atividade mediada pela P-gp nos pacientes que apresentavam o haplótipo selvagem (grupo A) quando comparado àqueles que possuíam o haplótipo com alelo mutado (grupo B) ($P<0,001$) (**Figura 19**).

Figura 19: Efeito dos diferentes grupos de haplótipo no transporte mediado pela P-gp

O efluxo de Rh123 foi medido por citometria de fluxo. As medianas dos grupos foram comparadas pelo teste Mann-Whitney.

Grupo A: 1236CC/3435CC/2677GG

Grupo B: 1236CT/3435CT/2677GT + 1236TT/3435TT/2677TT

4.4.3 Expressão do RNAm do gene ABCB1 e expressão da P-gp nos grupos A e B

A distribuição dos valores da expressão do RNAm do gene ABCB1 e expressão da P-gp nos grupos A e B, está apresentada nas **figuras 20A e 20B**.

Não foi observada influência dos diferentes haplótipos na expressão do RNAm do gene ABCB1 e expressão da P-gp.

Figura 20: (A) Expressão do RNAm do gene ABCB1 entre os grupos A e B. (B) Expressão da P-gp entre os grupos A e B.

Expressão do RNAm do gene ABCB1 foi medida por qPCR e normalizada com o gene de referência *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Expressão da P-gp foi medida por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como a razão entre a intensidade média de fluorescência (RIMF) das células tratadas com anticorpo anti-P-gp dividido pela intensidade média de fluorescência (IMF) das células tratadas apenas com o anticorpo secundário (controle negativo).

Valores de p calculados com o teste Mann-Whitney.

Grupo A: 1236CC/3435CC/2677GG

Grupo B: 1236CT/3435CT/2677GT + 1236TT/3435TT/2677TT

4.4.4 Expressão do RNAm do gene SLC22A1 nos grupos A e B

A fim de avaliar o possível impacto conjunto com ABCB1, a expressão dos gene SLC22A1 foi determinada em todos os pacientes incluídos no estudo da atividade da P-gp. Não houve diferença de expressão do gene SLC22A1 entre os grupos A e B (**Figura 21**).

Figura 21: Expressão do RNAm do gene SLC22A1 entre os grupos A e B. Expressão do RNAm do gene SLC22A1 foi medida por qPCR e normalizada com o gene de referência *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Valores de p calculados com o teste Mann-Whitney. Grupo A: 1236CC/3435CC/2677GG Grupo B: 1236CT/3435CT/2677GT + 1236TT/3435TT/2677TT

4.4.5 Concentração plasmática do MI nos grupos A e B

Não foi possível realizar a dosagem da concentração plasmática de MI e 1 paciente do Grupo A pois a quantidade de plasma era insuficiente. A **Figura 22** mostra a concentração plasmática de MI entre os grupos de haplótipo. Não houve diferença na concentração plasmática de MI entre os grupos A e B.

Figura 22: Concentração plasmática de MI entre os grupos A e B.

A concentração plasmática de MI está representada em µg/mL e foi dosada por eletroforese capilar.

Valores de p calculados com o teste Mann-Whitney. Grupo A: 1236CC/3435CC/2677GG Grupo B: 1236CT/3435CT/2677GT +1236TT/3435TT/2677TT

4.4.6 Correlação entre o número de transcritos BCR-ABL1, atividade e expressão da P-gp, expressão do RNAm de ABCB1 e SLC22A1 e concentração plasmática de MI

A **tabela 9** mostra os coeficientes de correlação de Spearman entre as variáveis: número de transcritos BCR-ABL1, atividade e expressão da P-gp, expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 e concentração plasmática de MI no grupo total de pacientes incluídos no estudo de atividade da P-gp.

Houve correlação direta e forte entre a expressão do RNAm do gene ABCB1 e a expressão da P-gp ($r=0,747$; $P=0,001$) (**Figura 23A**). A atividade da P-gp apresentou correlação direta e moderada com o número de transcritos BCR-ABL1 ($r=0,570$; $P=0,001$) (**Figura 23B**). Com relação à expressão de *SLC22A1*, foi observada correlação inversa e moderada com o número de transcritos BCR-ABL1 ($r=-0,407$; $P=0,032$) (**Figura 23C**). As demais variáveis apresentaram baixa correlação entre si.

Tabela 9: Coeficientes de correlação de Spearman entre as variáveis: número de transcritos BCR-ABL1, atividade e expressão da P-gp, expressão do RNAm de ABCB1 e SLC22A1 e concentração plasmática de MI.

	NºTranscritos BCR-ABL1	Atividade P-gp	Expressão Gênica ABCB1	Expressão P-gp	Expressão Gênica SLC22A1
Atividade P-gp	r=0,57 P= 0,001				
Expressão Gênica ABCB1	r=0,05 P= 0,782	r=0,01 P= 0,960			
Expressão P-gp	r=0,13 P= 0,497	r=-0,05 P= 0,790	r=0,74 P= 0,001		
Expressão Gênica SLC22A1	r=-0,40 P= 0,032	r=0,011 P= 0,978	r= 0,11 P= 0,956	r= -0,19 P= 0,923	
Concentração MI	r=-0,66 P=0,743	r=-0,22 P=0,273	r=-0,24 P=0,231	r=-0,18 P=0,381	r=0,23 P=0,246

r: coeficiente de correlação de Spearman. P = P valor.

Figura 23: (A) correlação de Spearman entre a expressão do RNAm do gene ABCB1 e a expressão da P-gp, (B) correlação de Spearman entre a atividade da P-gp e o número de transcritos BCR-ABL1, (C) correlação de Spearman entre a expressão do gene BCR-ABL1 e a expressão do gene SLC22A1. A atividade da P-gp é representada pela % de efluxo de Rh123 medida por citometria de fluxo. Expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 foram medidas por qPCR e normalizada com o gene de referência *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Expressão da P-gp medida por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como a razão entre a intensidade média de fluorescência (IMF) das células tratadas com anticorpo anti-P-gp dividido pela IMF das células tratadas apenas com o anticorpo secundário (controle negativo).

4.4.7 Efeito da atividade funcional e expressão da P-gp, expressão do RNAm do gene ABCB1 e SLC22A1 e concentração plasmática de MI em grupos de pacientes formados segundos as respostas molecular maior (RMM) e completa (RMC)

Na **tabela 10** estão apresentadas as medianas das variáveis: número de transcritos BCR-ABL1, atividade e expressão da P-gp, expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 e concentração plasmática de MI entre os pacientes com e sem RMM e RMC.

Os pacientes que não alcançaram a RMM apresentaram uma maior taxa de efluxo mediado pela P-gp quando comparado aos indivíduos que alcançaram esta resposta (64,7% vs. 45,7%; $P=0,001$). Todos os pacientes que não alcançaram RMM apresentaram efluxo acima de 60%. Não foi encontrada associação entre a atividade da P-gp e a RMC.

Os indivíduos que alcançaram RMM e RMC apresentaram maior mediana de expressão do gene SLC22A1 quando comparado a mediana de expressão dos indivíduos que não alcançaram estas respostas ($P<0,05$). Não houve associação entre as demais variáveis e a RMM e RMC.

Os pacientes sem RMM apresentaram menor concentração plasmática de MI quando comparado aos que alcançaram esta resposta (0,51 $\mu\text{g/mL}$ vs. 1,42 $\mu\text{g/mL}$; $P=0,001$). Não foi observada associação entre a concentração plasmática de MI e a RMC.

Tabela 10. Associação entre número de transcritos BCR-ABL1, atividade e expressão da P-gp, expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 e concentração plasmática de MI em indivíduos com ou sem RMM e RMC.

	RMM		P valor*	RMC		P valor*
	Sim N=24	Não N=4		Sim N=5	Não N=23	
Atividade P-gp	45,7 (32,7-57,2)	64,7 (47,5-73,2)	0,001	45,1 (29,1-59,3)	46,0 (31,3-62,8)	0,890
Expressão Gênica ABCB1	5,31 (3,31-9,47)	8,41 (4,41-9,27)	0,205	8,33 (3,20-10,10)	6,41 (2,11-9,12)	0,447
Expressão P-gp	6,0 (3,0-7,6)	6,4 (2,3-8,1)	0,989	6,6 (3,00-8,6)	5,7 (2,30-9,0)	0,413
Expressão Gênica SLC22A1	0,95 (0,68-1,59)	0,54 (0,43-0,82)	0,042	1,80 (1,40-0,29)	0,81 (0,40-1,10)	0,001
Concentração MI	1,42 (1,11-2,12)	0,51 (0,27-1,89)	0,001	1,56 (1,25-1,73)	1,28 (0,85-2,30)	0,753

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

A atividade da P-gp é representada pela % de efluxo de Rh123 medida por citometria de fluxo.

Expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 foram medidas por qPCR e normalizada com o gene de referência *GAPDH*. Valores de expressão foram calculados com a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Os valores obtidos pelo método $2^{-\Delta Ct}$ foram multiplicados por 1.000 para melhor representação. A expressão da P-gp medida por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como a razão entre a intensidade média de fluorescência (IMF) das células tratadas com anticorpo anti-P-gp dividido pela IMF das células tratadas apenas com o anticorpo secundário (controle negativo). A concentração plasmática de MI está representada em µg/mL e foi dosada por eletroforese capilar.

RMM= número de transcritos BCR-ABL1 ≤ 0,1 e RMC= número de transcritos BCR-ABL1 ≤ 0,0032.

5.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 as principais causas de resistência ao tratamento com MI, pois interferem na ligação do fármaco 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 MI é transportado pelas proteínas de membrana P-gp e hOCT1, produtos da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1, respectivamente (BURGUER et al., 2004; MAHON et al., 2003, THOMAS et al., 2004, NAKANISHI et al. 2006, HU et al. 2008). Alterações na expressão destes genes poderiam levar a uma concentração intracelular de MI diferente da ideal, prejudicando a resposta ao tratamento.

Considerando que 20% dos portadores de LMC não respondem à dose padrão do MI, alterações na farmacocinética poderiam ser a causa dessa resistência. Diante do exposto, propomos o presente estudo com os objetivos de verificar a relação da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 entre indivíduos respondedores e não respondedores à dose padrão de MI (400mg/dia) e comparar a expressão destes genes entre indivíduos que obtiveram a resposta molecular maior e resposta molecular completa na vigência do tratamento com MI.

Os resultados do presente estudo mostraram 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 aqueles não respondedores, mostra 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.

5.1 Expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1

Nos últimos anos, diferentes métodos (PCR em tempo real e microarranjo de DNA) têm sido utilizados para determinar quais genes de transportadores da família ABC e SLC estão envolvidos na resistência a múltiplas drogas (ANNEREAU et al., 2004; SZAKACS et al., 2004; WHITE et al., 2006, WHITE et al., 2007). Estes estudos tiveram como objetivos avaliar a relação entre a expressão de diversas proteínas ABC e SLC, entre elas ABCG2, ABCB1 e SLC22A1, e a diminuição da sensibilidade das células a agentes citostáticos.

A resistência ao MI mediada por fatores farmacocinéticos tem sido sugerida por duas observações. A primeira se deve a possibilidade da resistência ser revertida com o aumento de dose (SOHN et al., 2007). A segunda, os efeitos adversos tendem a diminuir ao longo do tempo de tratamento sugerindo que ou o tecido normal se adapta a presença do fármaco ou a exposição sistêmica diminui com o tempo devido ao aumento da regulação de mecanismos de eliminação celular (VERWEIJ et al., 2003)

Poucos estudos foram propostos a fim de investigar a relação entre a expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 e a resposta à terapia com MI. Crossman e colaboradores (2005) observaram que a expressão basal de *SLC22A1* era variável nos indivíduos portadores da LMC recém-diagnosticados, porém essa expressão era diferente da expressão de doadores de medula óssea saudáveis. Entretanto, a expressão de *SLC22A1* em pacientes não respondedores era menor quando comparada aos respondedores no período de pré-tratamento com MI. Após o início do tratamento, seis indivíduos não respondedores tiveram queda de 2 vezes nos níveis de expressão de *SLC22A1* comparado ao período basal pré MI. Neste estudo também foi observada alta expressão de RNAm de SLC22A1 em pacientes

que alcançaram RCC aos 12 meses de terapia quando comparados aos que não alcançaram a RCC. Estes dados foram confirmados em outro estudo, o qual demonstrou que pacientes com alta expressão de *SLC22A1* apresentavam maior taxa de RCC e maior tempo livre de progressão da doença (WANG et al. 2008). Diferentemente, no presente estudo, não foi encontrada associação entre a expressão do RNAm de *SLC22A1* e a resposta citogenética. É importante enfatizar que no presente estudo os pacientes foram classificados como respondedores ou não ao MI de acordo com a resposta citogenética aos 18 meses. Além disso, não foi observada diferença na expressão do gene *SLC22A1* no período pré-tratamento e durante o tratamento com MI.

White e colaboradores (2006) demonstraram que a variabilidade no IC_{50}^{MI} está relacionada à variação na entrada e retenção celular do MI. Naquele estudo, a atividade da bomba de influxo hOCT1, que é codificada pelo gene *SLC22A1*, foi definida pela diferença da captação e retenção do MI com e sem o inibidor Prazosin (potente inibidor de hOCT1). Em estudo clínico subsequente realizado pelo mesmo grupo, foi demonstrado que a baixa atividade de hOCT1 é um dos fatores determinantes para a falha de resposta ao MI. Aquele estudo mostrou que entre os pacientes que apresentavam alta atividade dessa bomba, 85% atingiram RMM aos 24 meses de MI, enquanto nos pacientes com baixa atividade, essa resposta foi de 45% (WHITE et al., 2007). No presente estudo, foi encontrado que indivíduos respondedores que alcançaram a RMM, apresentaram maior expressão de *SLC22A1* quando comparado aos respondedores sem RMM. Nossos dados referentes a RMM estão de acordo com os observados por Marin e colaboradores (2010), que investigaram o número de transcritos de *SLC22A1* em leucócitos totais de indivíduos com LMC e observaram que pacientes com alta expressão deste gene

apresentavam maior taxa de RMM e RMC após 6 anos de terapia com MI. Em contraste, no presente estudo não foi observada associação entre a RMC e a expressão de *SLC22A1*.

Outros estudos não encontraram associação entre a expressão de *SLC22A1* e uma melhor resposta ao MI. Hu e colaboradores (2008) postularam que o influxo e retenção intracelular do MI se dá não só por um, mas por uma série de transportadores e que o MI era um substrato fraco de hOCT1. De fato, foi demonstrado que a expressão de *SLC22A1* ao diagnóstico não está associada a RCC após 12 meses de terapia com MI em pacientes chineses (ZHANG et al. 2009). Outro estudo demonstrou que os níveis de transcritos de *SLC22A1* ao diagnóstico não eram preditivos para RMM, RMC, desenvolvimento de mutação no gene BCR-ABL1 e no tempo livre de progressão de doença (HUGHES et al., 2008).

Os fatores que controlam a expressão de *SLC22A1* ainda não são completamente esclarecidos. A modulação da expressão pode ser mediada pela proteína quinase A e a calmodulina, além de polimorfismos no gene podem afetar a função de transporte dessa bomba (CIARIMBOLI et al., 2008).

Diante dos dados apresentados, não há consenso sobre o valor prognóstico dos níveis de transcritos de *SLC22A1* e a resposta ao MI. A variação de resultados pode ter sido influenciada pelo uso de RNAm de células mononucleares em alguns estudos e RNAm de leucócitos totais em outros estudos (WHITE et al., 2011). Racil e colaboradores (2010) demonstraram que a expressão de *SLC22A1* é significativamente maior em células polimorfonucleares quando comparada com mononucleares e que os níveis de expressão em leucócitos totais também foram influenciados pela porcentagem de células polimorfonucleares. Além disso, os níveis

de transcritos de *SLC22A1* eram menores em pacientes recém-diagnosticados comparados a indivíduos saudáveis. Esta diferença desapareceu após início da terapia com MI, sugerindo que a carga tumoral poderia influenciar na expressão. Outro estudo confirmou estes dados indicando que além da maior expressão de *SLC22A1* em células polimorfonucleares, o aumento dos níveis de transcritos após o início da terapia com MI estaria relacionado, segundo estes autores, à obtenção da RCC (BAZEOS et al., 2010). No entanto, os níveis de BCR-ABL1 não afetam a expressão e atividade de hOCT1. Células primitivas CD34⁺ de pacientes portadores de LMC possuem níveis de expressão e atividade de hOCT1 diminuídos comparado à células CD34⁺ maduras indicando o papel da maturação celular na regulação de *SLC22A1*(ENGLER et al., 2011).

No presente estudo não foi possível avaliar as variações da expressão de *SLC22A1* durante o tratamento, uma vez que os indivíduos incluídos no estudo já faziam uso de MI há algum tempo. Todos pacientes estavam em resposta hematológica e possuíam contagem normal de leucócitos. A amostra utilizada para análise da expressão gênica foi obtida a partir de células de leucócitos totais e os resultados são semelhantes ao de outro estudo que utilizou o mesmo tipo celular (MARIN et al., 2010).

Alguns estudos *in vitro* mostraram que alterações na expressão do gene *ABCB1* poderiam estar relacionadas com a resistência ao tratamento com MI. Dohse e colaboradores (2010) demonstraram em células K562 que superexpressam *ABCB1*, exibiram resistência ao tratamento com MI em dose clinicamente viável, sugerindo que a função destes transportadores de membrana está associada à resistência ao MI (DOHSE et al., 2010). Outro estudo observou que a

superexpressão de *ABCB1* pode ter grande importância na concentração intracelular desta droga. Neste estudo, foi demonstrado que em linhagens celulares com alta expressão de *ABCB1* (MCF7/MR, MCF7/AdVp3000, HEK293/Neo, HEK293/R, HEK293/G HEK293/T), os níveis do MI marcado com C^{14} diminuía significativamente (BURGUER et al. 2004). Em estudo deste mesmo grupo a exposição em longo prazo de MI em células Caco-2 induziu o aumento da expressão do RNAm do gene *ABCB1* e da P-gp. Consequentemente, estas células apresentaram concentração intracelular de MI diminuída (BURGUER et al., 2005). Porém, não se observou alteração dos níveis basais de RNAm nos genes *ABCC1*, *ABCC2* e *CYP3A4*. O MI não é um ativador do receptor PXR (*nuclear receptor Pregnane X*), conhecido regulador de *ABCB1*. Assim, o mecanismo o qual ocorreu a indução destes transportadores não foi elucidado neste estudo.

Estudo com outro tipo celular (K562), transfectadas e que superexpressam *ABCG2* e *ABCB1*, exibiram resistência ao tratamento com MI em dose clinicamente viável, sugerindo que a função destes transportadores de membrana está associada à resistência ao MI (DOHSE et al., 2010). Outro estudo *in vivo* mostrou em pacientes com LMC em fase acelerada tratados com MI, que após 6 meses de terapia, apresentaram aumento da expressão de várias proteínas como: *ABCB1*, *MRP1*, *ABCG2* e *LRP* em células de sangue periférico (STAVROVSKAYA et al., 2008).

Um estudo brasileiro com pacientes na fase de pré-tratamento com MI mostrou que, na fase crônica da LMC, a resistência ao fármaco e a resposta citogenética não foram associadas à expressão dos genes *ABCB1* e *ABCG2* em leucócitos totais (NARDINELLI, 2008). De fato, outro estudo avaliou a expressão dos genes *SLC22A1*, *ABCB1*, *ABCC1* e *ABCG2* em pacientes portadores de LMC na

fase de pré-tratamento, 1, 3 e 6 meses após início do tratamento com MI e não encontrou correlação entre a expressão destes transportadores e a resposta ao MI nas fases de pré e pós-tratamento (WANG et al., 2008). Os dados apresentados mostram uma significativa controvérsia em relação ao potencial de transportadores ABC em conferir resistência ao tratamento com MI. A amostra utilizada no presente estudo incluiu pacientes previamente tratados, porém não foi encontrada associação entre a expressão do gene ABCB1 e a resposta ao MI.

5.2 Análise da atividade funcional da P-gp

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 c.1236C>T, c.3435C>T e c.2677G>T/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). Foi descrito anteriormente que os 3 polimorfismos estão em forte desequilíbrio de ligação. Considerando os vários haplótipos para os polimorfismos ABCB1 c.1236C>T, c.3435C>T e c.2677G>T/A, foi descrito que 60% apresentavam um desses 3 haplótipos: 1236CC/3435CC/2677GG, 1236CT/3435CT/2677GT e 1236TT/3435TT/2677TT (DEENEN et al., 2011).

Em estudo do nosso grupo observou-se que o haplótipo 1236CT/3435CT/2677GT no gene ABCB1 foi associado à resposta molecular maior em pacientes respondedores à dose padrão de MI. Os pacientes portadores deste haplótipo apresentaram 11,8 vezes maior chance de alcançar a RMM quando comparado àqueles respondedores ao MI e portadores de outros haplótipos

(VIVONA et al., 2012). Considerando que os haplótipos formados pelos polimorfismos c.1236C>T, c.3435C>T e c.2677G>T/A no gene ABCB1 poderiam estar relacionados à variabilidade de resposta ao MI devido a alterações na funcionalidade desta bomba, realizamos o presente estudo no qual foi avaliada a atividade funcional da P-gp a fim de avaliar a influência dos haplótipos 1236CC/3435CC/2677GG, 1236CT/3435CT/2677GT e 1236TT/3435TT/2677TT na capacidade de efluxo mediada pela P-gp e o possível impacto na concentração plasmática do MI e nas respostas molecular maior e completa em pacientes portadores de LMC tratados com a dose padrão de 400 mg/dia de MI. Este foi o primeiro estudo na literatura que avaliou a influência dos haplótipos 1236CC/3435CC/2677GG, 1236CT/3435CT/2677GT e 1236TT/3435TT/2677TT na atividade funcional da P-gp em pacientes tratados com MI.

Dulucq e colaboradores (2008) observaram que, pacientes com LMC tratados com a dose padrão de MI (400mg/dia), portadores do haplótipo 1236C/3435C/2677G alcançavam a RMM menos frequentemente do que pacientes com outros haplótipos (44,6% vs 70%). Neste mesmo estudo, o haplótipo 1236T/3435T/2677T foi associado a RMM e a concentrações séricas de MI superiores a 1000 ng/mL.

No presente estudo, observou-se que pacientes que não alcançaram a RMM apresentavam uma maior taxa de efluxo mediado pela P-gp e este efluxo aumentado da P-gp (medido pelo efluxo de Rh123) foi associado aos pacientes portadores do haplótipo selvagem (1236CC/3435CC/2677GG) quando comparado a pacientes portadores de haplótipos 1236CT/3435CT/2677GT + 1236TT/3435TT/2677TT. O haplótipo 1236CC/3435CC/2677GG foi associado à falha a tratamento com antiepiléticos (HUNG et al., 2005). Outro estudo que incluiu 66 pacientes com

diversos tipos de câncer, incluindo a LMC, demonstrou que a taxa de eliminação do substrato da P-gp sestamibi [^{99m}Tc] era maior em indivíduos que apresentavam o haplótipo 3435CC/2677GG, sugerindo uma maior atividade da P-gp nos portadores destes genótipos (WONG et al. 2005). Alguns estudos mostraram que indivíduos portadores do haplótipo 1236TT/3435TT/2677TT apresentavam maior concentração plasmática dos fármacos digoxina, sinvastatina, atorvastatina e das antraciclinas quando comparado com indivíduos portadores dos demais haplótipos (AARNOUDSE et al., 2008; KESKITALO et al., 2008; XU et al., 2008 ; WU et al., 2012). Maior concentração sérica de digoxina foi encontrada em portadores do haplótipo 1236TT/3435TT/2677TT em 195 pacientes portadores de insuficiência cardíaca congestiva (AARNOUDSE et al., 2008). O mesmo efeito do haplótipo foi observado em pacientes chineses em uso de digoxina (XU et al., 2008). Keskitalo e colaboradores (2008) mostraram que indivíduos portadores do haplótipo 1236T/3435T/2677T apresentavam maior concentração de sinvastatina e atorvastatina, além da atorvastatina ter apresentado uma meia vida 24% maior. Recentemente, o haplótipo 1236T/3435T/2677T foi associado a melhor resposta terapêutica com antraciclinas em pacientes com câncer de mama (WU et al., 2012).

Em contraste, Kim e colaboradores (2001) demonstraram que portadores do haplótipo 1236CC/3435CC/2677GG apresentavam concentração de fexofenadina 40% maior quando comparada aos indivíduos portadores dos haplótipos heterozigoto e mutado. Outros estudos não encontraram relação entre os haplótipos dos polimorfismos c.1236C>T, c.3435C>t e G26778G>T/A e a farmacocinética dos fármacos aliskiren, metadona, nortriptilina, docetaxel e paclitaxel (CRETOLLI et al., 2012; JENSEN et al., 2011; MARSCH et al., 2007; TAPANINEN et al., 2010)

Estes resultados discrepantes sugerem que a influência do transportador ABCB1 pode ser específica para cada substrato. Até o momento não foram elucidados os mecanismos que envolvem a estrutura do fármaco e a relação com ABCB1. Além disso, a maioria destes estudos concluíram seus resultados a partir de associações entre o fenótipo observado e os genótipos dos polimorfismos c.1236C>T, C. 3435C>T e G2677T/A, sem realizar nenhum teste de atividade da P-gp para confirmar se estes polimorfismos estavam relacionados à alteração na taxa de efluxo dessa bomba e que apenas este transportador está envolvido na resposta ou variação de concentração do fármaco.

Os resultados apresentados no presente estudo corroboram com os dados apresentados por Dulucq e colaboradores (2008) e Vivona e colaboradores (2012) que encontraram associação entre a presença de pelo menos 1 alelo mutado nestes 3 polimorfismos e a RMM. O menor efluxo mediado pela P-gp em portadores dos haplótipos heterozigoto e mutado (1236CT/3435CT/2677GT + 1236TT/3435TT/2677TT) e respondedores à dose padrão de MI com RMM, sugere que a diminuição da atividade da P-gp estaria associada à maior concentração intracelular de MI, o que teria como consequência a resposta molecular maior. No presente estudo não foi possível realizar a dosagem intracelular do MI.

Os níveis plasmáticos de MI podem afetar a resposta a este fármaco. Tem sido preconizado que concentrações de 1,0 µg/mL de MI como ideal para obtenção das respostas moleculares (MARIN et al., 2010; PICARD et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2010). De fato, no presente estudo os pacientes que alcançaram a RMM apresentavam concentrações plasmáticas de MI maiores quando comparados aos não alcançaram a RMM (1,42 µg/mL vs 0,51 µg/mL), entretanto não foi observada

associação entre os níveis plasmáticos de MI e a RCC. Todos os pacientes incluídos no estudo de atividade da P-gp mesmo apresentando concentrações inferiores a 1,0 µg/mL alcançaram a RCC. Estes resultados são semelhantes a outros 2 estudos que não encontraram relação entre a concentração plasmática do MI e a RCC (MARIN et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2010)

Resultados discrepantes quanto a associação dos polimorfismos c.1236C>T, c.3435C>T e c.2677G>T/A e a eliminação do MI medidas pelo *clearance* renal foram observadas em alguns estudos (YAMAKAWA et al., 2011, GURNEY et al., 2007, TAKAHASHI et al., 2010). Estudo realizado em 34 portadores de LMC e que avaliou apenas a ação do polimorfismo ABCB1 c.3435C>T na farmacocinética do MI mostrou que os indivíduos portadores do genótipo 3435CC apresentavam *clearance* renal de MI 61% superior do que os indivíduos com genótipos 3435CT e 3435TT (YAMAKAWA et al., 2011). Em contraste, outro estudo com 22 pacientes com LMC demonstrou que portadores do haplótipo 1236TT/3435TT/2677TT apresentavam maior *clearance* renal de MI comparado a portadores de outros haplótipos (GURNEY et al., 2007). Entretanto, neste estudo apenas 4 pacientes apresentavam o haplótipo 1236TT/3435TT/2677TT. No presente estudo não foi encontrada associação entre os haplótipos 1236CC/3435CC/2677GG, 1236CT/3435CT/2677GT e 1236TT/3435TT/2677TT e a concentração plasmática do MI. Estes resultados estão de acordo com outro estudo que não encontrou associação entre os polimorfismos c.1236C>T, c.3435C>A e c.2677G>T/A e a concentração plasmática de MI (TAKAHASHI et al., 2010) A análise destes dados sugerem a necessidade de novos estudos com número maior de indivíduos para caracterizar as relações entre os polimorfismos c.1236C>T, c.3435C>A e c.2677G>T/A e a farmacocinética do MI.

Os dados presentes na literatura ainda são limitados sobre como os polimorfismos c.1236C>T, c.3435C>A e c.2677G>T/A alteram a interação entre o transportador ABCB1 e seus substratos. Algumas investigações tem demonstrado que cada substrato pode interagir em sítios de ligação diferentes da P-gp (DEY et al., 1997; RAUTIO et al., 2006), mas é difícil determinar *a priori* quais domínios são importantes para cada classe de fármaco. Fung e colaboradores (2009) utilizando o anticorpo monoclonal UIC2 dirigido contra o epítipo extracelular da P-gp, demonstraram *in vitro* que a conformação do haplótipo selvagem dos polimorfismos c.1236C>T; c.3435C>T e G2677T/A é diferente do haplótipo mutado. Esta mudança dependente da presença do polimorfismo c.3435C>T no haplótipo. Este estudo sugere que mutações sinônimas no haplótipo ABCB1 produzem uma mudança sutil no sítio de ligação de substratos.

Mudanças na função da P-gp causada por polimorfismos sinônimos não pode ser explicada pela sequencia de aminoácidos da proteína. No entanto, observações *in vitro* e *in vivo* sugerem que o polimorfismo c.3435C>T afeta o dobramento da proteína e sua função (HOFFMEYER et al., 2000, KIMCHI-SARFATY et al., 2007). Tsai e colaboradores (2008) sugeriram que polimorfismos sinônimos como o c.3435C>T podem causar uma pausa na leitura dos códons nos ribossomos. À medida que o ribossomo requer RNAt para se mover ao longo do RNAm, o alongamento da proteína e a tradução podem ser afetados. No RNAm, uma mudança de nucleotídeo que modifica o códon pode alterar o tempo necessário para que o aminoacil-RNAt se encaixe no sítio A dos ribossomos. Alternativamente, mutações podem alterar as estruturas secundárias do RNAm e eliminar novas estruturas secundárias como os *hairpins* (KIMCHI-SARFATY et al., 2007). Qualquer destas modificações pode causar a pausa na leitura dos ribossomos e afetar a

tradução da proteína. Se a mutação c.3435C>T presente em haplótipo com os polimorfismos c.1236C>T e c. G2677G>T/A altera a velocidade do complexo ribossômico durante a tradução, podem existir algumas consequências. Em primeiro lugar, o ribossomo pausa e o RNAt se dissocia do complexo ribossômico, seguido de recrutamento da mesma aminoacil-tRNA novamente a partir do *pool* de RNAt e a tradução contínua. Em segundo lugar, o complexo ribossômico pode diminuir a velocidade ou parar rapidamente, e depois retomar a tradução. O atraso significativo na tradução pode interromper o tempo de interação entre a proteína e as chaperonas, que são proteínas que usam energia da hidrólise de ATP para desenovelar proteínas, possibilitando novo enovelamento, dessa vez na forma correta ou no lugar correto, e assim produzir uma proteína com uma ligeira alteração na conformação (FUNG et al., 2009).

A redução da atividade associada aos haplótipos heterozigoto e mutado encontrada neste estudo, pode ser explicada por uma possível mudança conformacional no transportador, não por alterações na expressão gênica ou proteica. Esta modificação leva a diminuição do efluxo do MI alterando a concentração do fármaco dentro da célula. Nossos dados sugerem que as alterações na concentração intracelular podem ser determinantes para a RMM e RMC apesar de todos os pacientes incluídos terem apresentado resposta hematológica e citogenética completa. O alcance da RMM ou RMC parece ser um processo mais complexo e dependente de maiores concentrações intracelulares de MI e a farmacocinética alterada associada à baixa expressão de *SLC22A1* ou o aumento de efluxo relacionado com a presença do haplótipo ABCB1 1236CC/3435CC/2677GG pode impactar substancialmente nas respostas moleculares ao tratamento com MI.

Com base no nível de expressão de RNAm do gene ABCB1 não há estudos realizados com grupos de haplótipos o que dificulta a comparação com nossos resultados. Quando considerado apenas o polimorfismo c.3435C>T, um estudo encontrou associação para os valores mais baixos de expressão de RNAm do gene ABCB1 em células NK CD56+ de indivíduos portadores do genótipo 3435TT quando comparado aos indivíduos portadores dos genótipos 3435CC e 3435CT. Estes resultados confirmaram que os indivíduos portadores do genótipo 3435TT apresentavam uma concentração de RNAm de ABCB1 42% menor quando comparados aos portadores do genótipo 3435CC (HITZL et al., 2001). Outro estudou quantificou o RNAm do gene ABCB1 em enterócitos duodenais de 13 indivíduos japoneses saudáveis e foi demonstrado que os portadores do genótipo 3435TT apresentavam maior média de expressão do gene ABCB1 que os indivíduos portadores do genótipos CT ou CC (NAKAMURA et al., 2002). Em contraste, estudo realizado em pacientes HIV positivos, o genótipo 3435TT foi associado a uma menor expressão do RNAm do gene ABCB1 em células mononucleares do sangue periférico e à baixa concentração dos fármacos antivirais (nelfinavir e efavirenz) (FELLAY et al., 2002). Outros estudos não encontraram associação entre o polimorfismo c.3435C> T e a expressão diferencial do RNAm no gene ABCB1 (ALBERMANN et al., 2005, GOTO et al., 2002, SIEGMUND et al., 2002)

Atualmente não está claro se a expressão diferencial do RNAm do gene ABCB1 associada com a variante c.3435C>T é devido ao polimorfismo encontrado em um haplótipo crítico ou a algum mecanismo controlado pela variante diretamente. Wang e colaboradores (2005) demonstraram 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 genotípicas dos três principais polimorfismos, c.1236C>T, c.2677G>T/A e c.3435C>T, observando que apenas 3435T está envolvido neste processo. 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). Além disso, a expressão do gene ABCB1 também é regulada por receptores nucleares, em especial o receptor de pregnana X (PXR), que ainda pode mascarar a ação dos polimorfismos (OWEN et al., 2004). No geral, os resultados aparentemente contraditórios podem indicar que a variação genética c.3435C>T não é o modulador de causalidade das diferenças observadas. Portanto, é muito provável que as diferenças funcionais surgem de polimorfismos em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo c. 3435C>T, incluindo o polimorfismo c. 2677G>T/A e c.1236C>T, sugerindo que efeitos funcionais de variantes genéticas do gene ABCB1 devem ser considerados como haplótipos independentes ao invés da análise de polimorfismos isolados e que estes polimorfismos não alteram a expressão do gene ABCB1 (FRANKE et al., 2010).

Na amostra analisada que incluiu apenas pacientes em fase crônica da LMC, não foram observadas diferenças na expressão da P-gp entre os pacientes com e sem RMM e RMC. Estudo realizado *in vitro* em células HeLa transfectadas com os haplótipos selvagem e mutado dos polimorfismos c.1236C>T, c.3435C>A e c.2677G>T/A no gene ABCB1 verificou que não havia diferença na expressão da proteína entre estes haplótipos (KIMCHI-SARFATY et al., 2007). Não há estudos clínicos que avaliaram o impacto destes haplótipos na expressão da P-gp, no entanto foi detectado uma alta expressão da P-gp em 90% dos indivíduos na fase acelerada e crise blástica da LMC (VASCONCELOS et al., 2011). Além disso, não

houve correlação entre a atividade da P-gp (medida pelo efluxo de Rh123) e a expressão da P-gp, da mesma forma como foi observada no presente estudo. Outros 2 estudos confirmaram a alta expressão da P-gp em pacientes em crise blástica da LMC (GILES et al., 1999, LIST et al., 2002). Estes dados sugerem que o aumento da expressão da P-gp está relacionado a fases avançadas da LMC, não a fase crônica da doença e que a expressão diferencial da P-gp poderia influenciar a resposta ao MI apenas nesta população, uma vez que a grande maioria dos pacientes em crise blástica da LMC não responde ao tratamento com MI. Como dado inédito na literatura, mostramos em nosso estudo que os haplótipos 1236CC/3435CC/2677GG, 1236CT/3435CT/2677GT e 1236TT/3435TT/2677TT não estão associados à expressão diferencial da P-gp em pacientes em fase crônica tratados com a dose padrão de 400mg/dia de MI.

Em síntese, este estudo demonstrou que os haplótipos ABCB1 1236CT/3435CT/2677GT e 1236TT/3435TT/2677TT estão associados ao menor efluxo do MI mediado pela P-gp e a maior frequência de RMM em pacientes portadores de LMC na fase crônica tratados com a dose padrão de 400mg/dia de MI. Além disso, foi observado maior expressão do RNAm de SLC22A1 em pacientes com RMM quando comparados aqueles sem resposta molecular. Entretanto, outros fatores farmacocinéticos e genéticos como outros polimorfismos nos genes ABCB1 e SLC22A1, a expressão de enzimas metabolizadoras como a CYP3A4 e CYP3A5 e outros transportadores plasmáticos como SLCO1A2 e ABCA3 poderiam estar interagindo e explicando a variabilidade de resposta ao MI. O conhecimento destes fatores farmacogenéticos será importante para a decisão de qual inibidor de tirosinoquinase o paciente portador de LMC deverá utilizar em especial os relacionados ao SLC22A1, uma vez que os inibidores de tirosinoquinase de segunda

geração como o Dasatinibe e Nilotinibe não interagem com este transportador (WHITE et al., 2006, GIANNOUDIS et al., 2008). Estudos prospectivos envolvendo um número maior de pacientes e diversos marcadores farmacogenéticos são necessários para elucidar definitivamente a influência destes na farmacocinética do MI.

6. CONCLUSÃO

A expressão do RNAm dos genes ABCB1 e SLC22A1 é similar entre respondedores e não respondedores a dose padrão de 400mg/dia de MI.

Não houve associação entre a expressão do RNAm do gene ABCB1 e a RMM e RMC em pacientes respondedores e não respondedores a dose padrão de 400mg/dia de MI.

O pacientes respondedores a dose padrão de 400mg/dia de MI e que alcançaram a RMM apresentavam maior expressão do RNAm de SLC22A1.

A expressão do RNAm do gene ABCB1 e da P-gp são similares nos grupos de haplótipos para os polimorfismos c.1236C>T, c.3435C>T e c.2677G>T no gene ABCB1, no entanto, os pacientes portadores dos haplótipos 1236CT/3435CT/2677GT e 1236TT/3435TT/2677TT exibem menor efluxo mediado pela P-gp apresentando maior frequência de RMM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarnoudse J.A, Dieleman J., Visser F.L. et al. Common ATP-binding cassette B1 variants are associated with increased digoxin serum concentration. **Pharmacogenetics & Genomics**, 18(4):299-305,2008
- Agrawal, M., Garg R., Cortes, J., Quintás-Cardama, A. Tyrosine Kinase Inhibitors: The First Decade. **Curr Hematol Malig Rep**, 5:70–80, 2010.
- Ajimura O.T., Borges B.K., Ferreira F.A. et al. Capillary electrophoresis method for plasmatic determination of imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. **Electrophoresis**, 32:1885-1892, 2011.
- Albermann N., Schitz-Winnenthal H. F., Z'graggen K., et al. Expression of drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2 and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with expression in intestine and liver. **Biochemical Pharmacology**, 70:949-958, 2005
- 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
- Annereau, J. P., Szakacs, G., Tucker, C. J.,et al. Analysis of ATP-Binding Cassette Transporter Expression in Drug-Selected Cell Lines by a Microarray Dedicated to Multidrug Resistance. **Mol. Pharmacol.**, 66, 1397- 1405, 2004.
- Apperley, J. F. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **Lancet Oncol.**,8: 1018–29, 2007
- Baccarani, M., Saglio, G., et al.. Envolving concepts i the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, 1(8):1809-1820, 2006.
- Baccarani, M., Cortes J., Pane F. et al. Chronic myeloid leukemia: na update os concepts and management reccommendations of European LeukemiaNet **Journal of Clinical Oncology**, 27:6041-6052, 2009
- Bain J.B. An overview of translocation-related oncogenesis in the chronic myeloid leukemias. **Acta Haematologica**, 107:57-63 , 2002
- Baselga J. Targeting tyrosine kynase in cancer: the second wave. **Science**, 312:1175-1178, 2006
- Bazeos A., Marin D., Reid A.G., et al. hOCT1 transcript levels and single nucleotide polymorphisms polymorphisms as predictive factors for response to imatinib in chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, 24(6):1243-124 5, 2010.
- Bendit I., Monitoração molecular da Leucemia mieloide crônica na era do imatinibe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 30(1): 20-21, 2008

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

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

Bodor M., Kelly E.J., Ho R.J. Characterization of the MDR1 gene. **AAPS Journal** 7:1-5, 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

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

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

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

Burger H., Van Tol H., Brok M., et al. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. **Cancer Biol Ther.**, 4: 747–52, 2005.

Chaudhary P.M., Mechetner E.B., Roninson I.B. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. **Blood**, 80(11):2735-2739,1992

Chowbay B., Li H, David M., Cheung Y.B., Lee E.J. Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. **Br J Clin Pharmacol.**, 60(2):159-171, 2005

Ciarimboli G., Organic Cation transporters. **Xenobiotica** 38:936-971, 2008

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

Crettoli S., De'glon J.J, Besson J., et al. No influence of ABCB1 haplotypes on methadone dosage requirement., **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 83(5):430-450, 2012

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 biology 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.

Deenen J.M.; Cats A., Beijnen J.H et al. Part 2: Pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism. **The Oncologist** 16:820-834, 2011.

Dey S, Ramachandra M, Pastan I, et al. Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94(20):10594-10599, 1997

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

Dogu GG, Kargi A, Turgut S et al. MDR1 single nucleotide polymorphism C3435T in Turkish patients with non-small-cell lung cancer. **Gene**, 506(2):404-7, 2012

Dohse, M; Scharenber G, C; Shukla, S, et al. Comparison of ATP-Binding Cassette Transporter Interactions with the Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib. **Drug Metabolism and Disposition**, 38:1371–1380, 2010.

Dong Q., Xu B., Tan Y., Liu Z., et al. The genetic variability of **MDR1** C3435T polymorphisms in four Southern Chinese populations..**Biomed Pharmacother**., 63(9):658-662,2009

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

Dudarewicz M., Barańska M., Rychlik-Sych M., et al. C3435T polymorphism of the ABCB1/MDR1 gene encoding P-glycoprotein in patients with inflammatory bowel disease in a Polish population. **Pharmacol Rep**., 64(2):343-350, 2012

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

Engle J.R., Hughes T.P., White D.L. OCT-1 as a determinant of response to antileukemic treatment. **Clin Pharmacol Ther.** 89(4):608-11,2011.

Eiring, A, M;Khorashad, J, S; Morley, K; Deininger, M, W. Advances in the treatment of chronic myeloid leukemia. **BMC Medicine**. 9:99, 2011

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.

Fischer J., Schwab M., Eichelbaum M., Fromm M. F. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. **Pharmacogenetics**,11: 293-298, 2001.

Franke R.M , Gardner E.R., Sparreboom A. Pharmacogenetics of Drug Transporters **Current Pharmaceutical Design**,16:220-230, 2010

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

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

Giannoudis A., Davies A., Lucas C.M., et al. Effective dasatinib uptake may occur without human organic cation transporter 1 (hOCT1): implications for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. **Blood**, 112: 3348–3354, 2008

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

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

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

Goto M., Masuda S., Saito H.,et al. C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation.**Pharmacogenetics**, 12(6):451-7, 2002

Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbash U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. **DNA Cell Biology**, 16:871-881, 1997

Gromicho M., Dinis J., Magalhaes A.R. et al. Development of imatinib and dasatinib resistance: dynamics of expression of drug transporters ABCB1, ABCC1, ABCG2, MVP, and SLC22A1. **Leukemia and Lymphoma**, 52: 1980-1990, 2011

Grundemann D., Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H. Drug excretion mediated by new prototype of polyspecific transporter. **Nature**, 372:549-552

Gurney H., Wong M., Balleine R.L., et al. Imatinib disposition and ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein) genotype. **Clin Pharmacol Ther**, 82: 33–40, 2007

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

Han J.Y., Lim H.S., Yoo Y.K. et al. Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Cancer**, 110:138 –147, 2007

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

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

Hu S, Franke R M, Filipinski K K, et al.. Interaction of Imatinib with Human Organic Ion Carriers. **Clin Cancer Res**, 4(10): 3141- 3148, 2008.

Hirayama C, Watanabe H., Nakashima R., et al. Constitutive Overexpression of P-glycoprotein, Rather than Breast Cancer Protein or Organic Cation Transporter 1, Contributes to Acquisition of Imatinib-Resistance in K562 Cells. **Pharmaceutical Research** 25(4):827-835, 2008.

Hochhaus A., Erben P., Ernst T. Resistance to targeted therapy in chronic myelogenous leukemia. **Seminars in Hematology**, 44(1):15-24, 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

Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. **Pharmacogenetics**, 11 : 293-298, 2001.

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

Hung C.C, Tai J.J, Lin J.C et al. Complex haplotypic effects of the ABCB1 gene on epilepsy treatment response. **Clinical Pharmacol. Therapy** 70:189-199, 2001

Ibrahim, A. R, Eliasson, L.; Apperley J., et al. Poor adherence is the main reason for loss of CCyR and imatinib failure for chronic myeloid leukemia patients on long-term therapy. **Blood**. 117(14): 3733-36, 2011.

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

ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetics Nomenclature, Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Published in collaboration with '**Cytogenetic and Genome Research**' Editor(s): Shaffer, L.G.; Slovak ML, Campbell LJ.

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

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

Jensen P.B., Roberts L.R., Vyas R., et al. Influence of *ABCB1* (P-glycoprotein) haplotypes on nortriptyline pharmacokinetics and nortriptyline-induced postural hypotension in healthy volunteers **Br J Clin Pharmacol**, 73(4):619–628, 2011

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; Talpaz, K, M; Giles, F; O'brien, S, Cortes, J. New Insights into the Pathophysiology of Chronic Myeloid Leukemia and Imatinib Resistance. **Ann Intern Med.**145:913-923. 2006.

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

Kerb R, Brinkmann U, Chatskaia N, Feng B Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. **Pharmacogenetics** 12:592-595, 2002

Keskitalo J.E, Kurkinen K.J, Neuvonen P.J, et al. Pharmacokinetics of the Acid and Lactone Forms of Simvastatin and Atorvastatin. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 84(4):457-464, 2008

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

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., Park J.Y., Sohn S.K, et al. Multidrug resistance-1 gene polymorphisms associated with treatment outcomes in de novo acute myeloid leukemia. **Int J Cancer** 118(9):2195-201,2006

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

Koh Y., Kim I., Shin D.Y, et al., Polymorphisms in genes that regulate cyclosporine metabolism affect cyclosporine blood levels and clinical outcomes in patients who receive allogeneic hematopoietic stem cell transplantation **Biol Blood Marrow Transplant**,18:37-43, 2012

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

Larson A.R., Druker J.B., Guilhot F. et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study **Blood** 111:4022-2028, 2008

Lee W., Glaeser H., Smith L. H., Roberts R.L, et al. Polymorphisms in Human Organic Anion-transporting Polypeptide 1A2 (OATP1A2): Implications for altered

drug disposition and central nervous system drug entry **J. Biol. Chem.** 280: 9610-9617 2005.

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 tagging 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

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. **Methods** 25(4):402-4088, 2001

List,A.F., Kopecky K.J., Willman C.L., et al Cyclosporine inhibition of P-glycoprotein in chronic myeloid leukemia blast phase.**Blood**100(5):1910-1912, 2002

Lydon N. Attacking cancer at its foundation **Nature Medicine** 15:1153-1157, 2009

Marin D., Bazeos A. Mahon F.X, et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib.J Clin Onco 28(14):2381-2388, 2010

Marsh S., Paul J. King C.R, et al. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome after platinum plus taxane chemotherapy in ovarian cancer: The Scottish Randomised Trial in Ovarian Cancer. **J Clin Oncol** 25: 4528–4535, 2007

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.

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 Fas and bcl-2 expression in hematopoietic precursors. **Haematologica**,86:.237-43, 2001.

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

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

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

Nardinelli, L. Acompanhamento molecular de pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com mesilato de imatinibe e avaliação dos mecanismos de resistência a tratamento: mutação no gene BCR-ABL e expressão dos genes MDR1. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008.

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

Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, et al. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the *MDR1* gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. **Clin Pharmacol Ther**, 71(4):297-303, 2002

Nowell P.C, Hungerford D.A A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia **Science** 142:1497, 1960

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

Oliveira F.F., Dos Santos R.E., de Oliveira A.L., et al. Prognostic assessment of polymorphisms of the MDR-1 and GSTP1 genes in patients with stage II and III breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. **Breast J.**, 18(2):185-187, 2012

Owen A., Chandler B., Back D.J., Khoo S.H.. Expression of pregnane-X-receptor transcript in peripheral blood mononuclear cells and correlation with MDR1 mRNA. **Antivir Ther** 9(5): 819-21, 2004

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

Quintás-Cardama A, Kantarjian H, M, Cortes J, E. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. **Cancer Control**, 16:122–13, 2009.

Racil Z, Razga F, Buresova L. et al. The assessment of human organic cation transporter 1 (hOCT1) mRNA expression in patients with chronic myelogenous leukemia is affected by the proportion of different cells types in the analyzed cell population. **Am J Hematol**. 85(7):525-528, 2010.

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

Rautio J., Humphreys J.E., Webster L.O. et al. In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. **Drug Metab Dispos.** 34(5):786-792, 2006

Rodrigues A.C., Curi R., Britto L.R., Down-regulation of ABCB1 transporter by atorvastatin in a human hepatoma cell line and in human peripheral blood mononuclear cells. **Biochim Biophys Acta.** 2006 1760(12):1866-1873,2006

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

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

Santos FP, Kantarjian H, Quintás-Cardama A, Cortes J. Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia. **Cancer J.** 17(6):465-76, 2011

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

Sauer G, Kafka A, Grundmann R, et al. Basal expression of the multidrug resistance gene 1 (MDR-1) is associated with the TT genotype at the polymorphic site C3435T in mammary and ovarian carcinoma cell lines. **Cancer Lett.** 185(1):79-85, 2002

Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, et al. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. **Lancet**, 358(9279):383-284, 2001

Siddiqui A., Kerb R., Weale M. et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. **New England Journal of Medicine** 348(15):1442-1448, 2003

Singh A.B., Bousman C.A., Ng C.H., et al. ABCB1 polymorphism predicts escitalopram dose needed for remission in major depression. **Transl Psychiatry.** 27(2):115, 2012

Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, et al. The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. **Clin Pharmacol Ther.**(5):572-583, 2002.

Sillaber C, Mayerhofer M, Aichberger KJ, Krauth MT, Valent P. Expression of angiogenic factors in chronic myeloid leukaemia: role of the bcr/abl oncogene, biochemical mechanisms, and potential clinical implications. **Eur J Clin Invest.** 34 (2):2-11, 2004

Sohn SK, Moon JH, Cho YY, Chae YS, Kim JG, et al. Efficacy of dose escalation of imatinib mesylate in patients with cytogenetic or hematologic resistance. **Leukemia and Lymphoma** 48:1659 -1661, 2007.

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.

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

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

Stromskaya, T, P, Rybalkina E, Y, Kruglov, S, S, et al. Role of P_Glycoprotein in Evolution of Populations of Chronic Myeloid Leukemia Cells Treated with Imatinib. **Biochemistry (Moscow)** 73: 29-37, 2008.

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

Swart M., Ren Y. Smith P. et al. ABCB1 4036A>G and 1236C>T polymorphisms affect plasma efavirenz levels in South African HIV/AIDS patients. **Front Genet**. 3:236, 2012

Szakacs, G., Annereau, J. P., Lababidi, S., et al. Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. **Cancer Cell**, 6, 129-137, 2004.

Takahashi N., Wakita H.,Miura M.,Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia **Clin Pharmacol Ther**, 88(6):809-813, 2010

Takahashi N, Miura M.Therapeutic drug monitoring of imatinib for chronic myeloid leukemia patients in the chronic phase.**Pharmacology**. 87(5-6):241-248, 2011

Tanabe M, Ieiri I., Nagata N. et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene **Pharmacology and Experimental Therapeutics** 297(3):1137-1143, 2001

Tang C., Schafranek L., Watkins D.B., et al. Tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia celllines: investigating resistance pathways. **Leukemia & Lymphoma**, 52(11):2139-2147, 2011

Tapaninen T., Neuvonen J.P., Niemi M. Effect of ABCB1 haplotypes on the pharmacokinetics and renin-inhibiting effect of aliskiren **Eur J Clin Pharmacol**, 66:865-870, 2010

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

Tsai C.J, Sauna Z.E, Kimchi-Sarfaty C.,et al. Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. **J Mol Biol** 383:281–291, 2008

Vandesompele J., De Petes K, Pattyn F, et al.. Acurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**; 3(7):4, 2002.

Vasconcelos F.C., Silva K.L., Souza P.S.Variation of MDR proteins expression and activity levels according to clinical status and evolution of CML patients. **Cytometry B Clin Cytom.** 80(3):158-166,2011

Vendrame-Goloni C.B. 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

Verweij J., Van Oosterom A., Blay J.Y. et al. Imatinib mesylate (STI-571 Glivec, Gleevec) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target. Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study. *Eur J Cancer* 39(14):2006-2011, 2003

Vivona D. Bueno C.T, Lima C.T et al. ABCB1 haplotype is associated with major molecular response in chronic myeloid leukemia patients treated with standard-dose of imatinib **Blood Cells Molecules and Diseases** 15:48(2):132-136, 2012

Xu P., Jiang P.Z., Zhang K.B. et al. Impact of MDR1 Haplotypes Derived from C1236T, G2677T/A and C3435T on the Pharmacokinetics of Single-Dose Oral Digoxin in Healthy Chinese Volunteers **Pharmacology** 82:221-227, 2008

Yamauchi A., Ieiri I., Kataoka Y. et al. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. **Transplantation.**,27;74(4):571-572, 2002

Yamakawa Y., Hamada A., Nakashima R., Association of genetic polymorphisms in the influx transporter SLCO1B3 and the efflux transporter ABCB1 with imatinib pharmacokinetics in patients with chronic myeloid leukemia. **Ther Drug Monit.** 33(2):244-50, 2011

Yi SY, Hong KS, Lim HS, et al. A variant 2677A allele of the MDR1 gene affects fexofenadine disposition. **Clin Pharmacol Ther.** 2004

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

Wang I., Giannoudis a, Lane S,et al. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. **Clin Pharmacol Ther.** 83:258 – 264, 2008.

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

Wolf S.J, Bachtiar M., Wang J,et al. An update on ABCB1 pharmacogenetics:insights from a 3D model into the location and evolutionary conservation of residues corresponding to SNPs associated with drug pharmacokinetics. **The Pharmacogenomics Journal**, 11:315-325, 2011

White L.D., Saunders V.A, Dang P., et al. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. **Blood**, 108(15):697-706, 2006

White L.D., Saunders V.A, Dang P.A., et al. Most CML patients who have suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. **Blood** 110:4064:4072, 2007

White DL, Hughes TP Predicting the response of CML patients to tyrosine kinase inhibitor therapy. **Curr Hematol Malig Rep.** 6(2):88-95, 2011.

Wong M. Evans S. Rivory L.P., et al. Hepatic technetium Tc 99m-labeled sestamibi elimination rate and ABCB1 (MDR1) genotype as indicators of ABCB1 (P-glycoprotein) activity in patients with cancer. **Clinical Pharmacol. Therapy** 77:33-42, 2005.

Wong S., Witte O.N. The BCR-ABL story: bench to bedside and back **Annu Rev Immunol**, 22:247-306, 2004

Wu H., Kang H. Liu Y. et al. Roles of *ABCB1* gene polymorphisms and haplotypes in susceptibility to breast carcinoma risk and clinical outcomes. **J Cancer Res Clin Oncol** 138:1449-1462, 2012

Zhang W.W., Cortes J.E., Yao H., et al., Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance. **J Clin Oncol** 27:3642-36429, 2009.

Zheng H., Webber S., Zeevi A., et al. The MDR1 polymorphisms at exons 21 and 26 predict steroid weaning in pediatric heart transplant patients.**Hum Immunol.** 63(9):765-70, 2002

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO ESTUDO DA EXPRESSÃO DO RNAm DE SLC22A1 E ABCB1

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO ESTUDO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DO ABCB1

APÊNDICE C - FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS DOS PACIENTES

APÊNDICE A

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pacientes com LMC que serão incluídos no estudo funcional do ABCB1

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

Nome: _____

Doc de Identidade: _____ Sexo: _____

Data de Nascimento: _____

Endereço: _____ N: _____ Apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: _____

Duração da pesquisa: 2 anos

Prezado (a) senhor (a),

Meu nome é Elvira M Guerra Shinohara, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e junto com os alunos de Pós-Graduação (Douglas Vivona e Luciene Terezina de Lima) estamos realizando um projeto de pesquisa sobre diferenças na resposta ao tratamento com Glivec (mesilato de imatinibe). Há algum tempo atrás você participou desta pesquisa desenvolvida por nosso laboratório com apoio da equipe de médicos do Serviço de Hematologia da Santa Casa de São Paulo. O objetivo da pesquisa foi avaliar as alterações no DNA que possam ser responsáveis pela resistência dos pacientes ao tratamento com o Glivec. Quando ingerimos um medicamento, este é absorvido no intestino, passa para o sangue e posteriormente entra nas células. Nas células existem várias proteínas que são responsáveis pela entrada e saída do remédio. Desse modo, pretendemos realizar um novo estudo que tem como objetivo avaliar uma destas proteínas (transportador ABCB1).

Se você aceitar participar do estudo, precisarei do seu consentimento e de uma nova coleta de sangue que será realizada no Ambulatório de Hematologia da Santa Casa de São Paulo. Um profissional capacitado fará a coleta de 25 mL de sangue em jejum de 8 horas e após 24 horas da ingestão do Glivec para a realização dos novos exames. O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. O seu material genético não será armazenado e será descartado após as análises.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto, a sua participação neste estudo é voluntária. 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 Glivec e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para pacientes portadores de LMC.

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

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

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

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

Nome da Testemunha

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

APÊNDICE C

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 – CURRICULUM LATTES

ANEXO 6 – ABSTRACT DO PÔSTER APRESENTADO NO 53. CONGRESSO AMERICANO DE HEMATOLOGIA (ASH 2011)

ANEXO 7 – ABSTRACT DO POSTER APRESENTADO NO 18. CONGRESSO EUROPEU DE HEMATOLOGIA (EHA 2013)

ANEXO 8 – ARTIGO DA TESE ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

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 mielóide 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 GEP

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

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

**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 Chiattoni

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 Keiske Ono
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
ISCMSp

ANEXO 4:

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

9136 - 6962662/2 - Douglas Vivona

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EFB5757-1/2	Fundamentos de Biologia Molecular (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	14/02/2011	27/02/2011	60	4	90	A	N	Concluída
HEP5800-2/3	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	01/03/2011	10/05/2011	90	6	100	B	N	Concluída
FBC5755-1/2	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese	05/04/2011	10/05/2011	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5803-1/3	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	11/04/2011	24/04/2011	30	2	75	A	N	Concluída
FBC5708-5/1	Farmacogenômica Cardiovascular	30/08/2011	10/10/2011	90	6	75	A	N	Concluída
FBC5800-4/1	Temas Avançados em Ciências e Tecnologia Farmacêutica I	17/10/2011	23/10/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/1	Análise de dados aplicados às pesquisas biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	0	0	-	N	Pré-matrícula

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	20
Estágios:			
Total:	0	20	20

ANEXO 5

Douglas Vivona

Possui graduação em Biomedicina pela Universidade Metodista de São Paulo (2005) e graduação em Farmácia pela Universidade Metodista de São Paulo (2006). Tem experiência na área de Medicina, com ênfase em Pesquisa Clínica. (Texto informado pelo autor)

Formação acadêmica/titulação

2011 Doutorado em andamento em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 6).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Estudo da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 e sua relação a marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica, Orientador: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2009 - 2011 Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: 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, Ano de Obtenção: 2011.

Orientador: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara.

Palavras-chave: ABCB1; Imatinibe; Leucemia Mieloide Crônica.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.

2003 - 2006 Graduação em Farmácia.

Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Brasil.

2000 - 2005 Graduação em Biomedicina.

Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Brasil.

2011 - 2011 El componente Genético de Enfermedades Complejas. (Carga horária: 8h).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2006 - 2006 Extensão universitária em Formação de Profissionais em Pesquisa Clínica. (Carga horária: 160h).

Nome Douglas Vivona

Nome em citações bibliográficas VIVONA, D.

Sexo Masculino

Formação acadêmica/titulação

2011 Doutorado em andamento em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 6).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Estudo da expressão dos genes ABCB1 e SLC22A1 e sua relação a marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica, Orientador: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2009 - 2011 Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 7).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: 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, Ano de Obtenção: 2011.

Orientador: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara.

Palavras-chave: ABCB1; Imatinibe; Leucemia Mieloide Crônica.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.

2003 - 2006 Graduação em Farmácia.

Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Brasil.

2000 - 2005 Graduação em Biomedicina.

Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Brasil.

Formação Complementar

Invitare Pesquisa Clínica Auditoria e Consultoria.

Vínculo institucional

2010 - 2012 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Pós-graduando, Carga horária: 20

Vínculo institucional

2006 - 2010 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Coordenador de Pesquisa Clínica

2010 - 2012 Estudo da expressão de transportadores de membrana e sua relação com marcadores

de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica

Descrição: A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma expansão clonal da célula progenitora hematopoietica, traduzindo-se por hiperplasia mieloide, 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 (C₂₉H₃₁N₇O₃.CH₄SO₃) é um derivado da fenilaminopirimidina, age como inibidor da proteína-tirosina quinase, que inibe fortemente a tirosina quinase ABL in vitro, no nível celular, e in vivo, inibindo especificamente a proliferação de células que expressam v-abl e bcr-abl. O imatinibe interage com transportadores de membrana de efluxo, como o ATP binding cassette B1 (ABCB1, MDR1) e ATP binding cassette G2 (MXR, BCRP); e de influxo, como o Organic cation transporter 1 (hOCT1) também conhecido como Solute Carrier 22A1 (SLC22A1) e Organic anion transporter polypeptid 1A2 (SLC01A2, OATP1A2). A expressão e os polimorfismos presentes nos genes desses transportadores têm sido associados com alteração na funcionalidade das bombas e podem estar relacionados com a resposta ao tratamento farmacológico. Este estudo tem por objetivo investigar a relação da expressão gênica de ABCB1, ABCG2, SLC22A1 e SLC01A2 e polimorfismos dos genes ABCB1 e SLC22A1 com marcadores de resposta ao tratamento com MI, em indivíduos com LMC, e determinar os fatores genéticos de predisposição de resposta ao MI..

Situação: Em andamento; **Natureza:** Outra.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) Doutorado: (1) .

Integrantes: Douglas Vivona / Elvira Maria Guerra Shinohara - Coordenador / - Integrante.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina.

2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem

Espanhol Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

VIVONA, D. ; Lima, L.T. ; TOSIN, C.B. ; HIRATA R.D.C ; HIRATA M.H. ; LUCHESSI, A. D. ; CHIATTONE C.S. ; ZANICHELLI M.A ; Guerra-Shinohara, E.M. . Haplotype for polymorphisms C1236T, C3435T and G2677T/A in MDR1 gene is associated with major molecular response in chronic myeloid leukemia patients treated with standart-dose of imatinib.. In: 16th Congress of the European Hematology Association. In: 16th Congress of EHA, 2011, London. 16th Congress of the European Hematology Association, 2011.

Lima, L.T. ; VIVONA, D. ; TOSIN, C.B. ; HIRATA R.D.C ; HIRATA M.H. ; LUCHESSI, A. D. ; ZANICHELLI M.A ; CHIATTONE C.S. ; Guerra-Shinohara, E.M. . Imatinib response is influenced by ABCG2 and SLC22A1 gene expression in chronic myeloid leukemia. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2011. v. 33. p. 144-145.

VIVONA, D. ; TOSIN, C.B. ; Lima, L.T. ; HIRATA R.D.C ; HIRATA M.H. ; LUCHESSI, A. D. ; ZANICHELLI M.A ; CHIATTONE C.S. ; Guerra-Shinohara, E.M. . Associação entre os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T no gene ABCB1 e marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2010, Brasília. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2010. v. 32. p. 206-206.

TOSIN, C.B. ; VIVONA, D. ; Lima, L.T. ; HIRATA R.D.C ; HIRATA M.H. ; LUCHESSI, A. D. ; CHIATTONE C.S. ; ZANICHELLI M.A ; Guerra-Shinohara, E.M. . Association between the C1236T, C3435T AND G2677T/A polymorphisms in the ABCB1 gene and response markers for imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leucemia. In: XLV SUPFAB, 2010, São

Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. v. 46. p. 85-85.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2010. Associação entre os polimorfismos C1236T, C3435T e G2677T no gene ABCB1 a marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica. 2010. (Congresso).

I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HEMATOLOGIA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS.

2010. (Congresso).

II SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS. Estudo da expressão de transportadores de membrana e

sua relação com marcadores de resposta ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica. 2010. (Simpósio).

Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2009. 2009. (Congresso).

Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2008. 2008. (Congresso).

Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2007. 2007. (Congresso).

Programa de Excelência em Pesquisa Clínica em Centros de Pesquisa. 2007. (Outra).

ANEXO 6:

ABCG2 and SLC22A1 Expression Are Associated with Imatinib Response in Chronic Myeloid Leukemia

Program: Oral and Poster Abstracts

Session: 604. Molecular Pharmacology, Drug Resistance: Poster I

Saturday, December 10, 2011, 5:30 PM-7:30 PM

Douglas Vivona, MSc^{1*}, Luciene Terezina Lima^{2*}, Carolina Tosin Bueno^{3*}, Rosario D C Hirata, PhD^{4*}, Mario H Hirata, PhD^{4*}, André Ducati Luchessi, PhD^{3*}, Maria Zanichelli, MD, PhD^{5*}, Carlos S Chiattonne, MD, PhD⁶ and Elvira Maria Guerra-Shinohara, PhD^{4*}

¹Clinical Chemistry and Toxicologic, São Paulo University, São Bernardo do Campo, Brazil

²Clinical Chemistry and Toxicologic, São Paulo University, São Paulo, Brazil

³Clinical Chemistry and Toxicologic, São Paulo University, São Paulo, Brazil

⁴Clinical Chemistry and Toxicologic, São Paulo University, São Paulo, Brazil

⁵Department of Hematology, Hospital Brigadeiro, São Paulo, Brazil

⁶Hematology and Oncology, Santa Casa Medical School, São Paulo, Brazil

Background: Imatinib Mesylate (IM) used in the treatment of CML, interacts with membrane efflux transporters such as ABCB1 and ABCG2, whereas the active uptake of IM into the cells is mediated by SLC22A1. The predictive value of these markers is still controversial. The altered expression of these genes could impact on intracellular concentration of IM and contribute to resistance.

Aims: The aim of this study was to investigate ABCB1, ABCG2 and SLC22A1 gene expression as potential sources of resistance to imatinib in patients with CML

Methods: One hundred and eighteen patients in chronic phase of CML, both genders with age range 18 to 80 were studied. All patients were initially treated with a standard dose of IM (400 mg/day) and divided in two groups according to response. The responder group comprised 70 patients who had a complete cytogenetic response within 18 months of treatment. The non-responder group comprised 48 patients who did not have a complete cytogenetic response with the initial dose (400 mg/day) of IM or who relapsed during treatment and were submitted to higher doses of 600 or 800 mg/day. Criteria of failed response to treatment were established by European LeukemiaNet. Patients with cytogenetic patterns other than the Philadelphia chromosome and patients with mutations in the BCR-ABL1 gene were excluded from this study. Major molecular response (MMR) was defined as a reduction of BCR-ABL1 transcripts levels to $\leq 0.1\%$ in the peripheral blood standardized on the International scale. Complete molecular response (CMR) was defined as a reduction $\leq 0.032\%$ BCR-ABL1 transcripts levels. Primary resistance and secondary resistance also were evaluated. Real-Time PCR was performed to evaluate the ABCB1, ABCG2 and SLC22A1 mRNA relative expression to control gene GAPDH.

Results: Expression of ABCG2 in the non-responder group was higher than in the responder group ($P=0.028$). This result was influenced by patients with primary resistance ($n=34$ $p=0.029$) but not secondary resistance ($n=14$ $p=0.249$) when compared with responders ($n=70$). ABCB1 and SLC22A1 expression were similar between responder and non-responder groups. Higher levels of SLC22A1 mRNA were found in patients who achieved MMR in the responder group ($p=0.009$). The elevated ABCG2 expression was also found in those who did not achieve MMR ($p=0.027$) when all patients were analyzed. None of studied genes was associated with CMR.

Conclusions: The high expression of ABCG2 is related to primary resistance and SLC22A1 is positively associated with major molecular response to treatment with IM. Our data suggests that ABCG2 may be a mediator of IM resistance, whereas SLC22A1 could be a good predictor of response to IM therapy.

Financing: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2009/54184-0)

Disclosures: No relevant conflicts of interest to declare.

ANEXO 7:

ABCB1 HAPLOTYPE IS ASSOCIATED WITH ALTERATIONS IN FUNCTIONAL ACTIVITY OF P-GP AND AFFECTS MAJOR MOLECULAR RESPONSE IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENTS TREATED WITH STANDARD-DOSE OF IMATINIB

Douglas Vivona^a, Luciene T. Lima^a, Alice C. Rodrigues^b, Carolina T. Bueno^a, Maria L. L. F. Chauffaille^d, Vania Hungria^c, Carlos S. Chiattoni^c, Elvira M Guerra-Shinohara^a

^aDepartment of Clinical Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Science University of São Paulo, Brazil; ^b Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.; ^c Department of Hematology and Hemotherapy, Santa Casa de São Paulo, Brazil, ^d Discipline of Hematology and Hemotherapy, Federal University of São Paulo, Brazil.

Key words: Imatinib Mesylate, Chronic Myeloid Leukemia, ABCB1, SLC22A1

Background: Despite the excellent results of Imatinib Mesylate (IM) treatment in CML patients, some individuals develop resistance due to impaired bioavailability. IM interacts with membrane transporters such as ABCB1 (P-gp) and SLC22A1. It was demonstrated that haplotype for *ABCB1* c.1236C>T/c.3435C>T/c.2677T>A polymorphisms strongly affect the secondary structure of ABCB1 mRNA and its activity. These modifications could affect the efflux transporter activity and response to treatment with IM.

Aim: The aim of this study was to investigate the P-gp functional activity in peripheral blood mononuclear cells from CML patients with different haplotypes for *ABCB1* c.1236C>T, c.3435C>T and c.2677TG>T polymorphisms.

Methods: Twenty eight patients in chronic phase of CML were selected according to haplotypes *ABCB1* c.1236C> T, c.3435C> T and c.2677G>T polymorphisms. Ten patients with *ABCB1* 1236CC/3435CC/2677GG haplotype comprised the wild-type group and 18 patients carriers of haplotypes with at least one mutated allele in each genotype for three *ABCB1* polymorphisms (10 patients with 1236CT/3435CT/2677GT and 8 with 1236TT/3435TT/2677TT) comprised the mutated group. All patients were in chronic phase of CML, treated with a standard dose of IM (400 mg/day) for a median time of 63.5±12.6 months and with complete cytogenetic response. Major molecular response (MMR) was defined as a reduction of BCR-ABL1 transcripts levels to ≤ 0.1% in the peripheral blood standardized on the International scale. Complete molecular response (CMR) was defined as a reduction ≤ 0.0032% BCR-ABL1 transcripts levels. Real-Time PCR was performed to evaluate the *ABCB1* and *SLC22A1* mRNA expression using GAPDH gene as control. P-gp functional activity was determined by rhodamine123 efflux assay. Analysis of P-gp expression and functional activity were performed by flow cytometry.

Results: P-gp activity in wild-type group was higher than in mutated group (59.1 vs 38.3%; P=0.001). The groups of haplotypes had no difference in *SLC22A1*, *ABCB1* mRNA and P-gp expression. Patients who did not achieve MMR showed a higher rate of efflux mediated by P-gp compared with individuals who did not achieve this response (64.7% vs. 45.7%, P = 0.001). All patients who did not achieve MMR

presented efflux above 60%. Unlike MMR, no association was found for CMR. Higher levels of *SLC22A1* mRNA were found in patients who achieved MMR ($P=0.042$). The *ABCB1* mRNA expression showed a positive and strong correlation with P-gp expression ($r=0.747$; $P=0.001$). P-gp activity had positive and moderate correlation ($r=0.570$; $P=0.001$), whereas *SLC22A1* mRNA expression showed negative and moderate correlation with *BCR-ABL1* transcripts ($r=-0.407$; $P=0.032$).

Conclusion: The *ABCB1* mRNA and P-gp expression were similar in haplotypes groups for c.1236C> T, c.3435C> T and c.2677G>T polymorphisms, however, patients with the 1236CT/3435CT/2677GT and 1236TT/3435TT/2677TT haplotypes exhibit less efflux mediated by P-gp presenting highest frequency of MMR, probably due to higher intracellular concentrations of IM.

ANEXO 8:**To: Oncology Letters**

ABCB1 haplotypes are associated with P-gp activity and affect major molecular response in chronic myeloid leukemia patients treated with standard-dose of imatinib

Douglas Vivona¹, Luciene Terezina Lima¹, Alice Cristina Rodrigues², Carolina Tosin Bueno¹, Greyce Kelly Steinhorst Alcantara³, Luiza Saldanha Ribeiro Barros³, Vania Tiestsche de Moraes Hungria⁴, Carlos Sérgio Chiattoni⁴, Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille⁵, Elvira Maria Guerra-Shinohara¹

¹Faculty of Pharmaceutical Science, Department of Clinical and Toxicological Analyses, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil;

²Institute of Biomedical Science, Department of Pharmacology, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil;

³Faculty of Pharmaceutical Science, Department of Clinical, Toxicological and Bromatological Analyses, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, Brazil;

⁴Department of Hematology and Hemotherapy, Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brazil;

⁵Department of Clinical and Experimental Oncology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Douglas Vivona

University of São Paulo

Faculty of Pharmaceutical Science

Av. Prof. Lineu Prestes, 580. CEP 05508-900. São Paulo, SP, Brazil.

FAX (+5511) 3813-2197

Email: dovivona@hotmail.com

Abstract

Despite the high efficacy of imatinib mesylate (IM) treatment in CML patients, some individuals develop resistance due to impaired bioavailability. It was demonstrated that the haplotypes for *ABCB1* c.1236C>T, c.3435C>T, and c.2677G>T/A polymorphisms strongly affect the secondary structure of *ABCB1* mRNA and its activity. These modifications could affect efflux transporter activity and response to treatment with IM. In order to investigate the influence of *ABCB1* haplotypes in P-gp activity, IM plasma levels and IM response, we studied 28 chronic phase CML patients treated with a standard-dose of IM (400 mg/day). They were selected according to the haplotypes for *ABCB1* c.1236C>T, c.3435C>T and c.2677G>T polymorphisms and classified into 2 groups based on the presence of the mutated allele in each genotype for three *ABCB1* polymorphisms. We also assessed P-gp expression and BCR-ABL1, *ABCB1*, and *SLC22A1* mRNA expression. P-gp activity in the wild-type group was higher than in the mutated group (59.1 vs. 38.3%; $P=0.001$). Patients who did not achieve major molecular response (MMR) showed a higher rate of efflux mediated by P-gp when compared to individuals who achieved this response (64.7% vs. 45.7%, $P=0.001$). All patients who did not achieve MMR presented efflux above 60%. Patients without MMR had lower plasma concentrations of IM compared to those who achieved this response (0.51 $\mu\text{g/mL}$ vs. 1.42 $\mu\text{g/mL}$, $P=0.001$). Higher levels of *SLC22A1* mRNA were found in patients who achieved MMR and complete molecular response (CMR) ($P<0.05$). In conclusion, *ABCB1*1236CT/3435CT/2677GT and 1236TT/3435TT/2677TT

haplotypes are associated with lower P-gp activity and major molecular response in chronic phase CML patients treated with standard-dose of IM.

Key words: Imatinib Mesylate, Chronic Myeloid Leukemia, ABCB1

Running title: Vivona *et al*: Influence of ABCB1 haplotypes in P-gp activity and response to imatinib treatment.

Introduction

Imatinib mesylate (IM) is a first generation tyrosine kinase inhibitor used in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML), gastrointestinal stromal tumors (GIST), and other types of cancer (1). In CML, IM inhibits the oncoprotein BCR-ABL1 from [phosphorylating](#) subsequent proteins and initiating the signaling cascade necessary for CML development (2). Long-term follow-up results of the IRIS trial (International Randomized Study of Interferon and STI-571) have confirmed the benefits of IM and the durable response of the drug. After 8 years of IM treatment, there was no disease progression in patients who maintained a complete cytogenetic response (CCyR) and major molecular response (MMR)(3). Therefore, obtaining and maintaining such responses are essential for the survival of CML patients treated with IM.

Despite the high efficacy of IM treatment in CML, some patients fail to achieve optimal response. Mutations in the kinase domain of BCR-ABL1 are the main causes of resistance to IM treatment, as they interfere with the binding of the drug to its target, decreasing effectiveness (4). Accumulating data, however, indicate a contributing role of pharmacokinetics in IM efficacy, as well as for the initial therapeutic response, and for the time to progression. Variations in drug uptake and efflux transporters activity could affect IM absorption, distribution, and excretion, thereby influencing pharmacokinetics (5).

Several studies demonstrated that IM is a substrate of membrane transporters, such as ABCB1 (P-gp,MDR1) and SLC22A1 (hOCT1) (6-8). The ABCB1 gene is located in the 7q21.1 chromosome (9) and encodes a glycoprotein with 170 KDa (P-gp, MDR1) (10). The structure of P-gp comprises a transmembrane domain with six hydrophobic segments and a cytoplasmic domain with a binding site for ATP and is responsible for the ATP-dependent movement of a wide variety of xenobiotics (including drugs), lipids, and metabolic products across the plasma and intracellular membranes (11). Since P-gp is involved in the efflux of a broad spectrum of drugs, variations in protein expression or activity could affect the pharmacokinetics of IM by reducing or increasing its bioavailability.

The ABCB1 gene is highly polymorphic and more than 1200 SNPs in this gene were identified, 50 of them in the coding region (12). Three SNPs have been particularly studied with two silent c.1236C>T, c.3435C>T and one promoter of two different amino acid changes, c.2677G>T/A (Ala893Ser/Thr). These polymorphisms are in strong linkage disequilibrium and form the three most common haplotypes (1236CC/3435CC/2677GG, 1236CT/3435CT/2677GT, and 1236TT/ 3435TT/2677TT) (13). In cell lines expressing wild-type and mutant haplotypes of c.1236C>T, c.3435C>T and c.2677G>T/A polymorphisms, no alterations in ABCB1 mRNA expression and P-gp protein length were found, but it was demonstrated that haplotypes containing the mutated alleles showed major structural modifications that result in changes in the conformation of the binding sites and a decrease in P-gp activity (12-14).

In a previous study of our group, the *ABCB1*1236CT/3435CT/2677GT haplotype was associated with MMR in responsive patients to standard-dose of IM (15). Whereas the haplotype formed by c.1236C>T, c.3435C>T and c.2677G>T/A polymorphisms in ABCB1 gene could be related to the variability of response to IM due to changes in the functionality of

this efflux pump; we conducted this study in which we evaluated the functional activity of P-gp in order to assess the influence of *ABCB1* 1236CC/3435CC/2677GG, 1236CT/3435CT/2677GT, and 1236TT/3435TT/2677TT haplotypes in the efflux capacity mediated by P-gp, and the possible impact on the plasma concentration of IM and molecular responses in patients with CML treated with the standard-dose of 400 mg/day.

Materials and Methods

Subjects

Twenty eight patients in chronic phase CML were selected according to the haplotypes for *ABCB1* c.1236C>T, c.3435C>T, and c.2677G>T polymorphisms at Santa Casa de São Paulo and Hospital Brigadeiro, Brazil. Ten patients with *ABCB1* 1236CC/3435CC/2677GG haplotype comprised the wild-type group and 18 patients who were carriers of haplotypes with at least one mutated allele in each genotype for three *ABCB1* polymorphisms (10 patients with 1236CT/3435CT/2677GT and 8 with 1236TT/3435TT/2677TT) comprised the mutated group. Patients were matched for IM time of use. All patients were in chronic phase CML, treated with a standard-dose of IM (400 mg/day) for an average time of 60.3±12.6 months, and with CCyR.

The study protocol was approved by the Investigational Review Board of Universidade de São Paulo (Brazil), Hospital Brigadeiro (Brazil) and Santa Casa de São Paulo (Brazil). A written informed consent was obtained from all participants.

Analysis of ABCB1 polymorphisms

Genomic DNA was isolated from peripheral blood using a QIAamp DNA blood mini kit (PreAnalytix/Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol. *ABCB1* genotyping was performed using PCR followed by restriction fragment analysis (RFLP), as described previously for c.3435C>T, c.2677G>T/A (16) and c.1236C>T (17). The accuracy of the genotyping was

evaluated by performing a duplicate analysis of 20% of randomly selected samples and 10% of genotypes were confirmed by DNA sequencing.

Isolation of PBMCs

Isolation of PBMCs was performed by peripheral blood collection in Vacutainer® CPT™ tubes. The tubes were inverted five times and centrifuged at 1,720xg for 20 minutes at room temperature. After centrifugation, PBMCs (monocytes and lymphocytes) remained above the gel barrier and were suspended into the plasma by inverting the tube. The tube was centrifuged at 300xg for 10 min at room temperature, the supernatant was discarded and the pellet was suspended in PBS.

Isolation of mRNA and cDNA synthesis

PBMCs mRNA was extracted with a RNeasy mini kit (PreAnalytix/ Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol. Concentration and purity of isolated mRNA was measured with Nanodrop™ ND-1000 (Nanodrop Technologies, USA). cDNA was synthesized from 500 ng RNA using a RNA-to-cDNA™ Master Mix kit (Applied Biosystems, USA).

BCR-ABL1 mRNA levels

BCR-ABL1 transcripts were measured with real-time PCR, as previously described (18). Major molecular response (MMR) and complete molecular response (CMR) were defined as a reduction of *BCR-ABL1* transcript levels lower than 0.1% and 0.0032%, respectively, in peripheral blood samples standardized according to the international scale (4).

ABCB1 and SLC22A1 mRNA expression

The determination of ABCB1 and SLC22A1 mRNA expression was performed through real-time PCR using Taqman™ assays (Hs00184500_m1 and Hs00427552_m1,

respectively) (Applied Biosystems, USA). Five genes (*B2M*, *GAPDH*, *HMBS*, *HPRT1*, and *SDHA*) were tested using geNorm™ software (19) and *GAPDH* was chosen as a reference gene. The relative quantification value of each gene was analyzed using a comparative C_T method. The following formula was used to calculate the relative amount of transcripts in the sample and normalized to the reference gene *GAPDH*: Gene expression = $2^{-\Delta C_T}$, where $\Delta C_T = C_{T \text{ gene of interest}} - C_{T \text{ reference gene}}$.

All reactions were duplicated and each reaction plate was performed without a sample (negative control) to assess possible contamination of reagents.

Flow Cytometric Assessment of P-gp Activity (Rh123 Efflux)

P-gp functional activity was assessed by the ability of cells to do the cellular efflux of rhodamine (Rh123), P-gp substrate by flow cytometry (20). PBMCs (1×10^6) were incubated with Rh123 (1 μ M) in PBS at 37°C for 15 minutes in the dark. The cells were incubated in the presence and absence of a P-gp inhibitor, PSC-833 (50 μ M), for one hour at 37°C. At 0 and 60 min of incubation, cells were washed twice with PBS and the cell pellet was suspended with 300 μ L PBS and immediately used for flow cytometric analysis of Rh123 retention. The Rh123 fluorescence was determined by flow cytometry with FACSCantoII flow cytometer (BD Biosciences, USA) at a wavelength of 525 nm. Lymphocytes were gated in the forward versus side scatter excluding cell debris and other blood cells. In each sample, 10,000 cells were counted. P-gp mediated efflux was calculated by the formula below.

$$\% \text{ Rh123 efflux} = \frac{[\text{Rh123}]_{0\text{min}} - [\text{Rh123}]_{60\text{min}}}{[\text{Rh123}]_{0\text{min}}}$$

P-gp mediated efflux = % Rh123 efflux (absence of PSC-833) - % Rh123 efflux (presence of PSC-833)

Determination of P-gp expression

PBMCs of all patients were tested for P-gp expression which was quantified using anti-human P-gp monoclonal antibody 17F9 (Santa Cruz Biotechnology, USA). The protocol was adapted from Rodrigues and colleagues (21). Briefly, PBMCs (1×10^6) were washed with PBS and fixed with 1% formaldehyde for 15 minutes at room temperature. After one wash with PBS, cells were incubated with primary anti-P-gp antibody 17F9 (1:50 dilution in PBS) overnight at 4°C. After incubation, the cells were washed with PBS and incubated with the secondary antibody (1:50 dilution in PBS), goat anti-IgG antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) for 40 min at 4°C. After incubation, the cells were suspended in 300µL PBS for flow cytometric analysis with FACSCantoII flow cytometer (BD Biosciences, USA). Lymphocytes were gated in the forward versus side scatter excluding cell debris and other blood cells and 10,000 cells were counted in each sample. As a negative control, PBS was used instead of primary antibody.

The results were expressed as the ratio between the mean fluorescence intensity (MFI) of cells treated with 17F9 primary antibody and FITC-labeled secondary antibody divided by the MFI of cells treated only with the secondary antibody (negative control). Reasons greater than 1.1 were considered positive for P-gp expression (20).

Imatinib Plasma Levels

Blood samples were collected 24 hours (± 2 hours) after IM dose, according to Larson and colleagues (22). Plasma concentrations of IM and its metabolite, CGP74588, were measured using capillary electrophoresis with lidocaine as the internal standard, according to Ajimura and colleagues (23), with minor modifications. The limit of quantification (LOQ)

was 0.125 µg/mL. Precision and accuracy (%CV) at concentrations between 0.125 and 5.00 µg/mL were better than 15%.

Statistical analysis

The database and statistical analysis were performed using the software SPSS version 17.0 (IBM, USA). Graphs were obtained with GraphPad, 5.04 version (GraphPad software, USA). Numerical variables were compared using the Student t test or Mann-Whitney test. Comparison of categorical variables was performed by chi-square or likelihood ratio. To evaluate the difference in mRNA expression of ABCB1 and SLC22A1 genes, IM plasma levels and P-gp activity between groups with different haplotypes, we used the nonparametric Mann-Whitney test. Spearman correlations were conducted between the variables: P-gp activity, P-gp expression, ABCB1 and SLC22A1 mRNA expression, BCR-ABL1 transcripts, and IM plasma levels. We have considered strong correlation values those above 0.7, moderate ones those between 0.7 and 0.3, and weak ones those below 0.3. The significance level for statistical tests is 5%, ie, $P < 0.05$.

RESULTS

Clinical data

Patients included had similar distributions in age, number of blood cells (erythrocytes, leukocytes and platelets), time of diagnosis, treatment prior to IM, and time of IM use ($P > 0.05$), according to the different haplotype groups. All patients were in complete hematologic and complete cytogenetic response (**Table I**). The frequencies of MMR and CMR in the wild-type and mutated groups were similar (MMR: 80% vs. 88.9% and CMR: 20% vs. 17.7%) ($P > 0.05$).

P-gp activity and IM response

Median Rh123 efflux in the wild-type and mutated groups was 59.1 (54.8 - 69.5) and 38.3 (27.4 - 47.9), respectively. We observed a higher P-gp activity in patients with the wild-type haplotype compared to those with the mutated allele ($P < 0.001$) (**Figure I**). There was no influence of different haplotypes in ABCB1 mRNA expression, P-gp expression, and IM plasma levels (**Figure II**).

There was a strong and direct correlation between ABCB1 mRNA expression and P-gp expression ($r = 0.747$, $P = 0.001$). P-gp activity was positive and moderate correlated ($r = 0.570$; $P = 0.001$), whereas SLC22A1 mRNA expression was negative and moderate correlated with *BCR-ABL1* transcripts ($r = -0.407$; $P = 0.032$).

Patients who did not achieve MMR showed a higher rate of efflux mediated by P-gp compared to individuals who achieved this response (64.7% vs. 45.7%, $P = 0.001$). Individuals who had achieved MMR and CMR had higher median of SLC22A1 mRNA expression when compared to individuals who have not reached these responses ($P < 0.05$). All patients who did not achieve MMR showed efflux above 60%. No association was found between P-gp activity and CMR (**Table II**). Patients without MMR had lower plasma concentration of IM when compared to those that achieved this response (0.51 $\mu\text{g/mL}$ vs. 1.42 $\mu\text{g/mL}$, $P = 0.001$). No association was observed between plasma concentration of IM and CMR (**Table II**).

DISCUSSION

ABCB1 c.1236C> T, c.3435C> T, and c.2677G>T/A polymorphisms have been associated with cancer risk, as well as the variability of response to chemotherapy treatments (24, 25). It was previously described that the three polymorphisms are in strong linkage disequilibrium. Considering the various haplotypes for *ABCB1* c.1236C> T, c.3435C>T, and c.2677G>T/A polymorphisms, it was reported that ~60% of population,

regardless of ethnicity, had one of these 3 haplotypes: 1236CC/3435CC/2677GG, 1236CT/3435CT/2677GT, and 1236TT/3435TT/2677TT (26).

Dulucq and colleagues (27) observed that CML patients treated with a standard-dose of IM (400 mg/day), and who were carriers of the 1236C/3435C/2677G haplotype achieved MMR less often than patients with other haplotypes (44.6% vs. 70%). In this same study, 1236T/3435T/2677T haplotype was associated with MMR and serum concentrations of IM greater than 1.0 µg/mL.

In the present study, we observed that patients who did not achieve MMR had a higher P-gp efflux activity (measured by Rh123 efflux), and higher P-gp activity was associated with wild-type haplotype (1236CC/3435CC/2677GG). Others studies have associated P-gp activity and ABCB1 haplotypes. 1236CC/3435CC/2677GG haplotype was associated with failure to treatment with antiepileptic drugs (28). Another study that included patients with various types of cancer, including CML, demonstrated that the rate of elimination of the P-gp substrate sestamibi [^{99m}Tc] was higher in individuals who had the 3435CC/2677GG haplotype, suggesting a higher P-gp activity in patients with these genotypes (29). Other studies have shown that subjects with the 1236TT/3435TT/2677TT haplotype had a higher plasma concentration of digoxin, simvastatin, atorvastatin and anthracycline compared to subjects with others haplotypes (30-33). Recently, the 1236T/3435T/2677T haplotype was associated with better response to treatment with anthracyclines in patients with breast cancer (33). Increased serum concentration of digoxin was found in carriers of 1236TT/3435TT/2677TT haplotype in 195 patients with congestive heart failure (30). The same effect was observed in Chinese patients using digoxin (32). Keskitalo and colleagues (31) showed that individuals carrying the 1236T/3435T/2677T haplotype had higher plasma concentrations of simvastatin and atorvastatin.

In contrast, Kim and colleagues (34) showed that carriers of the 1236CC/3435CC/2677GG haplotype had approximately a 40% higher AUC value of fexofenadine compared to those individuals carriers of heterozygous and mutated haplotypes. Other studies found no relationship between the c.1236C>T, c.3435C>T,c.2677G>T/A haplotypes and aliskiren, methadone, nortriptyline, docetaxel and paclitaxel pharmacokinetics (35-37).

These discrepant results suggest that the influence of P-gp transport can be specific for each substrate. To date, the mechanisms that involve the drug structure and the interaction with P-gp have not been elucidated. Furthermore, most studies have concluded their results from associations between the observed phenotype and genotypes of c.1236C> T, c. 3435C>T, and c.2677G>T/A polymorphisms, without performing any P-gp activity test to confirm whether these genotypes were related to the change in the rate of this efflux pump or that only this transporter is involved in the response or change in drug concentration.

Our results corroborate the data presented by Dulucq and colleagues (27) and Vivona and colleagues (15) that found an association between the presence of at least one mutant allele in these three polymorphisms and MMR. The lower efflux mediated by ABCB1 haplotypes suggests that reduced P-gp activity is associated with higher IM intracellular concentration, which would result in MMR.

IM plasma levels may affect the response to this drug. It has been suggested that the concentration of 1.0µg/mL of IM as optimal for obtaining MMR (38-40). Indeed, in the present study, patients who have achieved MMR had higher IM plasma concentrations compared to those who did not achieved MMR (1.42 µg/mL vs. 0.51 µg/mL), but no association was observed between IM plasma levels and CMR. All included patients achieved CCyR even with concentrations below 1.0 µg/mL. These results are similar to two other studies that found no relationship between the IM plasma concentration and CCyR (39, 40).

Conflicting results regarding the association of c.1236C>T, c.3435C>T, and c.2677G>T/A polymorphisms and the elimination of IM as measured by renal clearance were observed in some studies (40-42). A study conducted in 34 CML patients that evaluated *ABCB1* c.3435C>T polymorphism on IM pharmacokinetics showed that individuals with the 3435CC genotype had higher renal clearance of IM than individuals with 3435CT and 3435TT genotypes (41). In contrast, another study with 22 CML patients showed that 1236TT/3435TT/2677TT haplotype carriers had higher renal clearance of IM compared to patients with other haplotypes (42). However, in that study only 4 patients had 1236TT/3435TT/2677TT haplotype. In the present study, no association was found between 1236CC/3435CC/2677GG, 1236CT/3435CT/2677GT, and 1236TT/3435TT/2677TT haplotypes and IM plasma concentration. These results are in agreement with another study that found no association between the c.1236C>T, c.3435C>T, and c.2677G>T/A polymorphisms and IM plasma levels (40). These data suggest the need for further studies with a larger number of individuals to characterize the relationship between c.1236C>T, c.3435C>T, and c.2677G>T/A polymorphisms with IM pharmacokinetics.

The literature data is still limited on how c.1236C>T, c.3435C>T, and c.2677G>T/A polymorphisms alter the interaction between P-gp and its substrates. Several studies have shown that each substrate can interact with different binding sites of P-gp (43, 44), but it is difficult to determine in advance which areas are important for each drug class. Fung and colleagues (12) using UIC2 monoclonal antibody directed against the extracellular epitope of P-gp, showed *in vitro* that the conformation of wild-type haplotype for c.1236C>T, c.3435C>T, and c.2677G>T/A polymorphisms is different from the mutated haplotype. This change is dependent on the presence of the c.3435C>T polymorphism in the haplotype. This study suggests that synonymous mutations at *ABCB1* haplotype produce a subtle change in substrate binding site.

Changes in protein function caused by *ABCB1* synonymous polymorphisms cannot be explained by the amino acid sequence of the protein. However, observations *in vitro* and *in vivo* studies suggest that c.3435C>T polymorphism affects protein folding and function (13, 45) when it appears in a haplotype with c.1236C>T and c.2677G>T/A. Tsai and colleagues (46) have suggested that synonymous c.3435C>T polymorphism can cause a pause in the reading of codons on ribosomes and affect protein translation.

Reduced P-gp activity in carriers of heterozygous and mutated haplotypes compared to wild-type haplotype carriers found in this study may be explained by a possible conformational change in the carrier, but not by changes in the expression of the *ABCB1* mRNA or P-gp expression. This modification leads to decreased efflux of IM changing the intracellular concentration of IM into the cell. Our data suggests that changes in the intracellular concentration may be crucial for MMR, although all patients included had achieved complete hematological and complete cytogenetic response. The achievement of molecular responses seems to be a more complex process and dependent of higher intracellular IM concentrations and altered pharmacokinetics associated with low *SLC22A1* mRNA and hOCT1 activity; and/or increased efflux related to the presence of the *ABCB1* 1236CC/3435CC/2677GG haplotype can substantially impact the molecular response to IM treatment.

In the present study, we assessed *SLC22A1* mRNA expression in order to evaluate the possible combined action with P-gp activity. We observed higher *SLC22A1* mRNA expression in patients with MMR and CMR compared to those without molecular response. This data is in agreement with another study that found higher levels of *SLC22A1* transcripts in patients with MMR and CMR after 6 years of IM treatment (39).

In summary, this study demonstrated that *ABCB1* 1236CT/3435CT/2677GT and 1236TT/3435TT/2677TT haplotypes are associated with lower P-gp activity and MMR in

chronic phase CML patients treated with a standard-dose of 400mg/day. However, other factors, such as other pharmacokinetic and genetic polymorphisms in ABCB1 and SLC22A1 genes, the expression of metabolizing enzymes such as CYP3A4 and CYP3A5 and other carriers as SLCO1A2 and ABCA3, could be interacting and explaining the variability of the IM response. Prospective studies involving larger numbers of patients and many pharmacogenetic markers are needed to definitely elucidate the influence of these on the pharmacokinetics of IM.

Acknowledgments

This study was supported financially by FAPESP, Brazil (#09/54184-0). CTB, LTL are recipients of fellowships from CNPq, Brazil. We thank all the patients who participated in this study.

Table I: Distribution of age, number of blood cells (erythrocytes, leukocytes and platelets), time of diagnoses, preview treatment to IM and time of IM use of the CML patients

	Wild-Type N=10	Mutated N= 18	P value
Age^a	51.2 (30.2-57.0)	53.7 (33.8-68.0)	0.627
Erythrocytes (.10⁶/mm3)^a	4.59 (4.21-5.12)	4.3 (3.98-5.10)	0.885
Leukocytes (.10³/mm3)^a	5.10 (4.30-5.80)	4.22 (3.92-6.57)	0.797
Platelets (.10³/mm3)^a	200 (180-237)	193 (178-248)	0.795
Time of diagnoses^a (months)*	62.5 (59.7-100)	65.5 (59.0-109.2)	0.832
Preview treatment to IM^b			
Interferon- α	4 (40.0)	9 (50.0)	0.879
None	6 (60.0)	9 (50.0)	
Time of IM use (months)^a	59.5 (53.7-72.0)	60.5 (52.1-75.3)	0.901
^a Values are means (CI 95%) and ^b Data are absolute frequencies (relative frequencies). t Student test was used for comparing the means of wild-type and mutated groups. Wild-Type:1236CC/3435CC/2677GG Mutated: 1236CT/3435CT/2677GT + 1236TT/3435TT/2677TT			

Table II: Association between P-gp activity, ABCB1 and SLC22A1 mRNA expression, P-gp expression and IM plasma levels in individuals with or without MMR and CMR.

	MMR		P value ^a	CMR		P value ^a
	Yes N=24	No N=4		Yes N=5	No N=23	
P-gp Activity	45.7 (32.7-57.2)	64.7 (47.5-73.2)	0.001	45.1 (29.1-59.3)	46.0 (31.3-62.8)	0.890
ABCB1 mRNA	5.31 (3.31-9.47)	8.41 (4.41-9.27)	0.205	8.33 (3.20-10.10)	6.41 (2.11-9.12)	0.447
P-gp Expression	6.0 (3.0-7.6)	6.4 (2.3-8.1)	0.989	6.6 (3.0-8.6)	5.7 (2.3-9.0)	0.713
SLC22A1 mRNA	0.95 (0.68-1.59)	0.54 (0.43-0.82)	0.042	1.80 (1.40-2.90)	0.81 (0.40-1.10)	0.001
IM Plasma Levels	1.42 (1.11-2.12)	0.51 (0.27-1.01)	0.001	1.56 (1.25-1.73)	1.28 (0.85-2.30)	0.753

Values are median (median P25-P75). ^a Mann-Whitney test.

MMR = number of BCR-ABL1 < 0.1 and CMR = number of BCR-ABL1 < 0.0032. mRNA expression values were multiplied by 1000 for better representation. P-gp expression is shown in mean fluorescence intensity ratio (MFIR). IM Plasma Levels = $\mu\text{g/mL}$

Figure I: Effect of *ABCB1* haplotypes in P-gp activity. P-gp activity was measured as percentage of Rh123 efflux. The medians were compared by Mann-Whitney test.

Wild-type: 1236CC/3435CC/2677GG

Mutated: 1236CT/3435CT/2677GT + 1236TT/3435TT/2677TT

Figure II: (A) IM plasma levels (B) ABCB1 mRNA expression and (C) P-gp expression between wild-type and mutated groups. The medians were compared by Mann-Whitney test. MFIR= *Mean fluorescence intensity ratio*.