**Ministério da Saúde**
**Instituto Nacional de Câncer**
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**Flavia da Cunha Vasconcelos**

# ANÁLISE DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS MOLÉCULAS DE INFLUXO E DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

**Orientadora:** Profa. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia

**RIO DE JANEIRO**

***2012***

**Ministério da Saúde**
**Instituto Nacional de Câncer**
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**
**Pós-Graduação em Oncologia**

**Flavia da Cunha Vasconcelos**

# ANÁLISE DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS MOLÉCULAS DE INFLUXO E DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia

**RIO DE JANEIRO**

**2012**

**Ministério da Saúde**
**Instituto Nacional de Câncer**
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**
**Pós-Graduação em Oncologia**

**Flavia da Cunha Vasconcelos**

# ANÁLISE DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS MOLÉCULAS DE INFLUXO E DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Raquel Ciuvalschi Maia**

**Aprovada em: _____/_____/_____**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Carlos Gil Ferreira
**Prof. Dr.** Etel Rodrigues Pereira Gimba
**Prof. Dr.** Maria Isabel Doria Rossi
**Prof. Dr.** Morgana Teixeira Lima Castelo Branco
**Prof. Dr.** João Paulo de Biaso Viola - Suplente I
**Prof. Dr.** Álvaro Luiz Bertho dos Santos - Suplente II

**RIO DE JANEIRO**

**2012**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular do Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular – Instituto Nacional de Câncer, sob a orientação da Doutora Raquel Ciuvalschi Maia. Contou com o apoio financeiro da Coordenação Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ/APQ-1, FAPERJ-PensaRio), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Swissbridge, Programa de Oncobiologia (Fundação do Câncer/UFRJ), Fundação do Câncer e Ministério da Saúde/INCA.

***À coragem, à persistência, à amizade.***

## AGRADECIMENTOS

***Devo começar advertindo que assumo total responsabilidade pelos agradecimentos eximindo minha orientadora de qualquer dolo.***

Portanto, devo começar agradecendo a ela, Raquel C. Maia (não posso revelar o apelido!), por ter acreditado no meu potencial há 17 anos quando eu era aluna de iniciação científica. Por ter me contratado como bióloga. Por ter me visto como pesquisadora e não como técnica de laboratório o que possibilitou minha participação ativa em vários trabalhos científicos que culminaram em publicações. Finalmente agradeço pelo investimento no meu crescimento como pesquisadora me liberando para fazer doutorado. Agradeço por tudo isto e inclusive por tentar até hoje me ensinar bons modos (hihi).

Ao meu marido, Roberto Ferreira (Bhetto) por ter ficado literalmente ao meu lado desde a época da faculdade. Sempre quietinho para que eu pudesse estudar. Apoio incondicional. Obrigada pelos filhos lindos que ganhei literalmente sem esforço.

Meus filhos Rodrigo Brum Ferreira (Digo) e Renato Brum Ferreira (Enatu) que nunca deram trabalho. Sempre adorei leva-los (e sei que vocês também gostavam de ir) ao laboratório nos fins de semana. Eu trabalhando e vocês brincando nos computadores ou então com luvas e canetinhas. Amo muito vocês que são meus MoleKes até hoje, não importa o quanto cresçam.

Luiz Felipe Rosa Silva (Filiipi; Pretus; Mão Preta) sem você não teria feito meu doutorado! Sem exageros agora. Foi o único da nova geração que ajudou na rotina do lab mesmo sem ser STAFF. Nunca se queixou de nada, sempre me ajudou em meus experimentos, foi amigo, foi leal. Meu biólogo predileto! Você vai fazer falta no laboratório.

Galerinha verdadeiramente Hematolouca: Anderson Brito de Azevedo Silva (Andissu), Karina Lani Sila (Kolynah), José Gustavo Oliveira Pugliese (Guguzinhu, Gus, BB), Diogo Gomes Luque (Diguinho, Diogro), Ana Carolina dos Santos Ferreira (AnaC, Coisa Mais Feia!), Déborah Vidal Vasconcellos (Debs), Gisele Pinto de Faria (Gis; Gi; Giselle Pintchen). Vocês foram muito importantes. Estagiaram no lab em uma época em que não havia remuneração, não havia idas a congressos, artigos publicados e mesmo assim vocês se dedicavam ao trabalho. Galerinha como vocês não existe mais. E quando entrava amostra de paciente às 16h de sexta-feira e estávamos doidos pra tomar chop no Vieira? Mutirão para processar a amostra do paciente! Todos viraram amigos: amo vocês.

Arthur Mota Damasceno (Fala, Gatinho!) e Flavia Abdalla Gavinho Viana (Mulé, Bidaia) casal mais surreal que eu conheço. Pena que não posso colocar muitos detalhes... Dois Hematoloucos com certeza.

Ana Cristina Costa Moura (Nhenhé, Mão Preta) começou limpando o chão do laboratório. Foi promovida a auxiliar de laboratório. Lavava a vidraria sempre cantando. Conhecia a todos no hospital e conseguia favores com todo mundo. Então, resolveu sair e fazer fortuna. Nhenhé seu *cofeenaire* (café em inglês????) e sua alegria fazem falta!

Alex Machado (Lorinho; Pai do Biel e do Thiago; Marido da Lorinha) nunca foi do lab, mas é o "agregado dos Hematoloucos" mais participativo. Sempre pronto para uma farra, consertar um computador ou dar um *arm lock*.

Jolie Kiemlian Kwee obrigada por todo o suporte no laboratório e fora dele todos esses anos. A maior incentivadora para minha entrada no doutorado.

Paloma da Silva Souza (Chatoma; RRRRRR), se não perdi um seminário do Programa de Pós Graduação o mérito é dela (hahaha). Obrigada por todo o incentivo e a torcida. Sempre tramando coisas boas pra mim...

Gabriela Nestal de Moraes (Gabi, Gabicina) a única que me enteeende! Você é a Wendy que traz meu lado Peter Pan de volta da Terra do Nunca! Minha mentora de Western blotting.

Gabi e Paloma, obrigada por não terem desistido de mim mesmo quando me afastei de todos. Vocês foram muito importantes. Obrigada pela força.

Alex Xu (Xuxu, PisucoSuco, marido da Gabi) e André Souza Cruz (BB, marido da Paloma), meus companheiros de caronas, que me emprestam sofás... Obrigada por compartilharem suas esposas comigo.

Débora Lima Pereira (Dimenó, Insuportanti) porção concentrada de mau humor mais adorável deste mundo. Faz-me falta irritar-te.

Roberta Faccion (Rob01; Zero1; mãe da Boo) você é minha Nerd favorita, exceto quando faz "dilema"!

Galerinha New Generation do lab: Carolina Castro (Cadol, Bicudinha, Maluca), Marcela Robaina (Súria), Paula Sabbo (Miguxaaaaa), Viviane Arruda (Surita), Fernanda Costas (Fê de Costas). Vocês são cômicas.

Claudete Klumb, pela opinião crítica e por fazer tantas vezes o papel de advogada do Diabo.

Marcos Antonio Maurício Scheiner por ter assumido minhas funções burocráticas no *lab* principalmente nos momentos finais da tese.

Ao colaborador Robert W. Robey (*Molecular Therapeutics Section, Center for Cancer Research, National Cancer Institute)* pelo fornecimento dos reagentes e da linhagem celular que foram utilizados para a análise da atividade da proteína BCRP.

Ao colaborador Andre Luiz Mencalha (Liiin-doooo) obrigada por tornar o mundo do RNA menos chato!

Patrícia Esses (Patty) a secretária mais eficiente do mundo. Obrigada por todo empenho na realização de suas tarefas.

Luís Ramos, Luís Reis e Dona Rita do Almoxarifado; Jean da Engenharia Clínica (meu amor), Júlio dos gases (*in memoriam*), Luís Antonio da manutenção. Obrigada por exercerem suas funções tão bem e manterem o lab funcionando só por mim !!!!

Tamara Mitchell (Tamala), enfermeira da Hematologia pediátrica do INCA, sempre bem humorada e lembrando-se de enviar amostras para o laboratório das MeDeRetes.

Arthur Moellman, médico do Serviço de Hematologia, obrigada pelo envio de amostras para a realização desta tese.

Ramza Cabral Harab (Hamster) aquela que me iniciou no mundo da citometria quando eu era aluna de iniciação científica, minha mentora. Muitos chops até hoje discutindo sobre o poder desta maravilhosa ferramenta.

À grande amiga Virginia Pires (Irmã de Cachinhos) e ao Claudio Vieira da Silva (Dinho, Tio) pelos ensinamentos de cultura de células no início da minha jornada.

Família! Família! Sônia Rosa da Cunha (Tia Sonia, Madrinha) que me deu pêssego em calda em um cinzeiro! Financiou o início da minha Faculdade particular e que fica toda boba quando fala que vou ser a primeira da família a ter doutorado. Ela e minha mãe (Luci da Cunha Vasconcelos) são meus modelos de caráter. Ser o que se é independente dos outros ou das circunstâncias.

Meus irmãos, Adriana da Cunha Vasconcelos de Carvalho (Dria; Coelhão; Cabeção), Flavio do Amaral Vasconcelos Filho (Fafim; Cabeção). Obrigada por toda a paciência e compreensão nos momentos de mau humor e, principalmente, obrigada pelos sobrinhos. Todos lindos e muito amados.

Paulo Sérgio do Amaral Vasconcellos, irmão não tão presente, mais ainda irmão. Também me deu sobrinhos.

Alessandra Quelho (Danda, Mais Linda), minha amiga desde a quinta série do primeiro grau (ainda existe isto?!). Com você sou criança. Com você tenho histórias. Você faz parte da minha vida. Amo muito tudo isso. Obrigada pelas meninas lindas: a Nerd e a Espoleta.

Lucas Viana Martins, Vinícius, Bruno e Nicolas Peregrino. Pacientes do INCA. Com exceção do Bruno a leucemia levou a todos. Lucas que adorava dinossauros e sempre me pedia para comprar coxinhas. Vinícius extremamente mal humorado quando alguém o acordava, mas que sempre sorria quando eu dizia que ia fazer uma faixa com os

dizeres “não perturbe!” Bruno e eu sempre brincávamos “eu fico com a maior parte do biscoito e você fica com esse pedacinho minúsculo”. Nicolas brincava com a mãe de fazer punção de medula óssea e tinha a careca mais macia do universo inteiro! Crianças maravilhosas que tocaram meu coração de uma forma inesquecível.

Douglas Fabiano Rosa Rodrigues (Doug). Não fiz mestrado, mas fiz doutorado. Isso vale né?! Pelo nosso acordo você terá que escrever sua monografia. Quando eu for, levo umas folhas pra você...

A todos aqueles que não puderam assistir ao meu triunfo, em especial meu pai (Flavio do Amaral Vasconcelos).

“ A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original. ”

***Albert Einstein***

# RESUMO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é caracterizada pela presença da translocação t(9:22) que codifica a proteína quimérica oncogênica BCR-ABL. Imatinibe é uma droga alvo-específica que inibe a atividade tirosina quinase (TK) da proteína BCR-ABL. Entretanto, os níveis intracelulares do imatinibe podem ser alterados pelas proteínas transportadoras de efluxo de drogas: glicoproteína P (Pgp), proteína da resistência em câncer de mama (BCRP) e proteína relacionada à resistência à múltiplas drogas (MRP1), assim como a proteína transportadora de influxo de drogas (OCT1). O objetivo do presente estudo foi analisar a participação dessas proteínas, isoladamente ou em associação, na resistência ao imatinibe em linhagens celulares e células de pacientes com LMC. Para análise da atividade das proteínas transportadoras de efluxo, foi utilizado o fluorocromo rodamina-123 associado ao modulador ciclosporina-A (Rho+CSA) e o *pheophorbide A* associado ao *fumitremorgin* C (PhA+FTC), ambos através de citometria de fluxo. A análise dos RNAm dos genes *ABCB1*, *ABCG2 e SLC22A1* que codificam as proteínas Pgp, BCRP e OCT1, respectivamente, foi realizada por PCR em tempo real. A inibição da TK BCR-ABL foi mensurada através dos níveis de fosforilação de CrkL (pCrkL), seu principal alvo de ativação. Observamos uma maior positividade para o ensaio Rho+CSA nas amostras que expressavam Pgp comparada com as que expressavam MRP1, sugerindo menor atividade dessa proteína em pacientes com LMC, ou ainda que tal ensaio possa ser menos específico para a atividade da MRP1. O ensaio PhA+FTC foi capaz de identificar a atividade da proteína BCRP em linhagens celulares e células de pacientes. Níveis reduzidos dos RNAm *ABCB1* e *SLC22A1*, mas não do RNAm *ABCG2*, foram observados quando comparados com as amostras de indivíduos saudáveis. Não houve correlação entre os níveis da proteína Pgp e do RNAm *ABCB1*. A expressão de Pgp foi detectada na maioria das amostras de LMC, independente da fase da doença, e não foi associada com o prognóstico desfavorável. Variações nos níveis de expressão da Pgp foram observadas durante a evolução da LMC e relacionadas com o tratamento prévio. O imatinibe foi capaz de aumentar a expressão da Pgp, assim como os níveis do RNAm *ABCB1* na linhagem K562-Lucena 1, Pgp+. Além disso, observamos uma maior redução de pCrkL e um maior percentual de morte celular nas células K562, Pgp-, quando comparadas à K562-Lucena 1, evidenciando um possível papel do imatinibe como substrato para a Pgp. Este fármaco também demonstrou ter potencial para funcionar como agente modulador da bomba de efluxo, uma vez que impediu o exporte de Rho das células K562-Lucena 1. Amostras de pacientes resistentes ao imatinibe exibiram altos níveis de atividade das proteínas transportadoras de efluxo de drogas (ensaio Rho+CSA). Nossos dados mostram que a atividade e/ou expressão dos transportadores de efluxo e influxo de drogas encontram-se alterados na maioria dos pacientes com LMC, porém não há correlação com a resposta ao imatinibe e o prognóstico na LMC. Entretanto, o conjunto dos resultados sugere um papel para a Pgp na resistência *in vitro* ao imatinibe.

**Palavras-chave**: leucemia mieloide crônica, glicoproteína P, MRP1, BCRP, OCT1, imatinibe, CrkL.

## ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the presence of the t(9:22) encoding the BCR-ABL chimeric oncogenic protein. Imatinib is a target specific drug that inhibits the activity of the tyrosine kinase (TK) protein BCR-ABL. However, imatinib intracellular concentration may be altered by transporter proteins. It was described that efflux proteins, P-glycoprotein (Pgp), breast cancer resistance protein (BCRP) and multidrug resistance related protein (MRP1), and the influx protein, the organic cation transporter protein (OCT1) may contribute for imatinib clinical resistance. The aim of this study was to evaluate the role of these proteins in imatinib resistance in cell lines and leukemic cells from CML patients. To analyze the activity of the efflux transporter proteins, fluorochrome rhodamine-123 associated with the modulator cyclosporin A (Rho+CSA) and pheophorbide A associated with fumitremorgin C (PhA+FTC) were used by flow cytometry. Analysis of *ABCG1*, *ABCG2* and *SLC22A1* genes, that encode the Pgp, BCRP and OCT1 proteins, respectively, was performed by real time PCR. The inhibition of BCR-ABL TK was measured by the levels of CrkL phosphorylation (pCrkL), its main target of activation. We observed a higher positivity for Rho+CSA assay in samples expressing Pgp, when compared with the ones expressing MRP1. These results suggest that patients with CML have lower activity of this protein, or this assay might be less specific to indicate the activity of MRP1. The PhA+FTC assay was able to identify BCRP activity in cell lines and cells from patients. Reduced levels of *ABCB1* and *SLC22A1*, but not *ABCG2* mRNA were observed when compared with samples from healthy individuals. There was no correlation between the levels of Pgp protein and *ABCB1* mRNA. Pgp expression was detected in most samples of CML, regardless of disease stage and was not associated with poor prognosis. Changes in Pgp expression levels have been observed during the development of CML and were related to pretreatment. Imatinib was able to increase Pgp expression as well as *ABCB1* mRNA levels in Pgp+ K562-Lucena 1 cells. Moreover, we observed a greater pCrkL reduction and a higher percentage of cell death in Pgp- K562 cells compared to K562-Lucena 1, indicating a possible role of imatinib as a Pgp substrate. This drug has also been shown to have potential as an efflux pump modulating agent, once efflux of Rho was prevented in K562-Lucena 1. Imatinib resistant patient samples exhibited high levels of efflux transporter proteins activity (Rho+CSA assay). Our data show that the activity and / or expression of influx and efflux transporters of drugs are altered in most patients with CML, but no correlation with prognosis and response to imatinib in CML was observed. However, our results suggest a role for Pgp in imatinib resistance.

**Keywords**: chronic myeloid leukemia, P-glycoprotein, MRP1, BCRP, OCT1, imatinibe, CrkL.

# LISTA DE ABREVIAÇÃOES

| | |
|---|---|
| ABC | família *ATP binding cassette* |
| *ABCG2* | gene que codifica a proteína BCRP |
| Abl | vírus da leucemia murina Abelson |
| ARA | arabinosídeo C |
| Bcr | *breakpoint cluster region* |
| *BCR-ABL* | translocação entre os genes *BCR* e *ABL* |
| BCR-ABL | proteína quimérica resultante da t(9:22) |
| BCRP | proteína da resistência em câncer de mama |
| Cbl | Casitas B-lineage lymphoma |
| Crk | CT10 regulator of a tyrosine kinase |
| CrkL | Crk-*like* |
| CSA | ciclosporina A |
| D.O. | densidade ótica |
| DOCK1 | *downstream of Crk* |
| DRM | doença residual mínima |
| EGF | fator de crescimento epidermal |
| ELN | *European LeukemiaNet* |
| FA | fase acelerada |
| FB | fase blástica |
| FC | fase crônica |
| FDA | *Food and Drug Administration* |
| FSC | forward scatter |
| FTC | fumitremorgin C |
| HSC | células tronco hematopoéticas |
| Hy | hidroxiuréia |
| $IC50^{Imatinibe}$ | concentração de IM capaz de inibir em 50% a fosforilação de CrkL |
| IFN-α | interferon alfa recombinante |
| IRIS | *International Randomized Study of Interferon and* STI571 |
| LLA | leucemia linfóide aguda |
| LLC | leucemia linfóide crônica |

| | |
|---|---|
| LMA | leucemia mielóide aguda |
| LMC | leucemia mielóide crônica |
| MDR | resistência a múltiplas drogas |
| MIF | média de intensidade de fluorescência |
| MRP1 | proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas |
| MTX | metotrexate |
| OCT | transportadores de cátions orgânicos |
| p85 | subunidade reguladora da PI3K |
| pCrkL | proteína CrkL fosforilada |
| PDGF | fator de crescimento derivado de plaqueta |
| Pgp | glicoproteína-P |
| Ph | cromossoma Philadelphia |
| PhA | Pheophorbide A |
| qt(s) | quimioterápico(s) |
| RC | Remissão completa |
| RCyC | Resposta citogenética completa |
| RHC | Resposta hematológica completa |
| Rho | Rodamina-123 |
| RIF | Razão entre intensidades de fluorescências |
| RMM | Resposta molecular *major* |
| SBF | Soro bovino fetal |
| SDS | dodecil sulfato de sódio |
| SH2 e SH3 | domínio homólogo ao Src 2 e 3 |
| SH3C | domínio SH3 C terminal |
| SLC | carreadores de soluto |
| *SLC22A1* | gene que codifica a proteína OCT1 |
| SOS1 | *son of sevenless homolog* 1 |
| SSC | Side scatter |
| TK | Tirosina quinase |
| TMO | transplante de medula óssea |
| VCR | Vincristina |

## LISTA DE FIGURAS página


| | | |
|---|---|---|
| Figura 1. | Cromossomo Philadelphia (Ph) - resultado da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (t(9:22)). | 3 |
| Figura 2. | Mecanismos implicados na patogênese da LMC . | 5 |
| Figura 3. | Estrutura e função da proteína CrkL. | 9 |
| Figura 4. | Evolução do tratamento da leucemia mielóide crônica. | 12 |
| Figura 5. | Alguns fatores que podem contribuir para a resistência clínica ao Mesilato de Imatinibe (IM). | 18 |
| Figura 6. | Fluxograma ilustrando o desenho experimental do estudo. | 42 |
| Figura 7. | Demonstração da atividade da proteína transportadora de efluxo glicoproteína P (Pgp). | 46 |
| Figura 8. | Demonstração da atividade da proteína transportadora de efluxo proteína da resistência no câncer de mama (BCRP). | 47 |
| Figura 9. | Expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp nas linhagens tumorais K562, K562-Lucena 1 e MCF7/FLV500. | 48 |
| Figura 10. | Atividade funcional dos transportadores de efluxo e expressão da proteína Pgp em amostras de indivíduos saudáveis. | 49 |
| Figura 11. | Frequência de positividade nos ensaios para a detecção da atividade e da expressão de transportadores de efluxo nas diferentes fases dos pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC). | 55 |
| Figura 12. | Frequência de diferentes características do fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) em pacientes com LMC. | 57 |
| Figura 13. | Frequência da expressão das proteínas e da atividade MDR de acordo com o escore de Sokal. | 58 |
| Figura 14. | Atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP em leucócitos de pacientes e de indivíduos saudáveis. | 64 |

| | | |
|---|---|---|
| Figura 15. | Análise da correlação entre a atividade dos transportadores de efluxo, detectada pelo ensaio PhA+FTC, e a idade dos pacientes em amostras de leucemia mielóide crônica. | 65 |
| Figura 16. | Atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP em amostras de pacientes previamente tratados e não tratados. | 67 |
| Figura 17. | Análise da correlação entre a expressão dos transportadores de efluxo Pgp e MRP1 com o ensaio PhA+FTC em amostras de pacientes. | 68 |
| Figura 18. | Frequência de positividade nos ensaios que avaliam a atividade dos transportadores de efluxo. | 70 |
| Figura 19. | Quantificação relativa do RNA mensageiro *ABCB1* em amostras de pacientes leucêmicos e em amostras de indivíduos saudáveis. | 77 |
| Figura 20. | Quantificação das alterações do RNA mensageiro (RNAm) *ABCB1* em amostras de pacientes. | 78 |
| Figura 21. | Quantificação relativa de RNA mensageiro do gene *ABCG2* em amostras de pacientes e em indivíduos saudáveis. | 80 |
| Figura 22. | Quantificação das alterações do RNA mensageiro (RNAm) *ABCG2* em amostras de pacientes. | 81 |
| Figura 23. | Quantificação relativa de RNA mensageiro do gene *SLC22A1* em amostras de pacientes e em indivíduos saudáveis. | 82 |
| Figura 24. | Quantificação das alterações do RNA mensageiro (RNAm) *SLC22A1* em amostras de pacientes. | 83 |
| Figura 25. | Modulação da expressão do RNA mensageiro da proteína transportadora de efluxo Pgp em linhagens celulares. | 93 |
| Figura 26. | Modulação da expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp em linhagens celulares. | 94 |
| Figura 27. | Imatinibe como agente modulador. | 95 |
| Figura 28. | Morte celular induzida pelo imatinibe avaliada nas linhagens K562 e K562-Lucena 1. | 97 |

Figura 29. Atividade da proteína tirosina quinase BCR-ABL através da redução dos níveis da proteína CrkL na forma fosforilada (pCrkL). 100

Figura 30. Pacientes resistentes e sensíveis ao imatinibe in vitro, comparados à indivíduos saudáveis quanto aos níveis de atividade e de expressão dos transportadores de efluxo. 108

## LISTA DE TABELAS página


Tabela 1. Definição dos tipos de resposta ao tratamento com Imatinibe e períodos em que devem ser avaliados. 16

Tabela 2. Análise dos dados obtidos em citometria de fluxo. 37

Tabela 3. Características demográficas e clínicas dos pacientes com leucemia mielóide crônica analisados para a expressão de glicoproteína P (Pgp) e da proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas (MRP1). 51

Tabela 4. Níveis da atividade e da expressão das proteínas transportadoras de efluxo segundo as fases da leucemia mielóide crônica. 53

Tabela 5. Expressão da proteína glicoproteína P de acordo com a evolução clínica dos pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC). 60

Tabela 6. Características demográficas e clínicas dos pacientes com leucemia mielóide crônica analisados quanto à atividade da BCRP. 62

Tabela 7. Atividade da BCRP segundo as fases da LMC e a origem do material coletado dos pacientes. 65

Tabela 8. Atividade dos transportadores de efluxo, detectada pelo ensaio PhA+FTC, e o índice de Sokal em amostras de pacientes com LMC. 66

Tabela 9. Associação entre as proteínas transportadoras de efluxo e a positividade no ensaio PhA+FTC em amostras de pacientes com LMC. 69

Tabela 10. Atividade dos transportadores de efluxo Pgp e BCRP em amostras de pacientes com LMC. 71

Tabela 11. Características clínicas, atividade das proteínas transportadoras de efluxo e análise da resposta molecular após tratamento clínico com imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica 73

Tabela 12. Características demográficas e clínicas dos pacientes com LMC, analisadas quanto à expressão dos transcritos dos genes *ABCB1*, *ABCG2* e *SLC22A1* 76

Tabela 13. Transcritos do gene *ABCB1* em amostras de pacientes com LMC. 77

Tabela 14. Correlação entre os níveis proteicos e de transcritos de *ABCB1* em amostras de pacientes com LMC. 79

Tabela 15. Níveis de RNA mensageiro *ABCG2* em amostras de pacientes. 80

Tabela 16. Níveis de RNA mensageiro *SLC22A1* em amostras de pacientes. 82

Tabela 17. Fases da leucemia mielóide crônica e os níveis do RNAm *ABCB1*. 84

Tabela 18. Índice de Sokal e os níveis de *ABCB1* em amostras de pacientes com leucemia mielóide crônica. 85

Tabela 19. Fases da leucemia mielóide crônica e os níveis de *ABCG2*. 85

Tabela 20. Análise do índice de Sokal e dos níveis de *ABCG2* em amostras de pacientes com leucemia mielóide crônica. 86

Tabela 21. Fases da leucemia mielóide crônica e os níveis do RNAm *SLC22A1*. 87

Tabela 22. Índice de Sokal e os níveis de RNAm *SLC22A1* em amostras de pacientes com leucemia mielóide crônica. 88

Tabela 23. Resposta ao tratamento com imatinibe e os níveis de RNA mensageiro dos transportadores de efluxo e influxo em pacientes com LMC. 90

Tabela 24. Concentração de imatinibe necessária para induzir 50% de morte nas células das linhagens K562 e K562-Lucena 1. 98

Tabela 25. Pacientes sensíveis, in vitro, à inibição da atividade tirosina quinase da proteína BCR-ABL pelo imatinibe e a relação com o perfil de resistência a múltiplas drogas. 102

Tabela 26. Pacientes resistentes, in vitro, à inibição da atividade tirosina quinase da proteína BCR-ABL pelo imatinibe e a relação com o perfil de resistência a múltiplas drogas e com a resposta ao tratamento clínico com o imatinibe. 104

Tabela 27. Resposta ao tratamento com 0,1 µM de imatinibe e a frequência de positividade nos ensaios de atividade e expressão dos transportadores de efluxo em amostras de pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC). 106

Tabela 28. Efeito in vitro e in vivo do imatinibe em pacientes com diferentes características clínicas. 110

# SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 1
1.1 Leucemia mielóide crônica (LMC) 1
1.1.1 Aspectos epidemiológicos da leucemia mielóide crônica 1
1.1.2 Características moleculares 1
1.1.3 Características clínicas da LMC 5
1.2 Fatores prognósticos na LMC 6
1.2.1 Índice de Sokal 6
1.3 Tratamento 11
1.3.1 Avaliação da resposta ao tratamento com imatinibe 15
1.3.2 Resposta hematológica e citogenética 15
1.3.3 Resposta molecular 16
1.4 Mecanismos de Resistência ao tratamento na Leucemia Mielóide Crônica 16
1.4.1 Mutação do gene *BCR-ABL* 18
1.4.2 Proteínas transportadoras de drogas 19
1.4.3 Proteínas transportadoras de efluxo de drogas 20
1.4.4 Transportadores de influxo de drogas 24
1.4.5 Transportadores de influxo de drogas na LMC 25
2 **OBJETIVOS** 29
2.1 Objetivo geral 29
2.2 Objetivos específicos: 29
3. **METODOLOGIA** 31
3.1 Pacientes 31
3.2 Amostras de células dos pacientes e de indivíduos saudáveis 31
3.3 Linhagens celulares 32
3.4 Determinação da atividade dos transportadores de efluxo: ensaio Rho+CSA 33
3.5 Determinação da atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP: ensaio PhA+FTC 34
3.6 Avaliação da expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp 34
3.7 Avaliação da expressão da proteína de efluxo MRP1 35
3.8 Tratamento *in vitro* de linhagens celulares com imatinibe 35
3.9 Avaliação da morte celular 35
3.10 Citometria de fluxo 36
3.11 Immunoblotting 37
3.12 Extração de RNA pelo Método TRIzol e Síntese de cDNA 39
3.13 PCR em Tempo Real 40

3.14 Análises estatísticas 41
3.15 Desenho experimental do estudo 42
4. **RESULTADOS** 44
4.1 **PARTE I** 46
4.1.1 Atividade e expressão dos transportadores de efluxo em linhagens tumorais 46
4.1.1.1 Atividade dos transportadores de efluxo através do ensaio Rho+CSA em linhagens tumorais 46
4.1.1.1 Atividade dos transportadores de efluxo através do ensaio Rho+CSA em linhagens tumorais 46
4.1.1.2 Atividade dos transportadores de efluxo através do ensaio PhA+FTC em linhagens tumorais 47
4.1.1.3 Expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp em linhagens tumorais 47
4.1.2 Proteínas transportadoras de efluxo em amostras de indivíduos saudáveis 48
4.1.2.1 Atividade dos transportadores de efluxo através dos ensaios Rho+CSA e PhA+FTC em amostras de indivíduos saudáveis 48
4.1.2.1 Atividade dos transportadores de efluxo através dos ensaios Rho+CSA e PhA+FTC em amostras de indivíduos saudáveis 48
4.2 **PARTE II** 50
4.2.1 Expressão e atividade das proteínas transportadoras de efluxo Pgp e MRP1 em amostras de pacientes com LMC 50
4.2.1.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes com LMC 50
4.2.2 Expressão das proteínas Pgp e MRP1 em amostras de pacientes com LMC 51
4.2.3 Expressão das proteínas Pgp e MRP1 de acordo com as fases da LMC 52
4.2.4 Atividade dos transportadores de efluxo analisada através do ensaio Rho+CSA em amostras de pacientes com LMC 53
4.2.5 Associações entre a expressão das proteínas Pgp e MRP1 e o ensaio Rho+CSA 54
4.2.6 Expressão das proteínas Pgp e MRP1 de acordo com o índice prognóstico de Sokal 56
4.2.7 Variação dos níveis da expressão da Pgp e da MRP1 de acordo com as fases da LMC e com o tratamento prévio 56
4.3 **PARTE III** 61
4.3.1 Atividade dos transportadores de efluxo analisada através do ensaio PhA+FTC em amostras de pacientes com LMC 61
4.3.1 Atividade dos transportadores de efluxo analisada através do ensaio PhA+FTC em amostras de pacientes com LMC 61
4.3.2 Características clínicas e demográficas dos pacientes com LMC analisados para a 61

atividade da BCRP
4.3.3 Atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP 63
4.3.4 Correlação entre o ensaio PhA+FTC e as proteínas transportadoras de efluxo Pgp e MRP1 67
4.3.5 Atividade dos transportadores de efluxo pelos ensaios PhA+FTC e Rho+CSA em amostras de pacientes com LMC 70
4.3.6 Associação entre a atividade detectada pelo ensaio PhA+FTC e a resposta molecular ao tratamento clínico com imatinibe 71

4.4 **PARTE IV** 74
4.4.1.1 Níveis dos transcritos dos genes *ABCB1*, *ABCG2* e *SLC22A1* em amostras de pacientes com LMC 74
4.4.1.2 Características demográficas e clínicas dos pacientes com LMC 74
4.4.1.3 Níveis dos transcritos do gene *ABCB1* que codifica a proteína Pgp 75
4.4.1.4 Correlação entre os níveis do RNAm *ABCB1* e da proteína Pgp 78
4.4.1.4 Níveis dos transcritos do gene *ABCG2* 79
4.4.1.5 Níveis dos transcritos do gene *SLC22A1* 81
4.4.2 Correlação entre os genes *ABCB1, ABCG2* e *SLC22A1* e os dados clínicos e demográficos dos pacientes com LMC 83
4.4.2.1 Gene *ABCB1* e os dados clínicos e demográficos 83
4.4.2.2 Gene *ABCG2* e os dados clínicos dos pacientes com LMC 85
4.4.2.3 Gene *SLC22A1* e os dados clínicos 87
4.4.2.4 *ABCB1, ABCG2* e *SLC22A1, e a r*esposta ao tratamento com imatinibe 88

4.5 **PARTE V** 92
4.5.1 Alterações na expressão e na atividade do transportador de efluxo Pgp promovidas pelo imatinibe 92
4.5.2 Alteração nos níveis de *ABCB1* RNAm e da Pgp mediante o tratamento com imatinibe nas linhagens celulares K562 e K562-Lucena 1 92
4.5.3 Modulação da extrusão da rodamina 123 pelo imatinibe 94
4.5.4 Morte celular induzida pelo imatinibe em linhagens celulares 95

4.6 **PARTE VI.** 99
4.6.1 Inibição da atividade tirosina quinase da proteína BCR-ABL frente o tratamento com imatinibe 99
4.6.1.1 Inibição da atividade da proteína BCR-ABL em linhagens leucêmicas 99
4.6.1.2 Inibição da atividade da proteína BCR-ABL em amostras de pacientes 101
4.6.1.3 A inibição da atividade da proteína BCR-ABL e os transportadores de efluxo em 105

amostras de pacientes
4.6.1.4 Correlação entre a inibição da atividade da proteína BCR-ABL e os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com LMC 109

V **DISCUSSÃO** 112
5.1 Atividade e expressão proteica dos transportadores de efluxo Pgp, MRP1 e BCRP em amostras de pacientes com LMC 112
5.2 Níveis dos RNAm dos transportadores de efluxo (*ABCB1* e *ABCG2*) e influxo (*SLC22A1*) em amostras de pacientes com LMC 119
5.3 Imatinibe como substrato e modulador da Pgp 124
5.4 Inibição da proteína BCR-ABL pelo imatinibe em células com fenótipo de resistência a múltiplas drogas 126

VI **DISCUSSÃO GERAL** 128

VII. **CONCLUSÕES** 131

VIII. **PERSPECTIVAS** 133

IX. **REFERÊNCIAS** 134

**ANEXO A:** Publicação científica relacionada à tese

**ANEXO B:** Trabalhos científicos, relacionados ao tema da tese, realizados como colaboradora e publicados durante o desenvolvimento deste estudo.

# I. INTRODUÇÃO

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Leucemia mielóide crônica (LMC)

### 1.1.1 Aspectos epidemiológicos da leucemia mielóide crônica

A LMC representa de 7 a 20% dos casos de leucemias (REDAELLI *et al*., 2004). Sua incidência é mais comum entre os 40 e 60 anos, embora possa acometer indivíduos de qualquer idade (LEE *et al*., 2000). Aproximadamente 10% dos novos casos ocorrem em crianças (SAWYERS, 1999).

A incidência da LMC pode variar de 0,6 e 2,0 casos por 100.000 habitantes sendo mais frequente em homens do que mulheres. A razão entre os gêneros é de 1,3 homens para 1,8 mulheres (FADERL *et al*., 1999).

### 1.1.2 Características moleculares

A LMC é uma doença clonal de células hematopoéticas multipotentes com uma anormalidade cromossomial característica.

Em 1960, Nowell e colaboradores descreveram um cromossoma acrocêntrico chamado de Philadelphia (Ph) (NOWELL *et al.*, 1960). Este foi o primeiro exemplo de anormalidade relacionada a uma malignidade específica. Em 1973, Rowley (ROWLEY *et al.*, 1973) determinou que o cromossoma 22 encurtado e chamado de Ph , era o produto de uma translocação entre os cromossomas 9 e 22, t(9:22)(q34;q11) (Figura 1).

Estudos com retrovírus em murinos levaram a identificação de oncogenes, genes que quando mutados poderiam induzir a transformação de células normais em malignas. Posteriormente, foi demonstrado que o oncogene *ABL* (vírus da leucemia murina Abelson), responsável pela leucemia em murinos, normalmente localizado no cromossomo 9, estava translocado para o cromossomo 22 em pacientes com LMC (de KLEIN *et al.*, 1982). Como o ponto de quebra no cromossomo 22 ocorria em uma pequena região ela foi chamada de *BCR* (*breakpoint cluster region*) (GROFFEN *et al.*,

1984). Mais tarde, em 1990, dois grupos de pesquisadores demonstraram que BCR-ABL era suficiente para induzir leucemia em um modelo animal, estabelecendo-o como um oncogene leucêmico (DALEY *et al.*, 1990; HEISTERKAMP *et al.*, 1990).

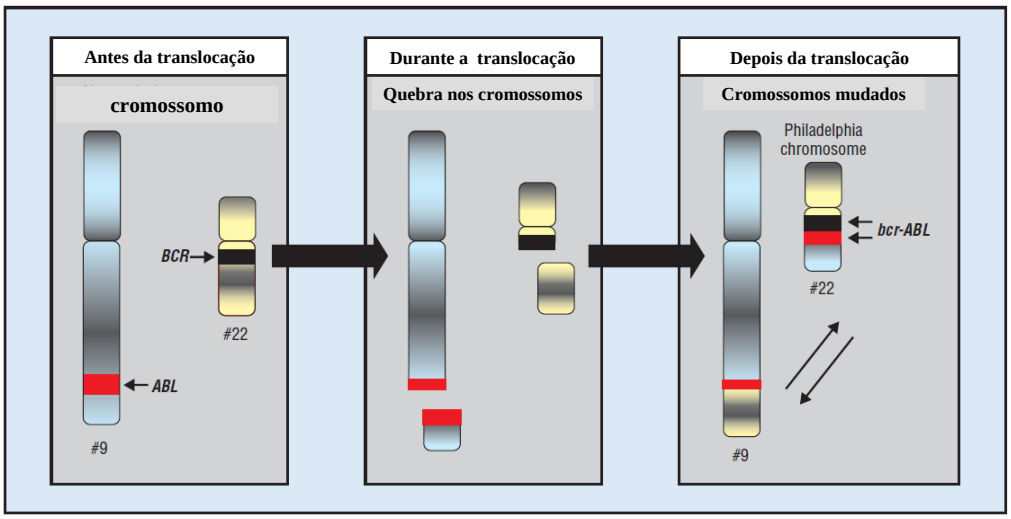



**Figura 1. Cromossomo Philadelphia (Ph) - resultado da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (t(9:22)).** Após a translocação, é formado o cromossomo 9 com o braço mais longo e o cromossomo 22 com o braço mais curto. O cromossomo 22 encurtado é descrito como o cromossomo Ph.

A proteína BCR é uma serina/treonina quinase ativa que regula proteínas envolvidas em diversas vias celulares. O gene *BCR* é considerado um gene supressor de tumor por regular, de forma negativa, genes que promovem a proliferação celular (RESS *et al.*, 2005). O gene *ABL* está presente em células eucarióticas e codifica para uma proteína com atividade tirosina quinase nuclear com um importante papel na regulação da divisão celular e apoptose (COLICELLI, 2010). A proteína quimérica BCR-ABL resultante da fusão entre o gene *BCR* e a região N-terminal do *c-ABL* possui atividade tirosina quinase (TK) mais elevada do que na proteína normal c-ABL, sendo esta atividade responsável pela transformação celular (LUGO *et al.*, 1990).

A atividade enzimática da proteína ABL ($P145^{ABL}$) normal (Figura 2), codificada pelo seu domínio de homologia SRC-1 (SH1), é mantida sob controle rígido, provavelmente pela ligação intramolecular de uma região N-terminal *cap* englobados pelo primeiro exon (1b ou 1a) e a primeira parte do exon a2 (PLUK *et al*., 2002). Na proteína de fusão BCR-ABL ($p210^{BCR-ABL}$; Figura 2), a falta da região *cap* ABL e de um domínio de dimerização codificado pelo primeiro exon do *BCR* são responsáveis pela ativação constitutiva do domínio SH1 ABL, resultando na transdução de sinal anormal. Os vários domínios funcionais da proteína ABL incluem os domínios regulatórios de homologia SRC 3 e 2 domínios (SH3 e SH2, respectivamente), o domínio SH1 com o seu sítio de encaixe de ATP, o motivo de sinal de localização nuclear, o motivo de sinal de exportação nuclear, o domínio de ligação ao DNA e os domínios de ligação à G-actina e F-actina. Os últimos dois são importantes para o controle da organização do citoesqueleto, adesão celular, motilidade celular, e a da transdução de sinal mediada pelo receptor de integrina (LEWIS *et al.*, 1996; SALGIA *et al.*, 1997). A proteína BCR-ABL localiza-se no citoplasma onde não sofre regulação e está próxima e disponível para ativar uma diversidade de sinais de sobrevivência (HAZLEHURST *et al.*, 2009).

Experimentos conduzidos em camundongos demonstraram que a inibição da atividade tirosina quinase, induzida por mutação no sítio de ligação de ATP do ABL, impede o desenvolvimento da leucemia mesmo que a proteína BCR-ABL seja expressa nas células tronco hematopoéticas (ZHANG *et al.*, 1998).

Três mecanismos têm sido implicados na transformação maligna promovida pela proteína BCR-ABL através de sua atividade TK: alteração da adesão às células do estroma e matriz extracelular, sinalização para proliferação constitutivamente ativa com independência de fatores de crescimento e a apoptose reduzida (Figura 2) (GOLDMAN AND MELO, 2003).

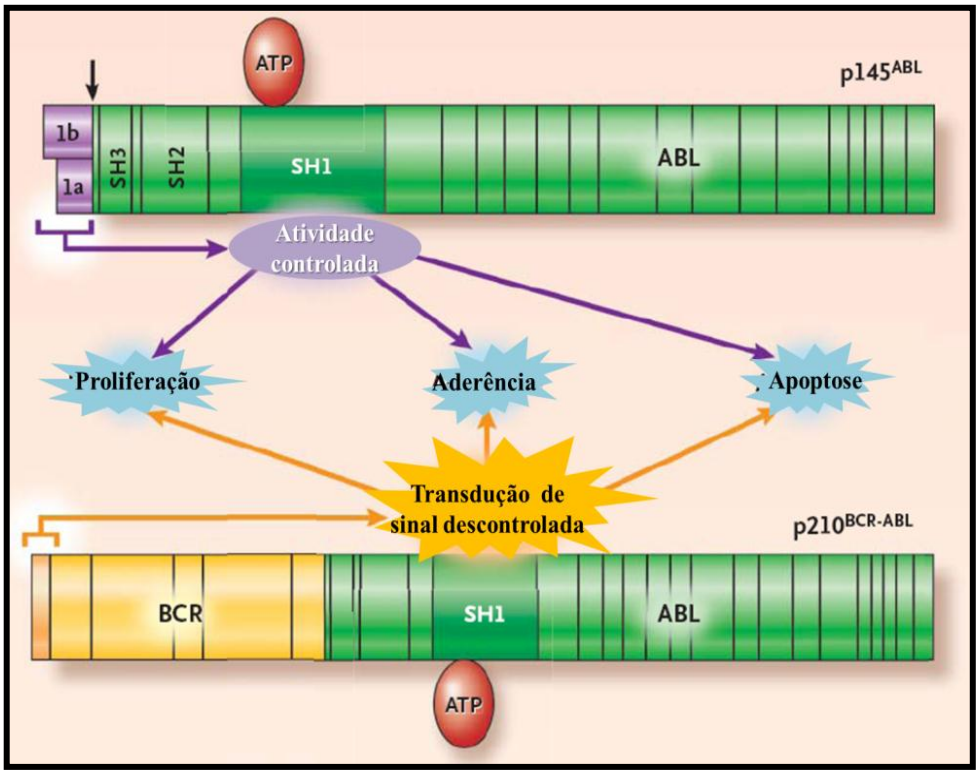



**Figura 2. Mecanismos implicados na patogênese da LMC.** Regulação fisiológica pela proteína ABL normal e desregulação de processos celulares importantes pela BCR-ABL, tais como proliferação, aderência e apoptose (adaptação de GOLDMAN AND MELO, 2003).

### 1.1.3 Características clínicas da LMC

Clinicamente, a LMC caracteriza-se pela fase crônica (FC), a fase acelerada (FA) e a fase blástica (FB). Na FC, onde a maioria dos pacientes é diagnosticada, ocorre expansão de granulócitos maduros e de progenitores mieloides no sangue periférico (SP), medula óssea (MO) e no baço (FRAZER *et al.*, 2007; CLARKSON *et al.*, 2003). Os sintomas mais comuns são fadiga, perda de peso e hepatoesplenomegalia, mas a maioria dos pacientes é assintomática nesta fase. Em geral o único indício de LMC é o número elevado de leucócitos no SP, com predomínio de granulócitos neutrófilos e a presença de granulócitos imaturos como mieloblastos, promieloblastos, mielócitos e metamielócitos (CLARKSON et al., 2003). Na ausência de tratamento ou no

desenvolvimento de resistência ao tratamento, a LMC na FC pode ou não progredir para a FA ou para a FB. Quando isto ocorre, a hematopoiese fica comprometida, havendo uma interrupção na diferenciação celular levando à substituição das células maduras por blastos na MO e no SP (JAGANI *et al*., 2007). As características da FB são anemia, trombocitopenia, esplenomegalina e mais de 20% de blastos no SP ou MO (MELO AND BARNES, 2007). A FB ocorre pela adição de mutações secundárias. Antes do inicio da FB, 75% dos pacientes desenvolvem a FA que é caracterizada pelo aumento do número de basófilos, promielócitos e blastos. A FB dura em média 12 meses. Em 30% dos casos a FB se assemelha à leucemia linfóide aguda (LLA), enquanto em 60% dos casos, ela surge como uma leucemia indiferenciada ou como uma leucemia mielóide aguda (LMA). A média de sobrevida nessa fase é de 3 meses para a FB mielóide e 6 meses para a FB linfóide (FRAZER *et al.*, 2007). A sobrevida curta observada na FB da LMC deve-se a resistência ao tratamento em decorrência das alterações moleculares que acompanham esse evento. Além do cromossoma Ph, várias anormalidades citogenéticas têm sido observadas tais como a translocação t(3;21), mutação em Ras, p53, p16 e Rb (ADVANI AND PENDERGAST *et al.*, 2002).

## 1.2 Tratamento

Até recentemente, o arsenal terapêutico para a LMC era limitado ao transplante de células tronco alogenêico, ao tratamento convencional com Hy e ao interferon alfa recombinante (IFN-α) (Figura 4). Todas essas opções geravam obstáculos com respeito à disponibilidade de doadores, à eficácia terapêutica, à ocorrência de morbidade e à tolerância (SILVER *et al.*, 1999).

O transplante alogenêico é o único tratamento com potencial curativo na LMC, entretanto, esta é uma opção para somente 40% dos pacientes com essa doença (PEGGS & MACKINNON, 2003). Sobrevidas prolongadas podem ser observadas em 50% a

75% dos pacientes com LMC na fase crônica. O transplante alogenêico está relacionado com morbidade e mortalidade significativas, cuja probabilidade de morte relacionada ao transplante varia de 20 a 40% (SILVER *et al.*, 1999).

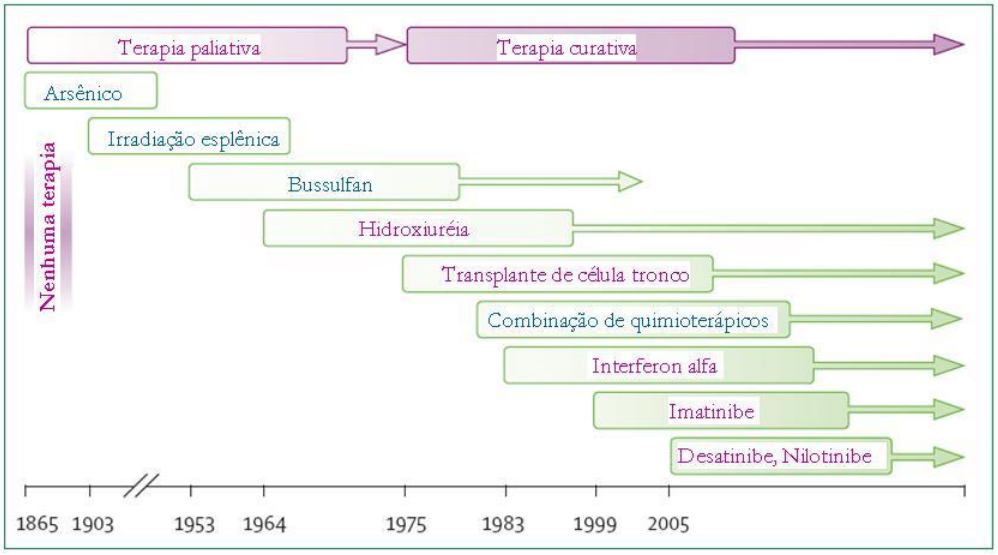



**Figura 4. Evolução do tratamento da leucemia mielóide crônica.** Da terapia paliativa à terapia curativa (figura adaptada de HEHLMANN *et al.*, 2007).

A Hy, um inibidor da ribonucleotidase redutase, não produz remissão citogenética ou retarda o aparecimento da fase acelerada ou da fase blástica. Os seus efeitos na LMC são apenas paliativos (SAWYERS *et al.*, 1999).

O IFN-α pode induzir remissão hematológica e citogenética em pacientes com LMC (TALPAZ *et al.*, 1991). Um estudo que empregou IFN-α em pacientes na fase crônica proporcionou duração média de remissão de 52 meses e média de sobrevida de 66 meses (OZER *et al.*, 1993). Em outro trabalho, verificou-se que 140 de 512 (27%) pacientes tratados com IFN-α alcançaram remissão citogenética completa com média de duração de 10 anos em 44 (31%) pacientes (KANTARJIAN *et al.*, 2003**).**

O maior avanço no tratamento da LMC surgiu com a introdução do mesilato de imatinibe ou STI-571 ou Gleevec®, um agente antineoplásico potente, e inibidor específico da tirosina quinase BCR-ABL (DRUKER *et al.*, 1996). O imatinibe pertence

a uma classe de compostos conhecidos como fenilaminopirimidina, desenvolvido pela Novartis Pharmaceuticals no início da década de 90 (BUCHDUNGER *et al.*, 1996).

A ação inibitória do imatinibe na proteína BCR-ABL foi a principal característica que estimulou o desenvolvimento de diversos trabalhos clínicos empregando o imatinibe. Este agente é considerado uma estratégia racional dirigida especificamente para inibir o mecanismo pelo qual ocorre a transformação neoplásica. O imatinibe produz três efeitos em células que expressam BCR-ABL: inibição da proliferação, indução de apoptose e inibição da autofosforilação do BCR-ABL (DRUKER *et al*, 1996; GAMBACORTI-PASSERINI *et al.*, 1997; DEININGER *et al.*, 1997).

Inicialmente pensava-se, que o imatinibe inibisse a atividade quinase atuando como um inibidor competitivo no sítio de ligação do ATP. Entretanto, mais recentemente demonstrou-se que esta droga ocupa somente uma parte do sítio de ligação com ATP produzindo o efeito inibidor por se ligar e estabilizar a forma da proteína BCR-ABL, inativa e não ligada ao ATP (SCHINDLER *et al.*, 2000).

Em 1998 teve início o estudo clínico fase I, cuja administração do imatinibe era dirigida aos pacientes na FC, resistentes ou intolerantes ao IFN-α. Mais tarde, pacientes na FB e com LLA Ph foram admitidos no estudo. O tratamento com imatinibe, em doses diárias de 300 mg ou mais, foi bem tolerado e induziu resposta hematológica completa em 98% dos pacientes em FC após um ano de acompanhamento (DRUKER *et al.*, 2001).

Os estudos de fase II confirmaram os excelentes resultados observados nos estudos de fase I e levaram a aprovação do imatinibe pelo FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos em 2001, menos de 3 anos após o início do estudo de fase I (KANTARJIAN *et al.*, 2002).

Em 2000 teve início um estudo multicêntrico randomizado comparando IFN-α ao imatinibe (*International Randomized Study of Interferon and* STI571 - IRIS). Neste estudo, foram admitidos pacientes recém diagnosticados com LMC na FC. Os pacientes foram randomizados em dois grupos: imatinibe ou IFN-α associado ao arabinosídeo C (ARA-C). O estudo randomizado foi encerrado antes do prazo e os pacientes pertencentes ao grupo IFN-α + ARA-C migraram para o grupo do imatinibe. A sobrevida global alcançada foi de 89%, e a estimativa de sobrevida livre de progressão foi de 93%, após 5 anos de acompanhamento com o imatinibe.

Apesar do imatinibe ser bem tolerado clinicamente, de fácil administração oral, e de aumentar consideravelmente a sobrevida dos pacientes com LMC, uma série de pacientes apresenta recaída e resistência a esse fármaco. Conforme citado inicialmente, a LMC é uma doença de célula tronco hematopoética caracterizada pela presença do cromossomo Ph. O tratamento com imatinibe induz à rápida resposta hematológica e resposta citogenética completa na maioria dos pacientes na FC. Entretanto, raramente ocorre erradicação do clone BCR-ABL$^{+}$ (BHATIA *et al.*, 2003). Uma pequena, mas detectável população de células leucêmicas torna-se persistente na maioria dos pacientes tratados com imatinibe. Estas células podem representar um reservatório em potencial de células leucêmicas, do qual células mutantes podem emergir (GORRE *et al.*, 2001) Foi cogitado que talvez o imatinibe seja menos efetivo em células leucêmicas mais primitivas, quiescentes que exibem propriedades de células tronco em camundongos imunodeficientes (HOLYOAKE *et al.*, 1999). Esta hipótese baseou-se em estudos realizados *in vitro* mostrando que as células LMC CD34$^{+}$ são relativamente resistentes ao imatinibe em concentrações duas vezes maiores que as alcançadas *in vivo* (GRAHAM *et al.*, 2002). Alguns estudos *in vitro* demonstraram que imatinibe exerce um efeito antiproliferativo nestas células LMC quiescentes (GRAHAM *et al.*, 2002;

HOLTZ *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrado que embora alguns pacientes atinjam a remissão molecular, podem recair rapidamente após a descontinuação do tratamento com imatinibe (MAURO *et al.*, 2004).

### 1.2.1 Avaliação da resposta ao tratamento com imatinibe

Após 7 anos da introdução do imatinibe na prática clínica, os resultados do tratamento e a avaliação dos critérios prognósticos e de manejo dos pacientes foram revistos. Em 2006 foi criado o *European Leukemia Net* (ELN) que contou com profissionais com experiência na área clínica e de pesquisa em LMC (BACCARANI *et al.*, 2006). Este grupo analisou criticamente a literatura publicada entre 1998 e 2005 e discutiu sobre a definição, evolução e monitoramento, assim como a melhor modalidade de tratamento. Foram analisados apenas artigos nos quais incluíram pacientes na FC inicial da doença focalizando na importância do imatinibe como tratamento de primeira linha. Em 2008 os dados foram atualizados e geraram critérios para a avaliação da resposta ao tratamento com imatinibe baseados na resposta hematológica, citogenética e molecular (BACCARANI *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Resposta hematológica e citogenética

Segundo a ELN, a resposta hematológica leva em consideração a leucometria geral e a específica, número de plaquetas e tamanho do fígado (Tabela 1). A resposta hematológica deve ser avaliada a cada 2 meses até a obtenção e confirmação da RHC (Resposta Hematológica Completa).

A resposta citogenética é definida pelo número de metáfases contendo o cromossomo Ph. A avaliação da resposta citogenética ao imatinibe deve ser avaliada em células da medula óssea, a cada 6 meses até a obtenção e confirmação da RCC, passando então a ser realizada a cada 12 meses. A resposta citogenética pode ser

realizada com menor frequência dependendo dos achados clínicos, hematológicos e moleculares (BACCARANI *et al.*, 2009)

**Tabela 1. Definição dos tipos de resposta ao tratamento com Imatinibe e períodos em que devem ser avaliados.**

| Tipo de resposta | Monitoramento da resposta ao tratamento |
|---|---|
| **Resposta hematológica**: hemograma<br>Completa (CHR)<br>Plaquetas < 450 x $10^9$/L,<br>Leucometria < 10 x $10^9$/L<br>Ausência de mielócitos, promielócitos ou mieloblastos na contagem diferencial<br>Basófilos <5%<br>Baço não-palpável | Ao diagnóstico e a cada 15 dias até a obtenção da RHC.<br>Confirmada a cada 3 meses |
| **Resposta citogenética**: metáfases Ph-positivas<br>Completa: 0<br>Parcial: 1 a 35%<br>*Minor*: 36 a 65%<br>Mínima: 66 a 96%<br>*Ausência*: > 96% | Ao diagnóstico, aos 3 meses e aos 6 meses.<br>A cada 6 meses até alcançar a RCC.<br>Sempre que ocorrer falha ao tratamento |
| **Resposta molecular**: transcritos de *BCR-ABL*<br>Completa: transcritos não detectáveis<br>Maior (MMR): razão entre BCR-ABL e *ABL* $\leq$ 0,1% | A cada 3 meses até alcançar e confirmar a RMM<br>A cada 6 meses |
| **Pesquisa por mutações:** no gene *BCR-ABL* | Falha ao tratamento, resposta subótima |

(Tabela elaborada por Flavia C. Vasconcelos)

### 1.2.3 Resposta molecular

Com a introdução do imatinibe no tratamento clínico da LMC, houve um aumento no número de pacientes alcançando a RCC, havendo a necessidade da utilização de métodos moleculares para detectar a doença residual mínima (DRM) através da análise dos transcritos do gene *BCR-ABL*. A avaliação da resposta molecular (RM) leva em consideração o número de transcritos do gene *BCR-ABL*.

A ELN recomenda que a quantificação dos transcritos dos *BCR-ABL* seja feita por RT-PCR a cada 3 meses até a obtenção e confirmação da RMM, quando se deve passar a ser realizada a cada 6 meses (Tabela 1) (BACCARANI *et al.*, 2009).

## 1.3 Fatores prognósticos na LMC

### 1.3.1 Índice de Sokal

Sokal *et al*. (SOKAL *et al.*, 1984) analisaram diversas características clínicas e laboratoriais na tentativa de predizer a resposta ao tratamento. Uma análise estatística multivariada desses dados permitiu identificar que a idade, tamanho do baço, contagem de plaquetas e percentual de blastos no sangue periférico são variáveis de importância prognóstica. A cada uma dessas variáveis foi atribuído um peso, permitindo a classificação dos pacientes com LMC em três grupos: pacientes de baixo (Sokal <0,8), intermediário (Sokal 0,8-1,2) e alto risco (Sokal >1,2), que apresentam uma sobrevida média em dois anos de 93%, 80% e 65%, respectivamente. A estimativa da mediana de sobrevida calculada pelo método de Kaplan-Meir foi de 30 meses para os pacientes de alto risco e de 60 meses para os de baixo risco. Originalmente, o índice de Sokal foi desenvolvido para predizer a resposta em pacientes tratados com bussulfan e hidroxiuréia (Hy). No entanto, este índice pode ser usado para predizer a probabilidade dos pacientes alcançarem resposta citogenética completa (RCC) e resposta molecular *major* (RMM) em pacientes tratados com imatinibe (ROSTI *et al.*, 2003; CASTAGNETTI *et al.*, 2009). O escore de alto risco está associado com a menor RCC e à progressão da doença. Entretanto, o papel preditivo do índice de Sokal desaparece se os pacientes de alto risco alcançam a RCC (HERNÁNDEZ-BOLUDA *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Atividade tirosina quinase como predição de resposta ao tratamento com inibidor de tirosina quinase imatinibe

Em 1994, três laboratórios descobriram que a CrkL é a principal proteína tirosina fosforilada em pacientes com LMC (NICHOLS *et al.*, 1994; TEN HOEVE *et al.*, 1994a; ODA *et al.*, 1994). Desde então, o papel da proteína CrkL na sinalização hematopoética

normal assim como a sua atuação na transformação leucêmica promovida pela proteína BCR-ABL são estudados. O gene da CrkL foi identificado após análise da região entre o gene *BCR* e o centrômero do cromossomo 22, que revelou um novo gene homólogo ao *CRK* (CT10 regulador de uma tirosina quinase), chamado de CrkL (Crk-*like*) (TEN HOEVE *et al.*, 1993). O gene *CRKL* codifica uma proteína de 39 KDa pertencente à família Crk de proteínas adaptadoras. Moléculas adaptadoras são componentes essenciais das vias de sinalização celular devido a sua capacidade de interagir simultaneamente com múltiplas moléculas efetoras e de orquestrar o conjunto de complexos sinalizadores dos receptores de superfície ativados. Os processos celulares são iniciados via fatores extracelulares que induzem a fosforilação de tirosinas intracelulares (SATTLER & SALGIA, *et al.*, 1998). Proteínas fosforiladas ligam-se as proteínas adaptadoras que são subsequentemente ligadas, através de seu domínio SH3, as proteínas alvo na cascata de sinalização descendente (Figura 3B). Animais *knockout* para *CrkL* ou *crk* apresentam múltiplos defeitos de desenvolvimento e morrem ainda no útero ou logo após o nascimento principalmente por defeitos cardiovasculares (PARK *et al.*, 2006).

A proteína CrkL é constituída por um domínio homólogo ao SRC 2 (SH2) e dois domínios homólogos ao SRC 3 (SH3) que promovem a interação entre diferentes proteínas (SATTLER *et al.*, 1998) (Figura 3A). O domínio SH2 da CrkL liga-se à outras proteínas contendo resíduos de tirosina fosforilados (SATTLER *et al.*, 1998). Dentre as proteínas que se ligam a este domínio da CrkL estão p130Cas, Cbl (Casitas linfoma de linhagem B), subunidade reguladora da PI3K (p85), ZAP-70, PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta), EGF (fator de crescimento epidermal) e outras (ISAKOV *et al.*, 2008). O domínio SH3 N terminal, interage com regiões ricas em prolina, geralmente a sequência Pro-x-x-Pro (x indica que não há necessidade de um

aminoácido específico) (SATTLER *et al.*, 1998). Este domínio pode interagir com múltiplas proteínas incluindo ABL, C3G, SOS1 (*son of sevenless homolog* 1), MAPK8, DOCK1 (descendente ao Crk) dentre outras (ISAKOV *et al.*, 2008). Os únicos membros da família Crk que possuem um domínio SH3 C terminal (SH3C) adicional são o CrkII e o CrkL. A função deste domínio ainda não foi definida, mas estudos sugerem que ele estabilize a proteína em uma conformação inativa (OGAWA *et al.*, 1994). A especificidade de uma proteína adaptadora é definida pela estrutura e função dos domínios SH2 e SH3 que reconhecem fosfotirosinas e regiões ricas em prolina (SATTLER *et al.*, 1998).

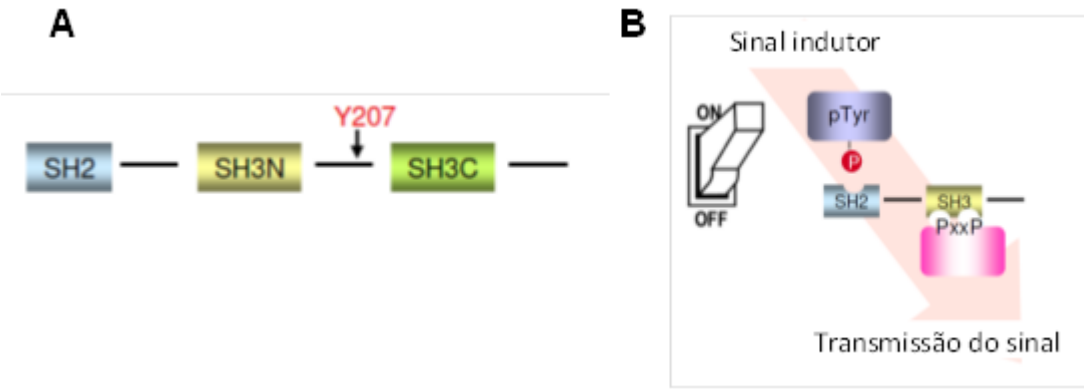



**Figura 3. Estrutura e função da proteína CrkL. A)** CrkL é formada por um domínio SH2 (Src *homology* 2) e dois domínios SH3 (Src *homology* 3) que promovem a interação entre diferentes proteínas. **B)** Sinalização através de proteínas adaptadoras. Um estímulo celular (representado por um interruptor de luz) induz a fosforilação de tirosinas intracelulares Proteínas fosforiladas ligam-se as proteínas adaptadoras que são subsequentemente ligadas, através de seu domínio SH3, a proteínas alvo abaixo da cascata de sinalização (adaptação de BIRGE *et al.*, 2009).

A proteína CrkL tem papel central em diversos processos biológicos, como proliferação, migração e adesão celular, mecanismos de fagocitose de células apoptóticas, apoptose e regulação da expressão gênica (FELLER *et al.*, 2001). Em linfócitos T e B, CrkL atua na transdução de sinal desencadeada por integrinas

(ISAKOV *et al.*, 2008). Em progenitores eritróides, eritropoetina e interleucina 3 estimulam a proliferação e a diferenciação via fosforilação de Cbl e formação de complexos proteicos envolvendo CrkL (BARBER *et al.*, 1997). Nestes exemplos, CrkL é parte de um complexo de proteínas, formado a partir da ativação de um receptor, cuja atividade depende da disponibilidade extracelular de fatores de crescimento e do estado fisiológico/metabólico da célula.

Em células de pacientes com LMC, a BCR-ABL confere independência a fatores externos, através da ativação constitutiva das cascatas de sinalização que promovem a proliferação e sobrevivência da célula (FRAZER *et al.*, 2007). Ten Hoeve *et al. (*TEN HOEVE *et al.*, 1994a) demonstraram que além da proteína CrkL ser fosforilada pelas proteínas ABL e BCR-ABL, também pode formar complexos *in vivo* com estas proteínas. Além disso, CrkL é capaz de se ligar a SOS1. Estes dados forneceram evidências de que a CrkL poderia fazer parte de uma via de transdução de sinal envolvendo ABL e sugeriram um mecanismo através do qual BCR-ABL pode exercer seu efeito oncogênico (TEN HOEVE *et al.*, 1994b). Este mesmo grupo demonstrou posteriormente que a CrkL está presente em células BCR-ABL negativas do SP de indivíduos saudáveis, mas apenas em sua forma não-fosforilada. Por outro lado, encontra-se fosforilada em células BCR-ABL de pacientes com LMC. Além disto, foi demonstrado que havia uma correlação direta entre a presença de BCR-ABL e o *status* de fosforilação do CrkL (TEN HOEVE *et al.*, 1994a). Outros trabalhos encontraram os mesmos resultados, reforçando a ideia de que a fosforilação constitutiva do CrkL se constitui em uma característica da LMC (NICHOLS *et al.*, 1994; ODA *et al.*, 1994).

Utilizando-se da associação entre a presença de BCR-ABL e da fosforilação de CrkL, White *et al* (WHITE *et al.*, 2005) desenvolveram uma estratégia para análise indireta da resposta ao inibidor da TK, imatinibe, através da detecção da inibição da

atividade tirosina quinase BCR-ABL usando a proteína CrkL. Foram analisadas amostras de pacientes com LMC antes do início do tratamento clínico com imatinibe. Estas amostras foram tratadas *in vitro* com diferentes concentrações de imatinibe. A concentração de imatinibe capaz de inibir em 50% a fosforilação de CrkL ($IC50^{Imatinibe}$), analisada antes do início do tratamento clínico foi comparada à resposta molecular durante os 12 primeiros meses de tratamento clínico. Os autores observaram que a $IC50^{Imatinibe}$ se correlacionou significativamente com a resposta ao tratamento, sugerindo que este método poderia ser utilizado para prever a resposta ao tratamento com imatinibe mesmo antes do início do tratamento clínico. Em 2007, este mesmo grupo desenvolveu uma forma de monitorar o tratamento com imatinibe. Eles demonstraram que além do nível de inibição da atividade TK variar de um paciente para outro, é altamente preditivo da resposta citogenética e molecular após 24 meses de tratamento com imatinibe (WHITE *et al.*, 2007a).

O ensaio da $IC50^{Imatinibe}$ e o monitoramento da resposta clínica ao imatinibe foram realizados através da técnica de Imunoblotting.

Hamilton *et al* validaram a análise da $IC50^{Imatinibe}$ por citometria de fluxo (HAMILTON *et al.*, 2006) e posteriormente pelo ensaio Elisa (HAMILTON *et al.*, 2009) para obter resultados em menor tempo e com menor quantidade de células.

### 1.4 Mecanismos de Resistência ao tratamento na Leucemia Mielóide Crônica

Pelos critérios da ELN, resistência clínica ao imatinibe é definida por perda de resposta hematológica e/ou citogenética, falha em alcançar a RHC (apenas para a FC) ou qualquer resposta hematológica (para pacientes em outras fases da doença) após 3 meses de tratamento com imatinibe. A persistência de 100% de metáfases Ph após 6 meses ou uma quantidade maior ou igual a 35% após 12 meses de tratamento

caracterizam aquisição de resistência ao imatinibe. Essa resistência pode ser classificada como primária ou adquirida. Resistência primária é a falha em alcançar a RHC após 3 meses ou alcançar a RCM após 6 meses de tratamento. Pouco se sabe sobre as causas da resistência primária, mas provavelmente não tem correlação com as mutações no *BCR-ABL* (GOLDMAN *et al.*, 2004). As mutações são a causa de 35 a 90% dos casos de resistência adquirida. Resistência adquirida pode ser definida como a perda da resposta hematológica, citogenética ou molecular em qualquer fase do tratamento, podendo ser seguida ou não por progressão para outra fase da doença (HOCHHAUS *et al.*, 2002).

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a resistência em pacientes que não possuem mutação no *BCR-ABL* incluindo amplificação do gene *BCR-ABL* e alteração dos níveis plasmáticos ou intracelulares da droga (QUINTÁS-CARDAMA *et al.*, 2009).

Acredita-se que a resistência aos inibidores de TK possa ser o resultado da interação de múltiplos fatores incluindo biodisponibilidade, farmacodinâmica, alterações genéticas, mutações no domínio quinase do gene *BCR-ABL* ou a combinação de todos estes fatores (Figura 5; EECHOUTE et al., 2011).

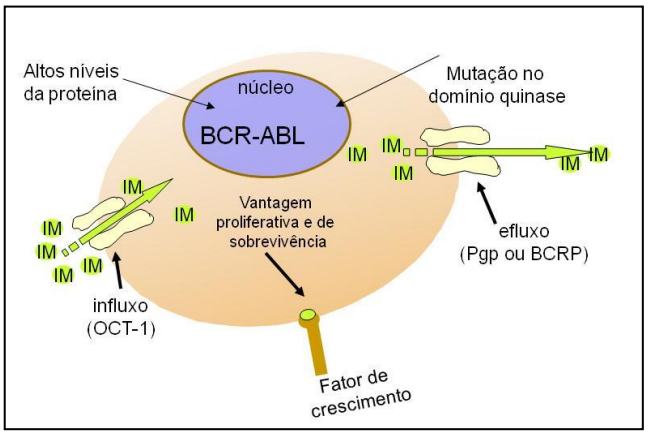



**Figura 5. Alguns fatores que podem contribuir para a resistência clínica ao Mesilato de Imatinibe (IM).** Alterações na expressão ou na atividade de proteínas responsáveis pelo transporte de imatinibe para o interior (proteínas de influxo) ou para o exterior (proteínas de efluxo) da célula; alterações no alvo do imatinibe (BCR-ABL)

podem levar à resistência. OCT1=Transportador de cátion orgânico 1; Pgp = glicoproteína P; BCRP = proteína da resistência em câncer de mama. Figura elaborada por Flavia C. Vasconcelos.

### 1.4.1 Mutação do gene *BCR-ABL*

A resistência ao imatinibe se desenvolve quando as células encontram uma forma de manter uma sinalização BCR-ABL adequada. Isto pode ocorrer por mutação do gene *BCR-ABL*. A mutação no domínio BCR-ABL pode ser capaz de impedir a ligação do imatinibe sem interferir muito com a atividade enzimática dessa molécula (GAMBACORDI-PASSERINI *et al.*, 2003). Mutações pontuais no sítio de ligação da tirosina quinase podem impedir o imatinibe de se ligar devido à interrupção de pontos de contato críticos entre este fármaco e a proteína ou por induzir uma alteração na conformação da molécula na qual o imatinibe não pode se ligar (BRANFORD *et al.*, 2003). Pouco tempo após o sucesso dos primeiros trabalhos clínicos com imatinibe terem sido anunciados, surgiram publicações sobre a resistência ao imatinibe como consequência das mutações pontuais no domínio quinase *BCR-ABL*.

As mutações podem ocorrer no "P *loop*", uma região altamente conservada entre os aminoácidos 248 e 255, ou entre essas duas regiões, porém, não no domínio catalítico (BRANFORD *et al.*, 2003). Até o momento, mais de 100 diferentes mutações foram identificadas, levando a diferentes substituições de aminoácidos (QUINTÁS-CARDAMA *et al.*, 2009). O impacto celular e bioquímico dos diferentes tipos de mutações na intensidade da resistência ao imatinibe varia de discreto a total. (CORBIN *et al.*, 2003). Em um trabalho englobando 144 amostras de pacientes com LMC, foram observadas mutações em 17 diferentes resíduos do gene *BCR-ABL* em 27 pacientes que se encontravam na fase crônica ou acelerada. Esses resultados foram correlacionados com o desenvolvimento de resistência clínica ao imatinibe. As mutações no *loop* de ligação do ATP (P-*loop*) foram as mais frequentes e particularmente associadas com um

pior prognóstico (BRANFORD *et al.*, 2003). Em outro estudo, observou-se a presença de 22 mutações envolvendo 19 resíduos de aminoácidos em 53 de 117 pacientes resistentes ao imatinibe. Essas mutações ocorreram em pacientes com LMC que estavam em recaída da doença (sinais da doença após obtenção de resposta objetiva) e não nos casos de resistência primária, isto é, na ausência de resposta após o tratamento inicial (KREILL *et al.*, 2003).

### 1.4.2 Proteínas transportadoras de drogas

Proteínas transportadoras de membrana desempenham um importante papel farmacológico podendo afetar não somente a entrada de drogas na célula, assim como, a extrusão de drogas para o meio extracelular. Proteínas transportadoras de membrana são importantes na incorporação e eliminação de fármacos *in vivo* via trato gastrointestinal, e no nível celular são importantes determinantes da concentração intracelular de drogas (DEAN *et al.*, 2005).

As proteínas transportadoras de membrana que influenciam na farmacocinética das drogas utilizadas no tratamento do câncer podem ser divididas em dois grandes grupos: as responsáveis pelo influxo e as responsáveis pelo efluxo de substâncias.

A superexpressão de algumas proteínas transportadoras pertencentes à superfamília ABC (*ATP binding cassette*) está implicada na resistência clínica ao tratamento das leucemias. Estas proteínas são responsáveis pela extrusão de drogas para o meio extracelular gerando redução de suas concentrações no meio intracelular e ao fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR) (DE JONGE-PEETERS *et al.*, 2007).

Ao contrário das proteínas de efluxo, não existem muitos estudos sobre o papel das proteínas de influxo de drogas na resistência a drogas. Existem dados conflitantes na literatura mostrando que o imatinibe é substrato (Burger *et al.*, 2004) ou inibidor para

proteínas de efluxo (HOUGHTON *et al.*, 2004), e substrato para as proteínas de influxo (THOMAS *et al.*, 2004). Portanto, a expressão destas proteínas torna-se importante tanto na absorção do imatinibe pelo trato gastrointestinal, quanto na célula leucêmica.

### 1.4.3 Proteínas transportadoras de efluxo de drogas

A família de genes ABC é constituída por 49 genes divididos entre 7 subfamílias (de ABCA a ABCG) (DEAN, 2001). Transportadores pertencentes à família ABC, conhecidas também como proteínas transportadoras de efluxo, transportam diversos substratos através de membranas contra um gradiente de concentração através da hidrólise de ATP (GOTTESMAN *et al.*, 2002). Proteínas transportadoras da família ABC estão presentes no cérebro (barreira hemato-encefálica), na placenta (barreira materno-fetal), células hematopoiéticas, fígado, rim, intestino e em outros tecidos desempenhando um papel fisiológico na detoxificação e proteção contra xenobióticos (SCHINKEL *et al.*, 2003). A presença dos transportadores de efluxo em células normais constitui uma proteção contra toxinas. Em células tumorais pode conferir resistência à terapia contra o câncer.

A principal característica dos transportadores de efluxo é conferir o fenótipo MDR, um fenômeno caracterizado pela resistência das células tumorais a um amplo espectro de drogas com estruturas químicas e alvos celulares diferentes. Isto se deve à superexpressão das proteínas transportadoras da família ABC, capazes de transportar quimioterápicos (qts) para o exterior da célula, diminuindo as suas concentrações intracelulares a níveis subletais (BELLAMY *et al.*, 1996).

Dos 49 membros da família dos transportadores de efluxo, 13 foram descritos como capazes de transportar e conferir resistência aos qts (DE JONGE-PEETERS *et al.*, 2007), sendo a glicoproteína-P (Pgp/ABCB1), a proteína relacionada à resistência a

múltiplas drogas 1 (MRP1/ABCC1) e a proteína da resistência em câncer de mama (BCRP/ABCG2), os principais transportadores identificados em células tumorais.

A Pgp está presente em um baixo percentual de pacientes com LLA (OLSON *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007). O papel exercido por essa proteína na resposta ao tratamento da LLA é controverso. Embora alguns autores atribuam um papel prognóstico (DHOOGE *et al.*, 2002; OLSON *et al.*, 2005) outros autores não encontraram qualquer significância prognóstica (WUCHTER *et al.*, 2000; VALERA *et al.*, 2004). Embora os estudos realizados até o presente momento concordem sobre a ausência de valor prognóstico dos transportadores MRP1 e BCRP na LLA (SWERTS *et al.*, 2006), existe a necessidade da realização de mais trabalhos para esclarecer algumas divergências. Na LMA o valor da Pgp como fator prognóstico é quase um consenso, principalmente em pacientes idosos (BURNETT *et al.*, 2009).

A expressão de Pgp tem sido observada em pacientes com LMC em todos os estágios evolutivos da doença sendo mais frequente na FB (GILES *et al.*, 1999; VASCONCELOS *et al.*, 2007). A expressão da Pgp pode ocorrer espontaneamente ou após a qt (TURKINA *et al.*, 1999). A bomba de efluxo Pgp possibilita o transporte eficiente de um amplo espectro de substâncias lipofílicas para o exterior da membrana celular (List, 1996). A estrutura química do imatinibe sugere que esse fármaco possui propriedades lipofílicas. Esses dados indicam que a Pgp é um provável candidato que contribui para a resistência ao imatinibe. De fato, esta suspeita foi investigada sendo mostrado que o imatinibe tem atividade citotóxica reduzida em células expressando Pgp (MAHON *et al.*, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2011; PENG *et al.*, 2012).

Em 2004, foi mostrado que os níveis intracelulares de imatinibe estão reduzidos em células da LMC que são Pgp positivas. Além disso, os autores demonstraram que a ciclosporina A (CSA), um potente modulador da Pgp, restaurou a citotoxicidade ao

imatinibe nessas células reforçando o importante papel da Pgp na resistência a essa droga (ILLMER *et al.*, 2004; CORRÊA *et al., 2012*).

Até o momento foram publicados alguns trabalhos contraditórios com relação à interação do imatinibe com outra proteína transportadora, a BCRP. Houghton *et al.*, (HOUGHTON *et al.*, 2004) mostraram que o imatinibe é um potente agente modulador da BCRP, mas não um substrato. Enquanto Burger *et al.*, (BURGER *et al.*, 2004) demonstraram que o imatinibe é substrato para BCRP. A maioria dos resultados foi obtida através de linhagens celulares. Existe apenas um trabalho investigando a expressão e função da BCRP em células primárias de LMC onde a casuística é pequena (JORDANIDES *et al.*, 2006).

A BCRP é expressa na membrana apical das células do intestino delgado e epitélio do cólon, sendo muito provável que a BCRP esteja envolvida na devolução ativa de drogas cuja absorção é pelo trato gastrointestinal (MALIEPAARD *et al.*, 2001). Este papel seria importante na diminuição da biodisponibilidade sistêmica de drogas orais como o imatinibe.

Alguns autores identificaram a presença da BCRP em um determinado grupo de células tronco hematopoéticas (HSC) chamado de *side population*, devido à sua característica única de extruir o fluorocromo Hoechst 33342 (GOODELL *et al.*, 1996). As células pertencentes à *side population* são as HSC que expressam o antígeno CD34, mas não o antígeno CD38 e que possuem a capacidade de auto-renovação e diferenciação em células hematopoéticas (ZHOU *et al.*, 2001).

Graham *et al* (GRAHAM *et al.*, 2002) demonstraram que HSC primitivas que expressavam BCR-ABL de pacientes com LMC na fase crônica eram resistentes ao imatinibe. Esta descoberta levou à hipótese de que esta população de células resistentes pudesse contribuir para a falha ao tratamento com imatinibe. Nakanishi *et al.*

(NAKANISHI *et al.*, 2006) pesquisaram a interação da BCRP e do imatinibe em uma linhagem celular expressando BCR-ABL. Esta linhagem foi resistente aos substratos da BCRP assim como ao imatinibe e a resistência foi modulada por inibidores da BCRP. Outro achado interessante foi à resistência inicial ao imatinibe causada pela BCRP ter sido atenuada pela inibição do BCR-ABL. Tal achado sugeriu que a BCR-ABL possa regular a expressão da BCRP em uma etapa posterior à transcrição.

A BCRP está expressa nas HSC normais e leucêmicas. Entretanto, o papel desta proteína, assim como sua presença e funcionalidade nas células que caracterizam a *side population* em amostras de pacientes portadores de LMC, não foi elucidado até o momento podendo representar uma nova explicação para a falha ao tratamento com imatinibe nos pacientes portadores de LMC.

### 1.4.4 Transportadores de influxo de drogas

Assim como os transportadores ABC, os transportadores pertencentes à superfamília de carreadores de soluto (SLC) desempenham um importante papel na absorção, distribuição, eliminação e resposta às drogas (KOEPSELL *et al.*, 2007 ), contudo foram modestamente estudados.

Além da resistência devido ao efluxo de drogas, a redução no influxo de quimioterápicos pode contribuir para a resistência (SHEN *et al.*, 2000), porém o papel dos transportadores de influxo na resposta ao tratamento é pouco explorado.

Os membros da superfamília de SLC são transportadores passivos conhecidos como transportadores facilitadores que permitem a passagem do soluto através da membrana sem gasto de energia (KOEPSELL *et al.*, 2007). Esta superfamília é dividida em 43 famílias segundo o tipo de substrato transportado e o tipo de transporte. Algumas famílias transportam substratos específicos como, oligopeptídeos, açúcares, fosfatases

ou metais enquanto outras famílias são poli específicas, transportando substratos com diferentes tamanhos e estruturas (HEDIGER *et al.*, 2004).

Os transportadores SLC são, em sua grande maioria expressos na membrana plasmática e desempenham papel crítico em uma variedade de processos celulares fisiológicos como importar/exportar neurotransmissores, nutrientes ou metabólitos (KOEPSELL *et al.*, 2007).

Um número crescente de artigos científicos vem demonstrando que alguns qts são substratos para os transportadores de influxo. Foi demonstrado que o transportador SLC19A1 (ou RFC1), pertencente à família 19 de transportadores de folato/tiamina, é responsável pelo influxo do metrotexate (MTX). Alterações na expressão deste transportador contribuem para a redução nos níveis de MTX podendo levar a resistência em células de pacientes com LLA da infância (LAVERDIÈRE *et al.*, 2002). Em células de pacientes com leucemia linfóide crônica (LLC), um ensaio funcional para detecção de transportadores de influxo correlacionou-se com a resposta *in vitro* ao qt fludarabina quando o transportador SLC29A1 (ou ENT1) foi analisado (CASADO *et al.*, 2003). Os membros da família de transportadores de cátions orgânicos (OCT) SLC22A1 (ou OCT1) e SLC22A2 (ou OCT2) transportam cisplatina que é utilizado no tratamento de diversos tumores sólidos (YONEZAWA *et al.*, 2006). O transportador SLC22A16 está presente apenas no testículo, fígado fetal e MO normais. No testículo este transportador é responsável pelo transporte da L-carnitina que aumenta a qualidade e fertilidade do esperma (ENOMOTO *et al.*, 2002). Com relação à expressão no fígado fetal e na medula óssea acredita-se que o SLC22A16 desempenhe algum papel na hematopoese (GONG *et al.*, 2002). O influxo da doxorubicina é facilitado pelo transportador SLC22A16 (ou CT2 ou OCT6) membro da família OCT como demonstrado em linhagens celulares leucêmicas. Entretanto, a presença deste transportador em amostras

de pacientes com LLA e LMA não foi correlacionada à resposta ao tratamento clínico com doxorubicina (OKABE *et al.*, 2005).

Recentemente foi descrito que o imatinibe é transportado para o interior da célula, preferencialmente, via OCT1 e que a expressão deste transportador é preditiva de obtenção de remissão citogenética completa após 6 meses de tratamento com imatinibe (WANG *et al.*, 2008). Associados, estes dados sugerem uma possível participação na absorção de drogas no nível celular.

### 1.4.5 Transportadores de influxo de drogas na LMC

Entre as famílias pertencentes à SLC duas se destacam pela abrangência de substratos transportados. A família 21 das proteínas carreadoras de soluto (SLC21) é formada por transportadores de polipeptídeos ânions orgânicos, incluindo hormônios esteróides, sais biliares e outros. A família SLC22 é composta por transportadores de cátions orgânicos (OCT), transportadores de cátion/zwitterion (OCTN) e transportadores de ânions orgânicos (OAT).

A família SLC22 das proteínas carreadoras de soluto é composta por 12 membros em sua maioria por transportadores poli específicos. Muitos membros desta família são expressos no intestino, fígado e rim indicando um importante papel na absorção e excreção de drogas, xenobióticos e compostos endógenos que existem como cátions em pH fisiológico (KOEPSELL *et al.*, 2007). A família é dividida ainda em subgrupos segundo o substrato e o mecanismo de transporte (KOEPSELL *et al.*, 2007).

Em 2004, Thomas e colaboradores descreveram que o influxo do imatinibe é temperatura dependente, indicando o envolvimento de um processo ativo de influxo. Quando as células foram incubadas com inibidores do transportador OCT1, o influxo de imatinibe reduziu significativamente (THOMAS *et al.*, 2004). Desde então, outros

trabalhos foram publicados corroborando com a hipótese de que o imatinibe é um substrato para o transportador OCT1. White *et al.* (WHITE *et al*, 2007b) analisaram a atividade da proteína OCT1 em amostras de pacientes com LMC antes de iniciarem o tratamento com imatinibe e compararam com a obtenção de RMM após 24 meses. Neste estudo a atividade da OCT1 foi um importante determinante da resposta molecular ao imatinibe com valor preditivo fortemente ligado à dose do medicamento. A análise da atividade da OCT1 antes do início do tratamento com imatinibe foi capaz de identificar pacientes que necessitariam de uma dose maior da droga para responder ao tratamento clínico com imatinibe.

Além da atividade, os níveis de expressão do gene *SLC22A1* que codifica a proteína OCT1, podem estar relacionados ao influxo diminuído de imatinibe. Crossman (CROSSMAN *et al*, 2005) e colaboradores analisaram a expressão do gene do *SLC22A1* em amostras de pacientes com LMC antes do início do tratamento e observaram que a expressão do *SLC22A1* foi variável e não diferiu significativamente dos níveis encontrados em amostras de medula óssea de indivíduos saudáveis. Entretanto, os pacientes que responderam ao tratamento com imatinibe apresentaram níveis significativamente maiores de expressão gênica do *SLC22A1* quando comparados ao grupo dos não-respondedores. Apesar destes e outros artigos sugerirem uma correlação direta entre *SLC22A1* e a resposta ao tratamento com imatinibe, Hu *et al* (HU *et al.*, 2008) discordam. Estes autores acreditam que *SLC22A1* isoladamente não seja capaz de influenciar na retenção do imatinibe, pois esta droga seria um substrato fraco para a proteína OCT1.

A contribuição do transportador OCT1 para a resposta ao tratamento clínico com imatinibe ainda não foi elucidada. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar o papel deste transportador de influxo na resposta ao tratamento com imatinibe.

# II. OBJETIVOS

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

Investigar mecanismos de resistência ao tratamento com imatinibe na LMC relacionados às proteínas e genes de influxo e de efluxo de drogas.

## 2.2 Objetivos específicos:

- Analisar a frequência e os níveis da expressão das proteínas de efluxo de drogas Pgp e MRP1 em células de pacientes com LMC;
- Avaliar a frequência e os níveis da atividade dos transportadores de efluxo de drogas Pgp, MRP1 e BCRP em células de pacientes com LMC;
- Investigar a os níveis dos RNAm dos genes *SLC22A1*, *ABCG2* e *ABCB1* em células de pacientes com LMC;
- Analisar a correlação entre a expressão e a atividade das proteínas transportadoras com as características clínicas e laboratoriais da LMC;
- Analisar o potencial do fármaco imatinibe como agente modulador e/ou substrato de Pgp;
- Implantar o método de detecção da redução nos níveis da proteína pCrkL em linhagens celulares e validar em células de pacientes com LMC;
- Verificar se o ensaio de detecção do percentual de redução da proteína pCrkL pode ser utilizado como marcador de resposta ao tratamento com imatinibe.

# III. METODOLOGIA

# 3. METODOLOGIA

## 3.1 Pacientes

Pacientes com o diagnóstico confirmado de LMC baseado nas características clínicas, morfológicas, citogenéticas e moleculares foram selecionados para a inclusão no presente estudo. Todos os dados relacionados ao diagnóstico e à evolução da doença foram coletados dos prontuários dos pacientes e/ou dos prontuários eletrônicos obtidos na intranet do INCA. Todos os dados clínicos foram analisados por um médico hematologista. Os critérios para a inclusão dos pacientes no estudo foram: a presença do cromossomo Ph e/ou transcritos de *BCR-ABL* na ocasião do diagnóstico. Foram incluídos pacientes tratados previamente com diferentes tipos de qts e inibidores de tirosina quinase desde que o quadro clínico e laboratorial configurasse perda da resposta hematológica, citogenética ou molecular.

O total de amostras analisadas variou de acordo com o experimento realizado sendo, o número de amostras, especificado nos subitens da seção resultados. Algumas amostras foram estudadas por mais de um método empregado neste trabalho.

Este estudo aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do INCA sob o número 107/05.

## 3.2 Amostras de células dos pacientes e de indivíduos saudáveis

As amostras de sangue periférico ou de medula óssea de pacientes com LMC foram coletadas em tubos heparinizados e as células leucêmicas separadas por gradiente de densidade (Ficoll-Hipaque, Sigma-Aldrich; St. Louis, CA, US). Após esse procedimento, as células foram lavadas três vezes com cloreto de sódio (NaCl) a 0.9% e ressuspendidas em meio de cultura RPMI1640 (Sigma-Aldrich; St. Louis, CA, US), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) (Gibco; BRL, UK).

Os leucócitos de indivíduos saudáveis foram obtidos do sangue periférico, que foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos para o descarte de plasma e plaquetas. As amostras foram centrifugadas a 2000rpm por 15 minutos para o descarte do plasma e plaquetas. A seguir as hemácias foram lisadas com tampão de lise sem fixador ($NH_4Cl$ 150 mM, $NaHCO_3$ 1,0 mM, EDTA 1,27 mM) e os leucócitos lavados com solução salina tamponada de fosfato (PBS). Os leucócitos foram ressuspendidos em meio de cultura RPMI1640, suplementado com 10% de SFB. Desta forma, foram estudadas as células mononucleares e as polimorfonucleares dos indivíduos saudáveis.

### 3.3 Linhagens celulares

Linhagens com diferentes perfis de resistência a drogas foram utilizadas como controles da expressão e função das proteínas analisadas neste estudo. A linhagem celular K562, originada a partir de uma LMC na FB mielóide (eritroleucemia), foi utilizada como controle negativo para a expressão da proteína Pgp. A linhagem celular K562-Lucena 1, desenvolvida a partir da K562 por exposição contínua e crescente a vincristina (VCR) (RUMJANEK *et al.*, 2001) foi utilizada como controle positivo para expressão e função da proteína Pgp. Ambas as linhagens K562 e a K562-Lucena 1 expressam a proteína quimérica BCR-ABL, constitutivamente ativada. Sendo assim, estas linhagens foram utilizadas para a padronização do ensaio funcional da proteína BCR-ABL.

A linhagem de adenocarcinoma de mama MCF7 deu origem à linhagem MCF7/FLV500 através da exposição crescente e contínua ao fármaco flavopiridol (ROBEY *et al.*, 2001). Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo grupo da Dra. Susan Bates (*Molecular Therapeutics Section, National Cancer Institute*, Estados Unidos) para

auxiliarem na padronização e implantação da análise funcional da BCRP em nosso laboratório.

As linhagens tiveram seus genótipos determinados através da análise de seus perfis de polimorfismos STR (*short tandem repeats*) em locus humanos por PCR. As amostras de DNA foram enviadas ao Laboratório Sonda da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde todo o procedimento da genotipagem foi realizado. Nesse laboratório, foram avaliados dezesseis loci e comparados aos nove e onze loci previamente descritos no banco de dados do ATCC (American Type Culture Collection). Os perfis das linhagens obtidos após a genotipagem foram compatíveis com os perfis descritos no banco de dados.

Como controle de qualidade dos cultivos celulares, as linhagens foram monitoradas quanto à infecção por micoplasma como descrito por Uphoff e Drexler (UPHOFF AND DREXLER, 2005).

### 3.4 Determinação da atividade dos transportadores de efluxo: ensaio Rho+CSA

As células leucêmicas de pacientes, de indivíduos saudáveis e as linhagens celulares foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma densidade de $5x10^5$ células por tubo. Para a realização do ensaio de atividade dos transportadores de efluxo foi utilizado o fluorocromo rodamina 123 (Rho) associado ao agente modulador CSA (Rho+CSA), sendo ambos considerados inespecíficos por detectar a atividade de mais de um transportador de efluxo.

Para a realização do ensaio foram necessários três tubos para cada amostra. Em um tubo foram colocadas apenas as células em meio de cultura para a determinação da autofluorescência no citômetro de fluxo. Em outro tubo foram colocadas as células em RPMI, e 200ng/ml do fluorocromo Rho (Sigma-Aldrich; St. Louis, CA, US). No

terceiro tubo foram colocadas as células, Rho e 200ng/ml do agente modulador CSA (Sandoz; Paraná, Brasil). Os três tubos foram incubados em estufa de $CO_2$ a 37°C por 45 minutos. Ao término da incubação, as células foram lavadas em tampão fosfato (PBS) gelado para a remoção do fluorocromo Rho caso não tenha sido incorporado pelas células. Após a centrifugação, o agente modulador CSA foi reintroduzido no tubo (destinado ao bloqueio da atividade do transportador de efluxo). Todos os tubos foram incubados por mais 45 minutos e em seguida analisados em citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos sob a forma da razão (RIF) entre a média de intensidade de fluorescência (MIF) do tubo contendo Rho+CSA dividida pela MIF do tubo contendo apenas o fluorocromo Rho.

As linhagens celulares que expressavam ou não diferentes transportadores de efluxo foram utilizadas para estabelecer o ponto de corte de positividade para o ensaio Rho+CSA.

### 3.5 Determinação da atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP: ensaio PhA+FTC

Células leucêmicas de pacientes ou das linhagens celulares ($5x10^5$ por ml de RPMI1640) foram incubadas por 30 minutos na presença ou ausência de 1 µM do fluorocromo Pheophorbide A (PhA- Sigma-Aldrich; St. Louis, CA, US) e/ou 10 µM do agente modulador Fumitremorgim C (FTC –Alexis Biochemical) por 30 minutos em estufa de $CO_2$ a 37°C. Após a incubação, as células foram lavadas em PBS gelado e ressuspendidas em RPMI1640 contendo ou não 10 µM de FTC na ausência de PhA. Após 1 hora de incubação as células foram imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (ROBEY *et al.*, 2004). O ensaio PhA+FTC é descrito como específico para a avaliação da atividade do transportador de efluxo BCRP (ROBEY *et al.*, 2004).

### 3.6 Avaliação da expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp

Um total de $10^6$ Células leucêmicas (na concentração igual a 1 milhão) foram incubadas com 5 µL de anticorpo monoclonal anti-Pgp conjugado a ficoeritrina (UIC2/PE - Immunotech). Após 30 minutos, à temperatura ambiente, o excesso de anticorpo foi removido mediante a adição de PBS e posterior centrifugação por 7 minutos a 1500 rpm. As células foram fixadas utilizando-se formaldeído 1% e analisadas em citômetro de fluxo.

### 3.7 Avaliação da expressão da proteína de efluxo MRP1

Primeiramente, foram adicionados 500 µL de solução de lise 10% (BD FACS™ Lysing Solution) aos tubos, para permeabilização das células. Após 10 minutos, as células foram lavadas com PBS/Tween20 0,5% e marcações inespecíficas foram bloqueadas por 15 minutos com PBS/SFB 2%. As células foram centrifugadas e aos tubos, foram adicionados 5 µL do anticorpo anti-MRP1 conjugado ao isotiocianato de sódio (Becton Dickinson). Após 30 minutos de incubação, as células foram submetidas a duas lavagens com PBS/Tween 0,5%, seguidas de centrifugações. Por fim, as células foram fixadas com PBS/formaldeído 1% e a leitura, realizada no citômetro de fluxo.

### 3.8 Tratamento *in vitro* de linhagens celulares com imatinibe

As células das linhagens celulares K562 e K562-Lucena 1 (total de $2x10^6$ células), foram incubadas com ou sem a adição de diferentes concentrações de imatinibe pelo período de 2, 24, 48 ou 72 horas em estufa de $CO_2$ (5%) a $37^o$ C. Após os períodos de incubação as células foram processadas de acordo com a técnica dependendo do ensaio onde seriam investigadas.

### 3.9 Avaliação da morte celular

O ensaio foi realizado a fim de quantificar o percentual de células mortas após tratamento *in vitro* com o imatinibe conforme descrito na seção 3.7 da metodologia. Após os tempos de incubação as células foram lavadas com PBS. As células foram então incubadas com 90 µL de uma solução contendo 2µL de anexina V conjugada ao Alexa 488 mais 88µL de tampão de ligação diluído 10x em água destilada e as células foram mantidas protegidas de luz por 15 minutos. Um volume de 10µL de Iodeto de Propídeo (PI) foi colocado em cada tubo ao final do período de incubação, a fim de marcar as células em necrose, uma vez que o PI penetra nas células que apresentam sua membrana plasmática rompida. A anexina V liga-se à fosfatidilserina exposta na face externa da membrana plasmática. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo e os resultados foram expressos sob a forma de percentual de células marcadas com anexina e PI que foram consideradas as células mortas. O percentual de morte obtido nos tubos de células tratadas com o imatinibe foi descontado do percentual de morte obtido no tubo que não recebeu a droga (morte induzida pelo imatinibe - morte espontânea no controle).

### 3.10 Citometria de fluxo

As amostras de pacientes e de linhagens celulares foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo Cyan ADP utilizando o programa Summit v4.3 (DAKO; Glostrup, DK). De cada tubo foram adquiridas, no mínimo, 10.000 células vivas. O critério de viabilidade celular utilizado foi baseado nos padrões de tamanho (*forward scatter* - FSC) e granulosidade (*side scatter* - SSC). A análise das amostras de paciente e de indivíduos saudáveis foi realizada em todas as populações de leucócitos.

A análise da expressão das proteínas de efluxo foi calculada através da razão entre as médias de intensidade de fluorescência (RIF) das células incubadas ou não com anticorpo monoclonal como demonstrado na Tabela 2. Análise semelhante foi empregada no ensaio de detecção da atividade das bombas de efluxo Pgp e BCRP (Tabela 2). Para cada ensaio foi utilizado um ponto de corte para positividade, baseado em experimentos realizados com linhagens celulares ou em amostras de indivíduos saudáveis.

Não foi possível padronizar a detecção da expressão das proteínas BCRP (efluxo) e OCT1 (influxo) pelas técnicas de citometria de fluxo nem por *Immunoblotting* devido à presença de ligações inespecíficas pelos anticorpos utilizados (citometria de fluxo) e pela falta de sensibilidade da técnica (*Immunoblotting*).

**Tabela 2. Análise dos dados obtidos em citometria de fluxo.**

| Ensaio realizado | Análise no citômetro |
|---|---|
| Expressão de proteínas | $RIF = \frac{MIF\ (anticorpo)}{MIF\ (autofluorescência)}$ |
| Ensaios funcionais | $RIF = \frac{MIF\ (fluorocromo + modulador)}{MIF\ (fluorocromo)}$ |

RIF, razão entre médias de intensidade de fluorescência; MIF, média de intensidade de fluorescência.

### 3.11 Immunoblotting

Essa técnica foi utilizada para avalição dos níveis de CrkL fosforilado antes e após o tratamento com imatinibe de células de pacientes e das linhagens celulares. As amostras foram preparadas por lise direta de $5x10^6$ células, em 20 µl de tampão de ressuspensão (40mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM EDTA) e 20 µl de SDS (dodecil sulfato

de sódio a 10%). Após serem aquecidas a 100°C por 15 minutos, a quantidade total de proteína foi dosada utilizando-se o kit *DC protein assay* (BIO-RAD) segundo o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) e de acordo com instruções do fabricante.

Após a dosagem de proteínas, 10 μl de tampão *loading* (115 mM Tris-HCl pH 6.8; 15% SDS; 10% de glicerol; 100 mM de 2-β-mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol) foi adicionado à amostra (50 μg de proteínas totais) que foi então, submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). O gel é composto por um gel de separação preparado em tampão contendo 1,5 M tris-HCl pH 8,8 e 0,4% de SDS e o gel de empilhamento a 3% em tampão 0,5 M tris-HCl pH 6,8 e 0,4% de SDS. Foi utilizado tampão de corrida com 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 200 mM de glicina e 1% de SDS. A eletroforese das proteínas foi feita a 70 V por 18 horas.

Após a eletroforese as bandas proteicas foram transferidas por 3 horas para a membrana de nitrocelulose em uma cuba semi-úmida (Hoeffer-Scientific), utilizando-se tampão com 25 mM de tris, 193 mM de glicina e 20% de metanol. O tempo de transferência foi de 3 horas. A transferência foi feita em cuba semi-úmida (Hoeffer-Scientific). Após a transferência, a membrana foi incubada por 2 horas em tampão de bloqueio (soro albumina bovina (BSA) a 5% em tampão (TBS) 10 mM de tris-HCl pH 7,4 e 0,9% de NaCl) a temperatura ambiente sob agitação leve. Depois, a membrana foi lavada por 3 vezes em tampão TBS-T(10mM de tris-HCl pH 7,4, 0,9% de NaCl e 0,2% de tween 20) por 5 minutos. A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-pCrkL (1:500; Cell Signaling; Danvers, MA, US) ou anti-β-actina (1:5000; Sigma-Aldrich: St Louis, MO, US), por 16 horas em geladeira (2 a $8^0$C). A membrana foi lavada por 3 vezes (5 minutos em cada lavagem) em tampão TBS-T, com agitação leve e à temperatura ambiente e incubada com os anticorpos secundários ligados à peroxidase (*goat anti-rabbit* para o anti-pCrkL e *rabbit anti-mouse* para o anti-β-actina),

por 2 horas a temperatura ambiente e sob leve agitação. A seguir, a membrana foi lavada por 4 vezes de 10 minutos em tampão TBS-T. A presença da proteína foi detectada mediante reação do anticorpo conjugado à peroxidase com o sistema quimioluminescente ECL (ECL Western Blotting Analysis System; GE Healthcare). A membrana foi então, exposta ao filme de raio X (Mamo-M Kodak) por 30minutos. A revelação foi feita em reveladora de raio-X (Kodak).

Após a revelação, as bandas foram quantificadas por densitometria usando o programa VisionWorks. A expressão da proteína pCrkL, foi normalizada pela expressão da proteína constitutiva β-actina.

Para a análise da redução dos níveis de expressão da proteína CrkL sob a forma fosforilada (pCrkL), primeiro foi avaliado o nível de expressão de pCrkL em cada amostra e em seguida calculado o nível de redução da proteína pCrkL nas amostras tratadas comparando-se amostras tratadas com as não tratadas (controle).

### 3.12 Extração de RNA pelo Método TRIzol e Síntese de cDNA

Aproximadamente $5x10^6$ células isoladas de pacientes com LMC foram lavadas 3 vezes com PBS e preservadas em 1 mL Trizol (Invitrogen) a -80º C. Para extração do RNA, cada amostra foi colocada a temperatura ambiente por 5 minutos para descongelamento. Em seguida, foram adicionados 200 μL de clorofórmio em cada amostra, sendo estas agitadas manualmente por alguns segundos e incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente. Prosseguindo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4º C, e a fase aquosa (sobrenadante) foi cuidadosamente retirada para evitar contaminação com DNA. O RNA, de cada amostra foi então precipitado pela adição de 500 μL de isopropanol e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4º C. O

*pellet* de RNA de cada amostra, foi lavado através da remoção do sobrenadante e adição de 1 mL de etanol 75% seguido de centrifugação a 7500 g por 5 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi desprezado e após secar, o RNA foi dissolvido em 30 µL água Milli-Q estéril, homogeneizado e desnaturado a 60º C por 10 minutos.

Ao final do procedimento explicado acima, o RNA foi quantificado (NanoDrop 1000 Spectrophotometer Thermo Scientific) e 1µg deste foi utilizado para a síntese de uma fita única de cDNA como recomendado pelo fabricante do Kit Primed First-Strand Ready-to-Go (GE Healthcare).

### 3.13 PCR em Tempo Real

A expressão relativa do RNAm dos genes *SLC22A1* (gene que codifica a proteína OCT1), *ABCB1* (gene que codifica a proteína Pgp) e *ABCG2* (gene que codifica a proteína BCRP) foi determinada por PCR em Tempo Real através do método Taqman (TaqMan® Gene Expression Assay - Applied Biosystems). Os genes-alvo foram normalizados pelo gene constitutivo β-glucuronidase (*GUSB*), quantificados através do método ΔΔCt e comparados às amostras de RNA total de células mononucleares de indivíduos saudáveis. Neste método utiliza-se, além de um par de *primers* específicos, uma sonda marcada com um fluorocromo, que se anela a uma sequência específica na região a ser amplificada. A sonda contém na região 5' um fluoróforo e na região 3' uma molécula *quencher*, que armazena a energia luminosa liberada pelo fluoróforo e a dissipa na forma de luz. A sonda é degradada durante o processo de amplificação do gene-alvo, devido à atividade exonuclease 5'-3' da Taq DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente, o que permite a liberação de fluorescência que será captada pelo aparelho, ao final de cada ciclo de amplificação. Quando há a formação de um produto o aparelho transforma a

fluorescência liberada em um sinal gráfico (curva) proporcional ao produto amplificado, podendo ser visualizada em uma tela, e atualizada a cada ciclo de amplificação.

Foi utilizado o software Opticon Monitor 2 e a expressão relativa foi determinada utilizando a comparação entre as variações de CT - limiar do ponto de inflexão da curva de amplificação dos produtos (passagem para a fase exponencial), das amostras para o gene alvo e o gene constitutivo, em relação á amostra referência.

### 3.14 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do *software* Graph Pad Prism 4.0. Foram realizados os testes do Qui-quadrado e o teste exato de Fischer. Os valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## 3.15 Desenho experimental do estudo

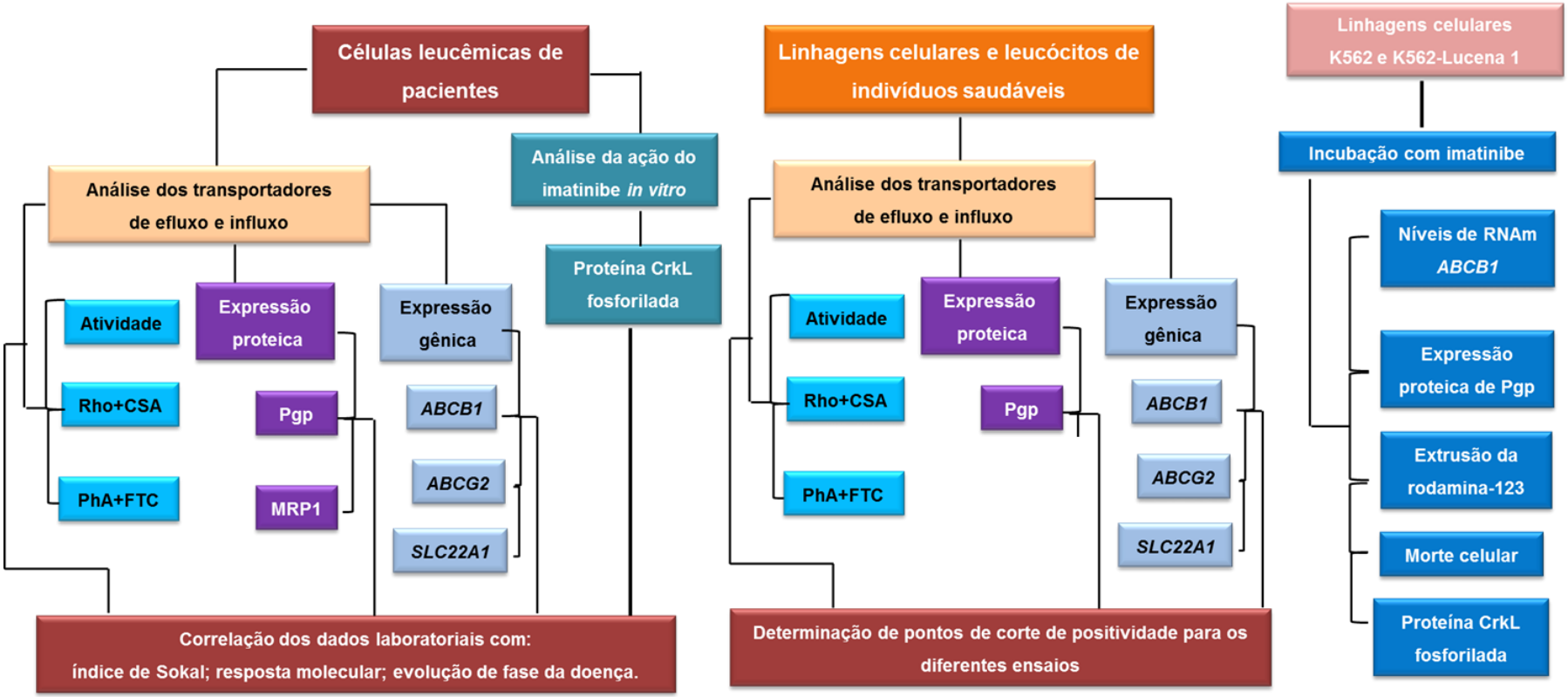



**Figura 6. Fluxograma ilustrando o desenho experimental do estudo.**

# IV. RESULTADOS

# 4. RESULTADOS

Para traçarmos o perfil de expressão e atividade das proteínas transportadoras de efluxo e influxo de drogas na LMC foram realizadas diferentes abordagens laboratoriais e os resultados organizados em seis tópicos.

Na primeira parte deste trabalho mostramos resultados com linhagens celulares que superexpressam os transportadores Pgp, MRP1 ou BCRP, utilizadas como ferramentas para avaliarmos a especificidade dos ensaios visando a detecção da atividade das proteínas transportadoras de efluxo de drogas. Além disto, foi traçado o perfil de MDR em amostras de indivíduos saudáveis.

Na segunda parte, apresentamos os resultados da expressão e da atividade dos transportadores de efluxo Pgp e MRP1 em amostras de pacientes leucêmicos. Este estudo contou com 245 amostras de 158 pacientes com diagnóstico de LMC, sendo que em alguns desses pacientes, as amostras foram analisadas em mais de um momento durante o curso da doença.

Na terceira parte de nosso estudo introduzimos a avaliação da atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP. A análise da atividade da BCRP, em 55 amostras de pacientes, foi realizada através de um ensaio descrito como específico para a avaliação da atividade desta proteína (ensaio PhA+FTC).

Um trabalho mostrou a existência de correlação entre os níveis dos RNAm *ABCB1*, *ABCG2* e *SLC22A1* (WANG *et al.*, 2008) e a resposta terapêutica em pacientes com LMC. Portanto, na quarta parte deste estudo avaliamos a presença dos referidos RNAm em amostras de pacientes com LMC, analisadas antes do recebimento de tratamento clínico. Neste estudo, que foi retrospectivo e prospectivo, foi possível armazenar células leucêmicas de 63 pacientes para a extração de RNAm. Em algumas amostras foi possível analisar também a expressão da proteína Pgp.

Na quinta parte do estudo, analisamos as linhagens celulares derivadas da LMC tratadas com imatinibe visando verificar uma possível influência deste fármaco na expressão e atividade da Pgp. Foi analisada também a ação do imatinibe como modulador e como substrato da proteína transportadora de efluxo Pgp.

A diferença de resposta entre a linhagem sensível (K562) e a resistente (K562-Lucena 1) ao imatinibe foi explorada na sexta parte deste estudo. As linhagens foram utilizadas como ferramentas para a análise da inibição da atividade TK da proteína BCR-ABL através da redução dos níveis da proteína pCrkL, mediante o tratamento com diferentes concentrações de imatinibe. A partir da padronização desse teste, foram realizados ensaios em amostras de pacientes com LMC coletadas de forma prospectiva para análise do perfil de sensibilidade ao imatinibe *in vitro* e antes do tratamento clínico. Foram analisadas 17 amostras de pacientes com LMC nesta última parte do trabalho.

# 4.1 PARTE I

## 4.1.1 Atividade e expressão dos transportadores de efluxo em linhagens tumorais

### 4.1.1.1 Atividade dos transportadores de efluxo através do ensaio Rho+CSA em linhagens tumorais

A linhagem K562-Lucena 1 Pgp positiva (RUMJANEK *et al*., 2001) (Figura 7) foi utilizada como controle positivo do ensaio Rho+CSA apresentando valor médio de RIF igual a 4,00. A linhagem MCF7/FLV500, que expressa o transportador de efluxo BCRP (ROBEY *et al.*, 2001), apresentou valor médio de RIF igual a 1,00 semelhante à linhagem K562 que não expressa nenhum dos dois (Pgp e BCRP) transportadores de efluxo (Figura 7).

O valor de RIF da linhagem K562 no ensaio Rho+CSA foi utilizado como referência para determinar a ausência de detecção de atividade da Pgp neste ensaio. Amostras com valores de RIF iguais ou maiores do que 1,1 foram consideradas com atividade funcional positiva para o ensaio Rho+CSA segundo estudos prévios de nosso grupo (VASCONCELOS *et al*., 2007).

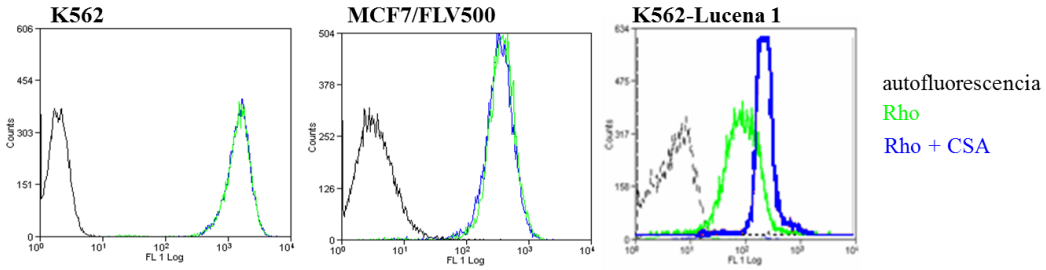



**Figura 7. Demonstração da atividade da proteína transportadora de efluxo glicoproteína P (Pgp)**. O fluorocromo Rodamina 123 (Rho) associado ao agente modulador Ciclosporina A (CSA) foi utilizado para detectar a atividade da proteína Pgp. As linhagens celulares K562 e MCF7/FLV500 não apresentaram atividade da Pgp. Na linhagem K562-Lucena 1 é possível observar um deslocamento do gráfico para a direita nas células incubadas com Rho+CSA (**em azul**) em relação às células incubadas apenas com Rho (**em verde**).

#### 4.1.1.2 Atividade dos transportadores de efluxo através do ensaio PhA+FTC em linhagens tumorais

Linhagens celulares foram utilizadas para padronizar o ensaio PhA+FTC. A linhagem MCF7/FLV500, que expressa o transportador de efluxo BCRP, mas não a proteína transportadora Pgp, exibiu o valor de RIF igual a 4,06 (Figura 8). As linhagens leucêmicas K562 e K562-Lucena1 também foram avaliadas e apresentaram RIF igual a 1,0 (Figura 8).

Os valores de RIF obtidos no ensaio PhA+FTC na linhagem leucêmica K562 serviram para caracterizar um padrão da ausência de atividade através deste ensaio. Ficou estabelecido como ponto de corte de positividade para o ensaio PhA+FTC um RIF maior do que 1,0 na análise por citometria de fluxo.

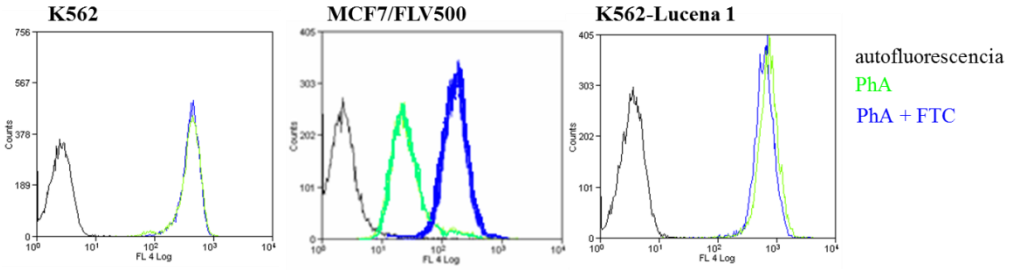



**Figura 8**. **Demonstração da atividade da proteína transportadora de efluxo proteína da resistência no câncer de mama (BCRP).** O fluorocromo *pheophorbide A* (PhA) associado ao agente modulador fumitremorgim C (FTC) foi utilizado para detectar a atividade da proteína BCRP. Os gráficos são representativos dos experimentos obtidos nas linhagens tumorais analisadas em citômetro de fluxo e expressos sob a forma de razão entre as médias de intensidades de fluorescência (RIF) das células com fluorocromo e com fluorocromo+modulador.

#### 4.1.1.3 Expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp em linhagens tumorais

A expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp foi analisada nas linhagens K562, K562-Lucena 1 e MCF7/FLV500 por citometria de fluxo.

Conforme descrito em materiais e métodos e na Tabela 2, os resultados foram expressos sob a forma de razão entre a MIF das células incubadas com anticorpo e a MIF das células sem anticorpo (autofluorescência). Todas as linhagens foram testadas no mínimo três vezes. A RIF da mediana da expressão na linhagem K562-Lucena 1 foi igual a 3,07, enquanto as demais linhagens exibiram RIF menor que 1,1 (Figura 9).

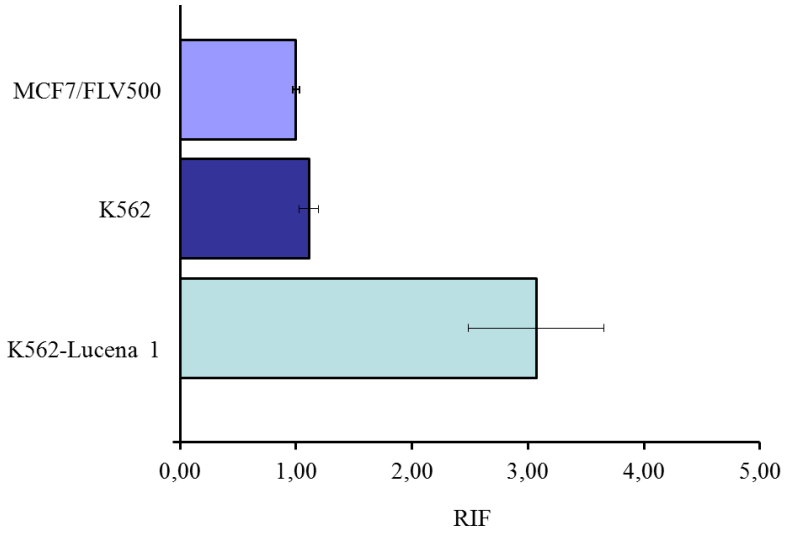



**Figura 9**. **Expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp nas linhagens tumorais K562, K562-Lucena 1 e MCF7/FLV500.** Resultados apresentados sob a forma de razão entre as médias de intensidade de fluorescência (RIF) das células incubadas com e sem anticorpo. Expressão de Pgp foi detectada apenas na linhagem celular K562-Lucena 1.

### 4.1.2 Proteínas transportadoras de efluxo em amostras de indivíduos saudáveis

#### 4.1.2.1 Atividade dos transportadores de efluxo através dos ensaios Rho+CSA e PhA+FTC em amostras de indivíduos saudáveis

Leucócitos totais de indivíduos saudáveis obtidos por lise direta de hemácias foram analisados pelos ensaios Rho+CSA (n=14), PhA+FTC (n=10) e de detecção da expressão da proteína Pgp (n=19). Após a realização das respectivas condições de incubações dos ensaios, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

Os leucócitos analisados através do ensaio PhA+FTC tiveram valor médio de RIF igual a 1,00 caracterizando a ausência de atividade nestas amostras (variação da RIF = 1,00 a 1,01; Figura 10A). Entretanto, quando as mesmas amostras foram estudadas pelo ensaio Rho+CSA, a atividade de transportadores de efluxo foi detectada em todas as amostras (variação da RIF = 1,11 a 1,74). Estes dados levantaram a hipótese de que nas amostras de indivíduos saudáveis os ensaio Rho+CSA e PhA+FTC detectam a atividade de diferentes proteínas transportadoras de efluxo. Avaliamos em seguida a expressão da proteína Pgp em 19 amostras de indivíduos saudáveis onde observamos positividade em todas elas (Figura 10)**.** Todas as amostras expressaram a proteína Pgp (Figura 10B) e foram positivas no ensaio Rho+CSA (Figura 10A). A positividade em ambos os ensaios não foi acompanhada por uma correlação entre os níveis de expressão da Pgp e a detecção de atividade pelo ensaio Rho+CSA (r = -0,3333, *p* = 0,4279, teste de Spearman).

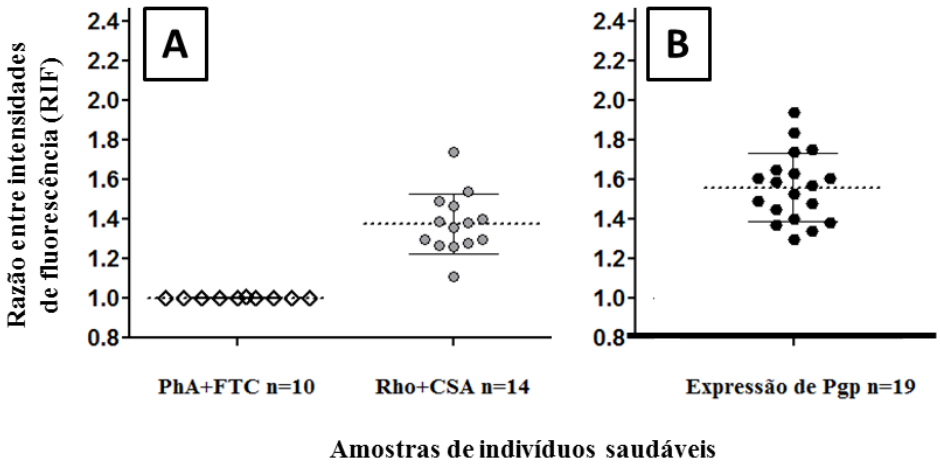



**Figura 10. Atividade funcional dos transportadores de efluxo e expressão da proteína Pgp em amostras de indivíduos saudáveis. A]** Amostras analisadas pelos ensaios Rho+CSA (fluorocromo rodamina associado ao modulador ciclosporina) e PhA+FTC (fluorocromo *pheophorbide* associado ao modulador fumitremorgim C). **B]** Amostras analisadas com o anticorpo monoclonal UIC2 fluorescente para a detecção da proteína Pgp. As barras nos gráficos representam a média e o desvio padrão encontrados. O número de amostras estudadas (n) em cada ensaio está indicado nos gráficos.

# 4.2 PARTE II

## 4.2.1 Expressão e atividade das proteínas transportadoras de efluxo Pgp e MRP1 em amostras de pacientes com LMC

O papel da Pgp na resistência ao imatinibe é controverso e os dados sobre o papel da MRP1 na resistência ao imatinibe são escassos. Visando ampliar o conhecimento acerca da MDR em amostras de pacientes com LMC, neste tópico foram descritos o perfil de expressão e de atividade da Pgp e da MRP1 em amostras de pacientes com LMC.

### 4.2.1.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes com LMC

Foram analisadas 245 amostras procedentes de 158 pacientes com LMC. As características clínicas e demográficas dos pacientes são mostradas na Tabela 3. A idade média dos pacientes foi de 43 anos (variação: 1- 81). Houve uma maior proporção de indivíduos do gênero masculino em relação ao gênero feminino (93:65). Segundo o sistema de pontuação de Sokal, o maior número de pacientes foi categorizado como baixo risco (n = 63), seguido por risco intermediário (n = 48) e alto risco (n = 34). Em 13 casos, não foi possível obter a informação sobre o escore de Sokal.

Nesta parte do estudo, as amostras da FC foram divididas em fase crônica inicial (FCI) e fase crônica tardia (FCT). As amostras na FCI dos pacientes foram obtidas na época do diagnóstico, ou seja, antes do tratamento para a LMC. As amostras obtidas na FCT eram de pacientes que haviam sido diagnosticados há mais de 12 meses, mas que ainda estavam na FC, tendo recebido ou não tratamento prévio e que não apresentavam resposta citogenética ou molecular na ocasião do presente estudo. As amostras dos pacientes nas FA e FB foram agrupadas e denominadas como fase avançada. Deste modo, obteve-se uma proporção mais homogênea de amostras em cada categoria: 102

amostras na FCI, 70 amostras na FCT e 73 amostras na fase avançada (acelerada e blástica).

**Tabela 3. Características demográficas e clínicas dos pacientes com leucemia mielóide crônica analisados para a expressão de glicoproteína P (Pgp) e da proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas (MRP1).**

| Características | Número (%) |
|---|---|
| Todos os pacientes | 158 |
| Todas as amostras [a] | 245 |
| Idade ao diagnóstico (anos) | |
| ≤ 30 | 35 |
| 31-55 | 80 |
| ≥ 56 | 43 |
| Gênero | |
| Masculino | 93 (58,9) |
| Feminino | 65 (41,1) |
| Índice de Sokal | |
| Baixo | 63 (39,9) |
| Intermediário | 48 (30,4) |
| Alto | 34 (21,5) |
| Não especificado | 13 (82,2) |
| Fase da LMC | |
| Crônica inicial | 102 (41,6) |
| Crônica tardia | 70 (28,6) |
| Acelerada | 24 (9,8) |
| Blástica | 49 (20,0) |

[a] Alguns pacientes foram estudados em mais de uma fase da LMC.

### 4.2.2 Expressão das proteínas Pgp e MRP1 em amostras de pacientes com LMC

A expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp foi detectada em 196 das 220 amostras (89,09%) independente da fase da LMC. Os níveis da densidade antigênica, avaliados através da RIF variaram amplamente. Embora os níveis mais altos de expressão da Pgp tivessem sido observados nas fases iniciais e avançadas da doença, a mediana da RIF foi encontrada em uma proporção semelhante em todas as fases da

LMC. A mediana da RIF foi de 2,22 (variação: 1,11 - 11,25) na FCI, 2,13 (variação: 1,11 - 6,12) na FCT e 2,10 (variação: 1,19 - 10,73) nas fases avançadas.

A expressão de MRP1 foi observada em 66,7% (98/147) das amostras. Os níveis de densidade antigênica variaram de 1,1 a 13,30. Da mesma forma, como observado na expressão de Pgp, os altos níveis de RIF nas amostras positivas foram observados na FCI (mediana: 2,00; variação: 1,10 - 8,10) e na fase avançada da doença (mediana: 1,50; variação: 1,10 - 13,30). Uma menor variação dos níveis de RIF foi observada na FCT (mediana: 1,40; intervalo: 1,10 - 3,30).

Ao utilizarmos uma escolha arbitrária de RIF para designar níveis baixos ou elevados de expressão positiva das proteínas Pgp ou MRP1, observamos que a percentagem de amostras, exibindo os níveis de expressão proteica mais elevados ou mais baixos de Pgp ($p$ = 0,6276) e MRP1 ($p$ = 0,3756), estava indistintamente presente em todas as fases da LMC (Tabela 4). Níveis baixos ou altos de atividade detectada pelo ensaio Rho+CSA foram significativamente diferentes entre as fases da LMC. O número mais elevado de amostras exibindo o maior nível de atividade pelo ensaio Rho+CSA foi observado na fase blástica ($p$ = 0,0007; Tabela 4).

### 4.2.3 Expressão das proteínas Pgp e MRP1 de acordo com as fases da LMC

Não foi observada diferença significativa no número de casos positivos para a expressão da Pgp em relação as diferentes fases da LMC ($p$ = 0,11), assim como para os casos positivos da proteína MRP1 ($p$ = 0,77). No entanto, houve uma diferença significativa entre o número de amostras positivas para a proteína Pgp (85/95; 89,4%) e para a MRP1 (45/73; 61,6%) na FCI ($p$ = 0,000) (Figura 11A). Não houve diferença entre o número de amostras positivas para as expressões da Pgp e da MRP1 na FCT ($p$ = 0,210), como demonstrado na Figura 11B. Entretanto, observamos diferença

significativa na fase avançada, onde a expressão Pgp foi detectada em 87,5% (56/64) das amostras, enquanto que a expressão da MRP1 foi positiva em 61,8% (21/34) das amostras ($p$ = 0,003; Figura 11C).

**Tabela 4. Níveis da atividade e da expressão das proteínas transportadoras de efluxo segundo as fases da leucemia mielóide crônica**.

| | Negativa N (%) | Baixa *n* (%) | Alta *n* (%) | *p* |
|---|---|---|---|---|
| **Ensaio Rho+CSA (atividade)** | | | | |
| Fase crônica inicial | 40 (39,2) | 58 (56,9) | 4 (3,9) | |
| Fase crônica tardia | 13 (20,0) | 49 (75,4) | 3 (4,6) | 0,0007 |
| Fase acelerada | 8 (33,30) | 14 (58,3) | 2 (8,3) | |
| Fase blástica | 18 (37,50) | 20 (41,6) | 10 (20,8) | |
| **Glicoproteína-P (expressão proteica)** | | | | |
| Fase crônica inicial | 14 (14,9) | 38 (40,4) | 42 (44,7) | |
| Fase crônica tardia | 6 (9,5) | 28 (44,4) | 29 (46,0) | 0,6276 |
| Fase acelerada | 3 (17,6) | 7 (41,2) | 7 (41,2) | |
| Fase blástica | 3 (6,7) | 16 (35,6) | 26 (57,8) | |
| **MRP-1 (expressão proteica)** | | | | |
| Fase crônica inicial | 14 (18,7) | 51 (68,0) | 10 (13,3) | |
| Fase crônica tardia | 10 (24,4) | 26 (63,4) | 5 (12,2) | 0,3756 |
| Fase acelerada | 5 (38,5) | 7 (53,8) | 1 (7,7) | |
| Fase blástica | 8 (34,8) | 10 (43,5) | 5 (21,7) | |

N= o número de amostras negativas; n= o número de amostras positivas; (%) de frequência; $\chi$ 2= teste estatístico utilizado. Alta e baixa= escolha arbitrária da razão entre médias de intensidade de fluorescência (RIF) para designar a expressão ou atividade MDR <2,0 e > 2,0, respectivamente.

### 4.2.4 Atividade dos transportadores de efluxo analisada através do ensaio Rho+CSA em amostras de pacientes com LMC

A atividade das proteínas MDR, analisada através do ensaio Rho+CSA, foi positiva em 157 de 230 (71,2%) amostras. Os valores medianos de RIF para a FCI, FCT, e as fases avançadas da LMC foram muito semelhantes: 1,25, 1,38, 1,35, respectivamente, apesar dos altos níveis de RIF observados na fase avançada (variação: 1,16 - 5,84). Não houve diferença significativa ($p$ = 0,09) entre as amostras positivas no

ensaio Rho+CSA analisadas nas diferentes fases da LMC: FCI (64,2%), FCT (79,4%) e avançada (63,9%) (Figura 11). No entanto, como pode ser observado na Tabela 4, quando um limite arbitrário foi utilizado para designar níveis baixos ou altos para a positividade da atividade, houve uma diferença significativa entre as fases da LMC. O maior número de amostras exibindo os níveis mais elevados de RIF no ensaio Rho+CSA foi observado em amostras na fase blástica ($p$ = 0,0007; Tabela 4).

### 4.2.5 Associações entre a expressão das proteínas Pgp e MRP1 e o ensaio Rho+CSA

A coexpressão das proteínas Pgp e da MRP1 foi observada em 60,7% (85/140) amostras de pacientes. A associação entre a atividade (positividade no ensaio Rho+CSA) e a expressão da proteína Pgp foi observada em 64,41% (143/222) das amostras. Por outro lado, a associação entre a positividade no ensaio Rho+CSA e a expressão da proteína MRP1 foi observada em 48,9% (70/143) das amostras, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p$ = 0,003; Figura 12A).

A expressão das proteínas Pgp e MRP1, associada com a positividade no ensaio Rho+CSA (fenótipo: Pgp+ MRP1+ Rho+), foi observada em 60/140 amostras (42,8%). Quando comparado ao fenótipo: Pgp+ Rho+ (64,4%) observou-se diferença significativa ($p$ = 0,000, Figura 12B). Por outro lado, como visto na Figura 12C, quando o fenótipo Pgp+MRP1+Rho+ foi comparado ao fenótipo MRP1+Rho+ não houve diferença estatística ($p$ = 0,303).

A expressão da Pgp independente de efluxo (Pgp+ Rho-) foi observada em 57/222 amostras de pacientes (25,7%). Este percentual foi cinco vezes maior do que o fenótipo inverso, Pgp-Rho+, observado em somente 4,9% (11/222) das amostras.

A expressão de MRP1, independente de efluxo (MRP1+ Rho-), foi observada em 16,8% (24/143) das amostras enquanto o fenótipo MRP1-Rho+ foi observado em 22,8% (32/143) das amostras.

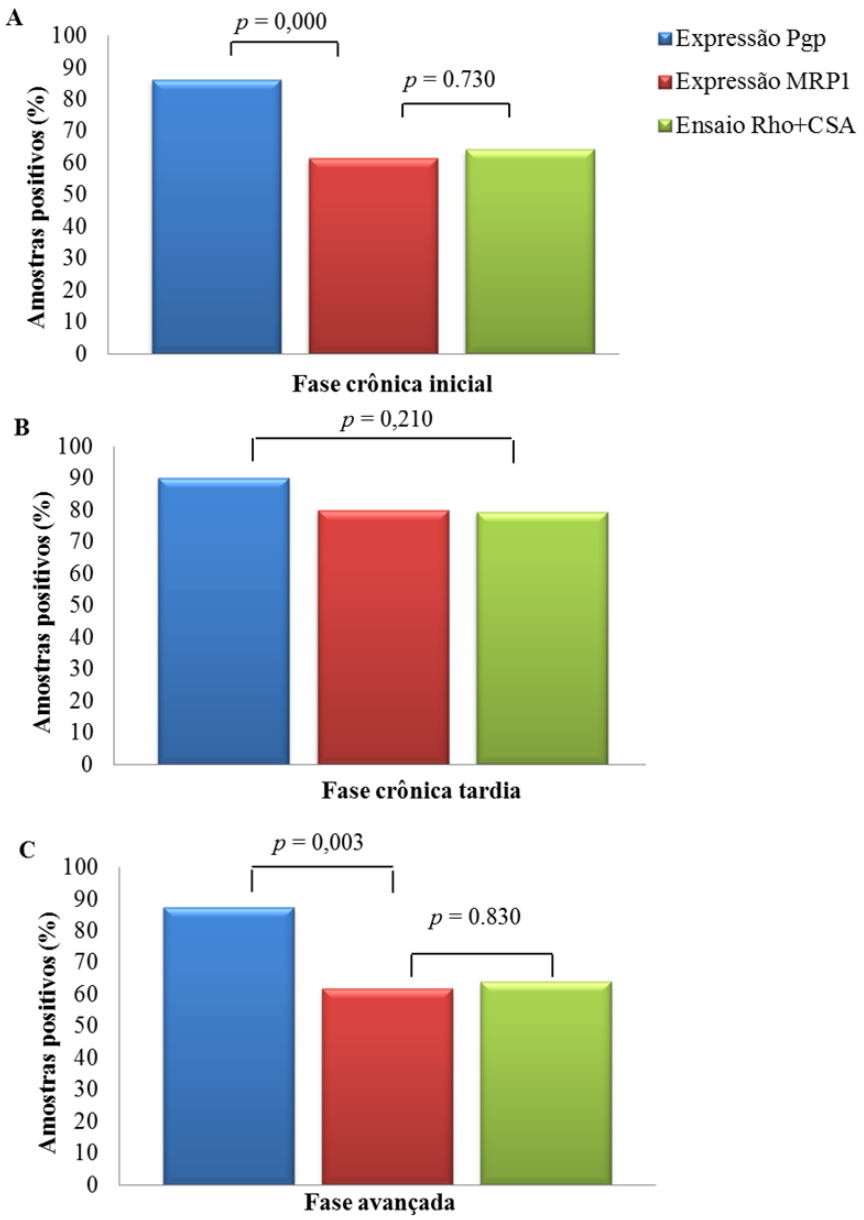



**Figura 11. Frequência de positividade nos ensaios para a detecção da atividade e da expressão de transportadores de efluxo nas diferentes fases dos pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC).** Pgp= glicoproteína P; MRP1= proteína relacionada à MDR; Rho+CSA= fluorocromo rodamina associado ao modulador ciclosporina A. Os resultados foram analisados quanto as suas associações positivas em diferentes fases da LMC. O teste não paramétrico do Qui-quadrado foi utilizado para verificar uma associação entre as características analisadas.

### 4.2.6 Expressão das proteínas Pgp e MRP1 de acordo com o índice prognóstico de Sokal

Não houve diferença estatística entre os escores (baixo, intermediário ou alto) de Sokal e a expressão das proteínas Pgp ($p$ = 0,815) ou MRP1 ($p$ = 0,433) ou o ensaio Rho+CSA ($p$ = 0,703). Entretanto, nas amostras classificadas como baixo risco, houve uma diferença significativa ($p$= 0,001) entre o número de amostras Pgp positivas (38/43; 88,37%) e o número de amostras MRP1 positivas (20/36; 55,55%) (Figura 13A). Além disso, no mesmo grupo foi possível observar uma diferença significativa entre as frequências de positividade através do ensaio Rho+CSA (57,7%) e de expressão da proteína Pgp (88,37%) ($p$= 0,001). Nenhuma diferença estatística foi encontrada em relação às amostras Rho+ e MRP1+ ($p$ = 0,84). Nas categorias de risco intermediário e de alto risco não houve diferença significativa em relação à expressão das proteínas MDR e da positividade no ensaio Rho+CSA (Figura 13B e 13C).

### 4.2.7 Variação dos níveis da expressão da Pgp e da MRP1 de acordo com as fases da LMC e com o tratamento prévio

O próximo passo em nosso trabalho foi investigar se as expressões das proteínas Pgp e MRP1 teriam seus níveis aumentados ou diminuídos devido a evolução da doença e/ou tais alterações estariam relacionadas ao tratamento prévio.

Para esta análise, avaliamos amostras leucêmicas obtidas do mesmo paciente em dois momentos diferentes. Comparado ao primeiro teste, observamos tanto um aumento (20/47; 42,5%) como uma diminuição (27/47; 57,4%) nos níveis de expressão da proteína Pgp quando o segundo teste foi realizado (Tabela 5).

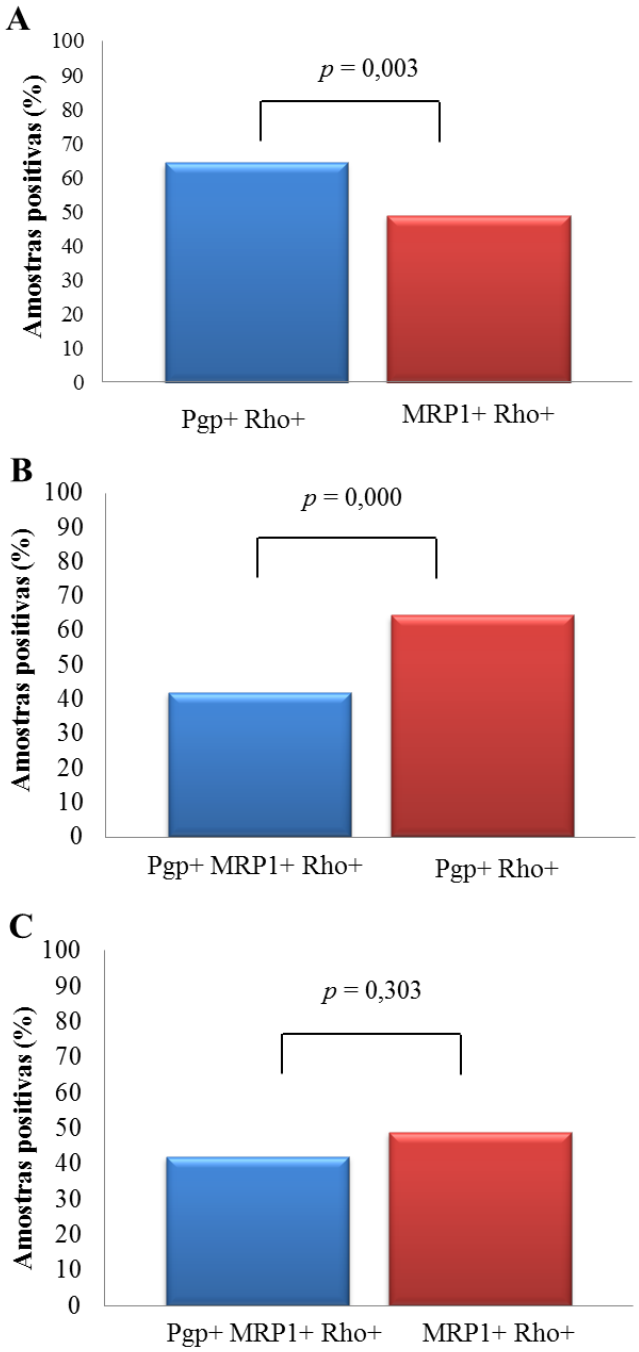



**Figura 12. Frequência de diferentes características do fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) em pacientes com LMC.** A figura mostra a capacidade do fluorocromo rodamina (Rho) em detectar a atividade da proteína glicoproteína P (Pgp) ou da proteína relacionada à MDR (MRP1) em comparação com a sua capacidade para detectar a atividade das duas proteínas associadas. O teste estatístico Qui-quadrado não paramétrico foi utilizado para verificar uma associação entre as características analisadas.

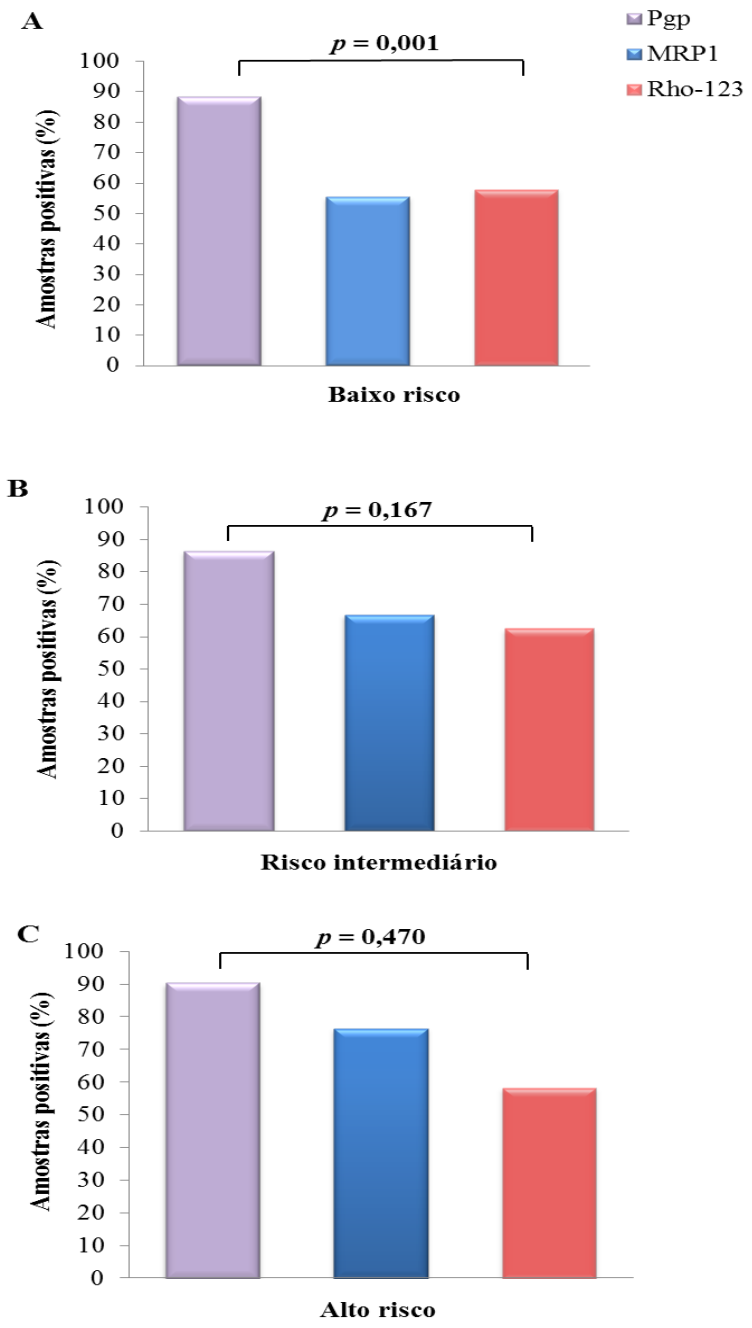



**Figura 13. Frequência da expressão das proteínas e da atividade MDR de acordo com o escore de Sokal.** Foram analisadas a expressão das proteínas transportadoras de efluxo glicoproteína P (Pgp) e proteína relacionada à MDR (MRP1) assim como as suas atividades através do ensaio do fluorocromo rodamina 123 (Rho) associado ao modulador ciclosporina A (CSA). O teste estatístico não paramétrico Qui-quadrado foi utilizado para verificar uma associação entre as características analisadas.

Em 6/23 (26,08%) amostras, os níveis da proteína MRP1 aumentaram em relação ao primeiro teste, e em 10/23 (43,48%) amostras houve redução dos níveis de expressão desta proteína (Tabela 5). Em 7/23 (30,43%) não houve alteração nos níveis proteicos quando o primeiro teste foi comparado com o segundo (Tabela 5).

A atividade dos transportadores de efluxo, analisada através do ensaio Rho+CSA, também foi testada em dois momentos em algumas amostras de pacientes. Um aumento nos níveis da atividade foi observado em 24/45 (53,3%) amostras quando o segundo teste foi realizado (Tabela 5). A diminuição da atividade foi observada em 17/45 (37,7%) amostras e a manutenção dos mesmos níveis de atividade em 4/45 (9%) amostras (Tabela 5).

Os níveis de expressão da Pgp, expressão da MRP1 e da atividade avaliada pelo ensaio Rho+CSA, entre o primeiro e o segundo teste, variaram de maneira semelhante entre as fases da LMC (Tabela 5). As amostras foram estudadas em diferentes momentos: antes do início do tratamento (FCI), na FCT ou fase avançada, diante da refratariedade ao tratamento ou na FCT ou fase avançada. O tempo para o segundo estudo variou amplamente independente do ensaio realizado na amostra (Tabela 5).

**Tabela 5. Expressão da proteína glicoproteína P de acordo com a evolução clínica dos pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC).**

| Fase da LMC | | Expressão da proteína Pgp | | | Expressão da proteína MRP1 | | | | Atividade detectada pelo ensaio Rho+CSA | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Primeiro teste | Segundo teste | Aumentada [a] n/N | Diminuída [a] n/N | Variação do período de tempo (mediana) [b] | Aumentada [a] n/N | Inalterada [a] n/N | Diminuída [a] n/N | Variação do período de tempo (mediana) [b] | Aumentada [a] n/N | Inalterada [a] n/N | Diminuída [a] n/N | Variação do período de tempo (mediana) [b] |
| FCI | FCT | 8/19 | 11/19 | 5-60 (20) | 3/8 | 2/8 | 3/8 | 8-39 (12) | 8/16 | 2/16 | 6/16 | 3-48 (12) |
| FCI | Avançada | 4/8 | 4/8 | 1-72 (13) | 1/5 | 0 | 4/5 | 4-36 (5) | 5/11 | 2/11 | 4/11 | 3-36 (17) |
| FCT | FCT | 4/8 | 4/8 | 1-64 (16) | 0 | 2/3 | 1/3 | 2-7 (6) | 4/5 | 0 | 1/5 | 3-48 (17) |
| FCT | Avançada | 4/12 | 8/12 | 3-28 (14) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/2 | 0 | 1/2 | 27 e 60 |
| FCI | FCI | 0 | 0 | 0 | 1/1 | 0 | 0 | 24 | 1/2 | 0 | 1/2 | 2 e 5 |
| Avançada | Avançada | 0 | 0 | 0 | 1/6 | 3/6 | 2/6 | 1-10 (3,5) | 5/9 | 0 | 4/9 | 1-72 (5) |

FCI= fase crônica inicial; FCT= fase crônica tardia; fase avançada= fase acelerada e fase blástica agrupadas; n= número de amostras exibindo alteração no nível de expressão; N= número total de amostras analisado.

[a] Os pacientes receberam diferentes modalidades de tratamento, incluindo imatinibe, entre a realização dos testes.

[b] A variação do período de tempo do primeiro para o segundo teste foi avaliada em meses.

## 4.3 PARTE III

### 4.3.1 Atividade dos transportadores de efluxo analisada através do ensaio PhA+FTC em amostras de pacientes com LMC

Robey *et al*. (ROBEY *et al*., 2004) propõem que o ensaio PhA+FTC seja específico para a detecção da atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP. Entretanto, nenhum trabalho empregou este ensaio em amostras de pacientes com leucemias, tornando o presente estudo pioneiro nessa abordagem laboratorial em células da LMC de pacientes.

Nesta parte do presente estudo foram utilizados, além do ensaio PhA+FTC, o ensaio Rho+CSA com o objetivo de compararmos os dois métodos quanto à frequência de positividade em amostras de pacientes com LMC.

### 4.3.2 Características clínicas e demográficas dos pacientes com LMC analisados para a atividade da BCRP

Após analisarmos a frequência da atividade e da expressão das proteínas transportadoras Pgp e MRP nas amostras de pacientes, avaliamos a atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP. Foram analisadas 55 amostras leucêmicas de pacientes com LMC: 42 na FC, oito na FA e cinco na FB da doença (Tabela 6). Onze de 55 pacientes receberam algum tipo de tratamento dirigido ao tratamento da LMC antes da coleta da amostra leucêmica para a realização do presente estudo, tais como: IFNα, imatinibe, dasatinibe ou ARA-C, porém os pacientes ainda estavam com doença em atividade na ocasião do estudo. Quarenta e quatro pacientes foram estudados na ocasião do diagnóstico e, portanto, antes do início do tratamento quimioterápico.

A idade dos pacientes variou de cinco a 78 anos com média de 43,51 anos e mediana de 42 anos (Tabela 6). Em 46/55 amostras foi possível realizar o cálculo do

índice de Sokal. Nesse grupo, o índice de Sokal alto foi observado em 15/55 (27,27%) pacientes, enquanto que os riscos intermediário e baixo foram observados em 11/55 (20%) e 20/55 (36,36%) pacientes, respectivamente (Tabela 6).

**Tabela 6. Características demográficas e clínicas dos pacientes com leucemia mielóide crônica analisados quanto à atividade da BCRP.**

| Características | N | (%) |
|---|---|---|
| Idade | | |
| ≤ 30 | 15 | (27,27) |
| 31 -55 | 27 | (49,09) |
| ≥ 56 | 13 | (23,63) |
| Gênero | | |
| masculino | 30 | (54,54) |
| feminino | 25 | (45,45) |
| Raça/cor | | |
| branca | 28 | (50,90) |
| negra | 4 | (7,27) |
| parda | 4 | (7,27) |
| AD | 19 | (34,54) |
| Índice de Sokal | | |
| baixo | 20 | (36,36) |
| intermediário | 11 | (20,00) |
| alto | 15 | (27,27) |
| AD | 9 | (16,36) |
| Fases da doença | | |
| fase crônica | 42 | (76,36) |
| fase acelerada | 8 | (14,54) |
| fase blástica | 5 | (9,09) |

AD = ausência de dados no prontuário médico; BCRP = proteína da resistência em câncer de mama.

### 4.3.3 Atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP

A análise da atividade da proteína BCRP foi realizada através do ensaio PhA+FTC em 55 amostras de pacientes com LMC. O critério utilizado em nosso estudo para definir atividade da proteína BCRP foi baseado nos experimentos realizados com as linhagens celulares como descrito na seção Materiais e Métodos e na parte 1 dos resultados. Consideramos como positividade para o ensaio da atividade da BCRP, quando RIF foi maior do que 1,00.

Os valores de RIF variaram entre 1,0 e 2,32 (média 1,12 e mediana de 1,00) (Figura 14). Em 41,81% (23/55) houve detecção da atividade da BCRP, enquanto a ausência de atividade foi observada em 58,18% (32/55) das amostras.

Os resultados das amostras leucêmicas de pacientes foram comparados com os resultados obtidos em amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis. A positividade no ensaio PhA+FTC foi significativamente maior nas amostras dos pacientes quando comparados com as amostras dos indivíduos saudáveis ($p$=0,0385; teste Mann Whitney; Figura 14) onde a média e a mediana dos valores de RIF foram iguais a 1,00 e nenhuma amostra apresentou RIF maior do que 1,00.

Para avaliarmos o papel da atividade da BCRP, nas amostras de pacientes com LMC, foi feita uma análise confrontando-se este dado com outros que podem conferir pior prognóstico aos pacientes com LMC.

Analisando as amostras nas fases mais avançadas da doença (FA e FB em conjunto) foi possível observar positividade no ensaio PhA+FTC em apenas 5 de 13 (38,46%) amostras. Quando este grupo foi comparado com as amostras de pacientes na FC da LMC, não foi observada diferença estatística significativa ($p$ = 1,0000; teste exato de Fisher; Tabela 7).

A origem do material coletado (sangue periférico ou medula óssea) também não influenciou no resultado do ensaio PhA+FTC. As amostras obtidas a partir de medula óssea exibiram um percentual de positividade (55,55%) semelhante àquelas oriundas de sangue periférico (41,81%) ($p$ = 0,467, teste exato de Fisher; Tabela 7).

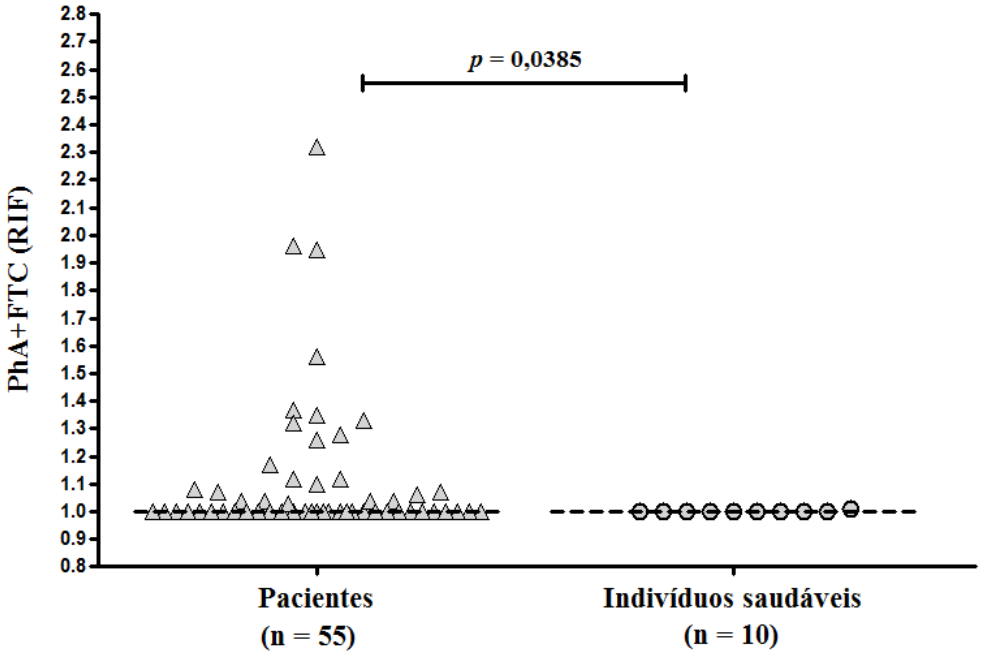



**Figura 14. Atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP em leucócitos de pacientes e de indivíduos saudáveis**. Análise por citometria de fluxo do ensaio PhA+FTC. A linha pontilhada representa a média e as linhas sólidas acima e abaixo representam o desvio padrão. (PhA+FTC = fluorocromo *pheophorbide A* associado ao modulador fumitremorgim C; RIF = razão entre a intensidades de fluorescência). Teste estatístico de Mann Whitney.

A positividade para o ensaio PhA+FTC não mostrou correlação com a idade dos pacientes (r = -0,0655, $p$ = 0,6478, teste de Spearman; Figura 15) e não foi associado ao gênero ($p$ = 0,4098, teste exato de Fisher).

**Tabela 7. Atividade da BCRP segundo as fases da LMC e a origem do material coletado dos pacientes.**

| Ensaio | Resultado | Fase da doença | | tipo de material coletado | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | FA+FB | FC | SP | MO |
| **PhA+FTC** | positivo | 5/13 (38,46%) | 18/42 (42,85%) | 23/55 (41,81%) | 5/9 (55,56%) |
| | negativo | 8/13 (61,53%) | 24/42 (57,14%) | 32/55 (58,19%) | 4/9 (44,44%) |
| | | ***p* = 1,0000** | | ***p* = 0,4670** | |

FA = fase acelerada; FB = fase blástica; FC = fase crônica; SP = sangue periférico; MO= medula óssea; PhA+FTC = fluorocromo *Pheophorbide A* associado ao modulador fumitremorgim C; (teste exato de Fisher).

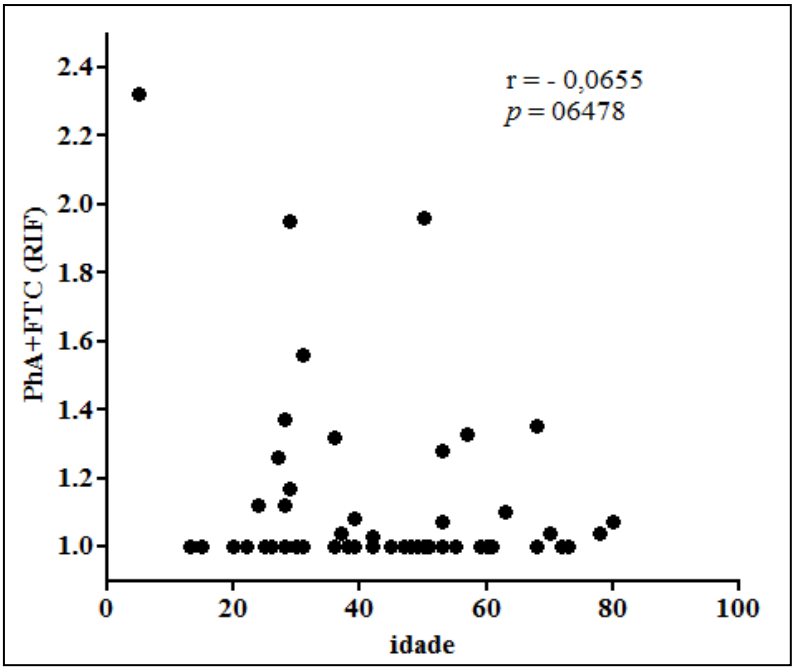



**Figura 15. Análise da correlação entre a atividade dos transportadores de efluxo, detectada pelo ensaio PhA+FTC, e a idade dos pacientes em amostras de leucemia mielóide crônica.**

Para a análise da relação entre a atividade da proteína transportadora BCRP e o índice prognóstico de Sokal, os pacientes com índice alto e intermediário foram reunidos em um mesmo grupo. A maioria das amostras (73,07%) destes pacientes foi negativa para o ensaio PhA+FTC (Tabela 8). Nos pacientes classificados como baixo índice de Sokal metade das amostras foi positiva e a outra metade foi negativa para o ensaio da atividade da BCRP (Tabela 8).

**Tabela 8. Atividade dos transportadores de efluxo, detectada pelo ensaio PhA+FTC, e o índice de Sokal em amostras de pacientes com LMC.**

| **Índice de sokal** | **PhA+FTC** | |
|---|---|---|
| | negativo | positivo |
| Alto + intermediário | 19/26 (73,07%) | 7/26 (26,92%) |
| Baixo | 10/20 (50%) | 10/20 (50%) |
| | *p* 0,1330 | |

PhA+FTC = fluorocromo *pheophorbide A* associado ao modulador fumitremorgim C. Teste estatístico exato de Fisher.

Onze pacientes haviam recebido tratamento (IFNα, imatinibe, DASA ou ARA-C) para a LMC antes da data da realização do presente estudo (denominados como pacientes previamente tratados), mas se tornaram resistentes ou refratários ao tratamento. No intuito de avaliar se a atividade dos transportadores de efluxo, detectada pelo ensaio PhA+FTC, foi influenciada pelo tratamento prévio, esta variável clínica foi confrontada com os resultados do ensaio PhA+FTC.

O ensaio PhA+FTC mostrou atividade da BCRP em 8 de 11 (78%) pacientes previamente tratados. Por outro lado, a positividade no ensaio PhA+FTC foi observada

em 15 de 44 (34,09%) amostras analisadas antes do tratamento clínico, (Figura 16). A positividade no ensaio PhA+FTC foi significativamente maior nas amostras dos pacientes previamente tratados do que naqueles que não haviam recebido tratamento (*p* = 0,0375; teste exato de Fisher; Figura 16).

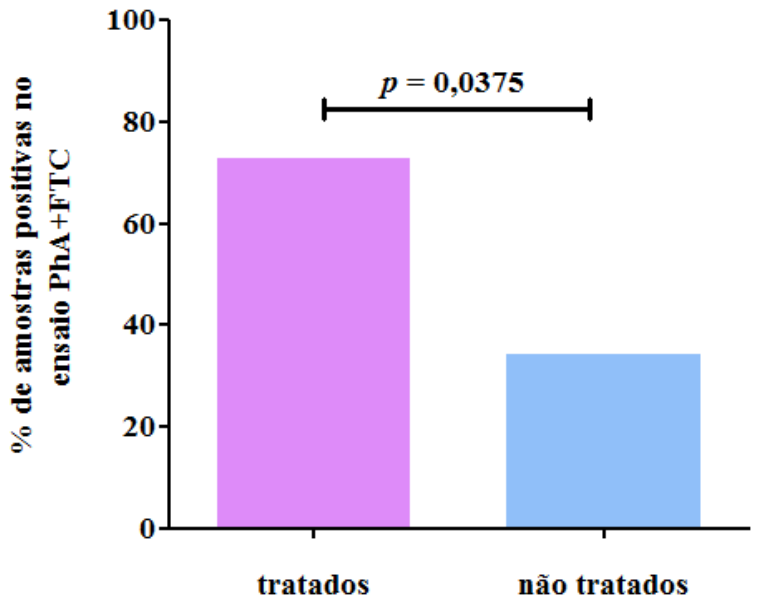



**Figura 16. Atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP em amostras de pacientes previamente tratados e não tratados.** O percentual de positividade para o ensaio PhA+FTC em pacientes com leucemia mielóide crônica, sem tratamento, foi confrontado com as amostras de pacientes previamente tratados (teste exato de Fisher). (PhA+FTC = fluorocromo *Pheophorbide A* associado ao modulador fumitremorgim C).

### 4.3.4 Correlação entre o ensaio PhA+FTC e as proteínas transportadoras de efluxo Pgp e MRP1

Com o objetivo de avaliarmos se o ensaio PhA+FTC seria capaz de detectar a atividade dos transportadores de efluxo Pgp e MRP1, foram analisadas 30 amostras de pacientes por este ensaio e os resultados foram comparados àqueles obtidos no ensaio de detecção da expressão das proteínas por citometria de fluxo.

A positividade no ensaio PhA+FTC ocorreu em 12/30 amostras. A detecção da atividade atribuída ao transportador de efluxo Pgp, mas não ao MRP1 foi observada em uma das 12 amostras de pacientes. (Tabela 9). A positividade no ensaio PhA+FTC associada à expressão de ambas as proteínas Pgp e MRP1 ocorreu em 11/12 amostras (Tabela 9).

Analisando os dados como variáveis contínuas, sem o estabelecimento de pontos de corte, foi possível observar a ausência de correlação entre os ensaios PhA+FTC e a detecção por citometria das proteínas MRP1 (r = 0,1506, *p* = 0,4186, teste de Spearman; Figura 17A ou Pgp (r = 0,1887, *p* = 0,1803, teste de Spearman; Figura 17B).

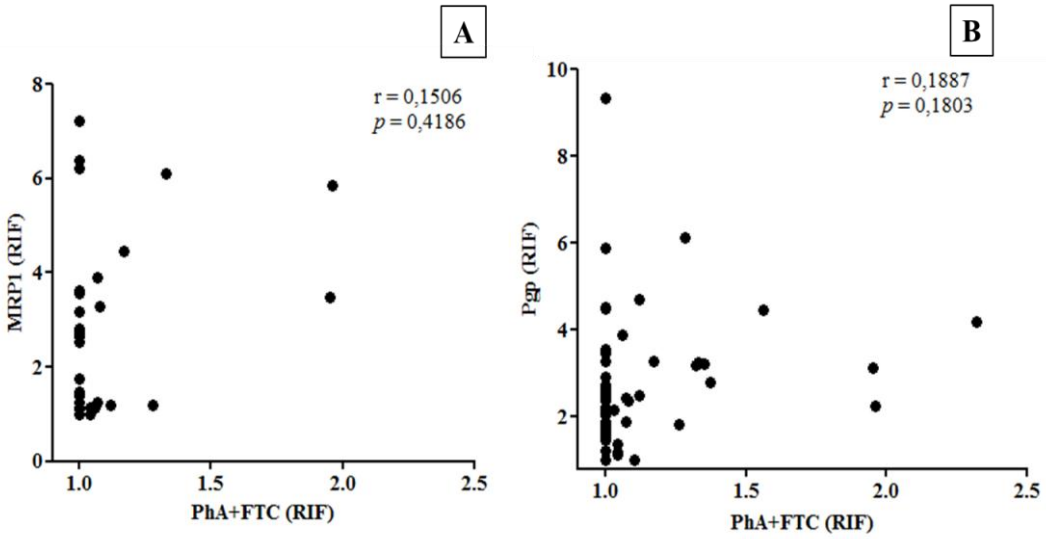



**Figura 17. Análise da correlação entre a expressão dos transportadores de efluxo Pgp e MRP1 com o ensaio PhA+FTC em amostras de pacientes.** A) correlação entre os ensaios de marcação com o anticorpo anti-MRP1 ou o anticorpo anti-Pgp B) e o ensaio PhA+FTC. Teste estatístico Spearman.

**Tabela 9. Associação entre as proteínas transportadoras de efluxo e a positividade no ensaio PhA+FTC em amostras de pacientes com LMC.**

| Nº | PhA + FTC | anti-Pgp | anti-MRP1 |
|---|---|---|---|
| 1 | - | + | - |
| 2 | - | + | - |
| 3 | - | + | - |
| 4 | - | + | + |
| 5 | - | + | + |
| 6 | - | + | + |
| 7 | - | - | + |
| 8 | - | + | + |
| 9 | - | + | + |
| 10 | - | + | + |
| 11 | - | + | + |
| 12 | - | + | + |
| 13 | - | - | + |
| 14 | - | + | + |
| 15 | - | + | + |
| 16 | - | + | + |
| 17 | - | + | + |
| 18 | - | + | + |
| 19 | + | + | - |
| 20 | + | + | + |
| 21 | + | + | + |
| 22 | + | + | + |
| 23 | + | + | + |
| 24 | + | + | + |
| 25 | + | + | + |
| 26 | + | + | + |
| 27 | + | + | + |
| 28 | + | + | + |
| 29 | + | + | + |
| 30 | + | + | + |

Nº= número da amostra do paciente; PhA+FTC= ensaio funcional para avaliar a atividade do transportador BCRP; anti-Pgp= detecção da expressão da proteína glicoproteína-P por citometria de fluxo; anti-MRP1= detecção da expressão da proteína MRP1 por citometria de fluxo.

### 4.3.5 Atividade dos transportadores de efluxo pelos ensaios PhA+FTC e Rho+CSA em amostras de pacientes com LMC

Em 53 pacientes foi possível realizar na mesma amostra, os ensaios PhA+FTC e Rho+CSA da análise da atividade das proteínas transportadoras de efluxo.

Os valores da RIF para o ensaio Rho+CSA variaram entre 1,0 e 7,40 (média: 1,50, mediana: 1,18). A positividade neste ensaio foi caracterizada como RIF acima de 1,10.

A positividade para o ensaio Rho+CSA foi observada em 36/53 (67,92%) amostras sendo esta frequência mais elevada e a diferença estatisticamente significativa quando comparada com o ensaio PhA+FTC que detecta a atividade da BCRP (23/55, 41,81%, $p$ = 0,0074, teste exato de Fisher; Figura18).

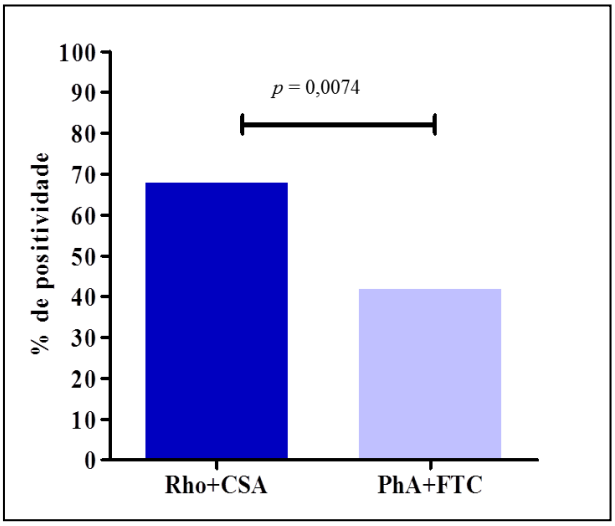



**Figura 18. Frequência de positividade nos ensaios que avaliam a atividade dos transportadores de efluxo.** Foi utilizado o fluorocromo rodamina 123 (Rho) associado ou não ao agente modulador ciclosporina A (CSA). O fluorocromo *pheophorbide A* (PhA) foi utilizado associado ou não ao agente modulador fumitremorgim C (FTC). Teste estatístico exato de Fisher.

Foram analisados os resultados dos ensaios PhA+FTC e Rho+CSA quando testados em uma mesma amostra dos pacientes. A análise pareada revelou que cerca de

30% dos pacientes apresentaram positividade para ambos os ensaios (Tabela 10). Em 20,75% das amostras não foi possível detectar a atividade das proteínas transportadoras de efluxo pelos ensaios Rho+CSA e PhA+FTC (Tabela 10).

A positividade apenas para o ensaio PhA+FTC, que poderia ser associada à atividade da proteína transportadora BCRP, foi observado em 11,32% (6/53) das amostras (Tabela 10). Não houve correlação entre os ensaios Rho+CSA e PhA+FTC ($r$ = -0,0268, $p$ = 0,8486, teste de Spearman).

**Tabela 10. Atividade dos transportadores de efluxo Pgp e BCRP em amostras de pacientes com LMC.**

| | **PhA+FTC $^{+}$** | **PhA+FTC $^{-}$** |
|---|---|---|
| **Rho+CSA $^{+}$** | 16/53 (30,19%) | 20/53 (37,74%) |
| **Rho+CSA $^{-}$** | 6/53 (11,32%) | 11/53 (20,75%) |
| | $p$ = 0,0119 | |

Rho+CSA = fluorocromo associado ao modulador ciclosporina A; PhA+FTC = fluorocromo *pheophorbide A* associado ao modulador fumitremorgim C. Teste estatístico exato de Fisher

### 4.3.6 Associação entre a atividade detectada pelo ensaio PhA+FTC e a resposta molecular ao tratamento clínico com imatinibe

O tipo de resposta ao tratamento clínico com imatinibe foi analisado através do número de transcritos do gene BCR-ABL. Os resultados para este teste foram obtidos nos prontuários dos pacientes. A resposta molecular é caracterizada pela redução no número dos transcritos de BCR-ABL e é classificada em ausência de resposta (RMA), resposta molecular mínima (RMMin), resposta menor (RMMen), resposta maior RMM ou resposta completa (RMC) (Tabela 1). A resposta molecular foi avaliada ao final do 12º mês de tratamento clínico com imatinibe (BACCARANI *et al*., 2009).

Na maioria dos casos, foi somente possível obter o resultado da análise molecular após 12 meses do tratamento clínico com imatinibe. Desta forma, em razão da insuficiência de dados nos prontuários, as análises da resposta molecular após três e seis meses de tratamento com imatinibe não foram incluídas neste estudo (Tabela 11).

Entre as amostras positivas para o ensaio PhA+FTC, 2 de 9 pacientes apresentaram RMmin, 3 de 9 apresentaram RMMen e 3 de 9 apresentaram RMM. Em um paciente não foi possível obter os dados (Tabela 11). Em quatro pacientes cujas amostras foram positivas para os ensaios PhA+FTC e Rho+CSA, somente um apresentou RMMin, dois apresentaram RMMen e um apresentou RMM (Tabela 11).

A análise da resposta molecular foi realizada em 26/43 pacientes cujas amostras foram negativas para o ensaio PhA+FTC. As respostas variaram de RMA (6/23) até completa (2/26) não havendo predomínio de um tipo de resposta molecular (Tabela 11). Em alguns pacientes deste grupo, não foi possível avaliar a resposta molecular devido à interrupção do tratamento por motivos variados. Dois pacientes deste grupo estavam na FB e fizeram uso de imatinibe, entretanto faleceram seis meses após o início do tratamento. Um dos pacientes apresentou intolerância ao imatinibe e o outro foi resistente com evolução para o óbito após seis meses do início do tratamento (Tabela 11). Um paciente apresentou quadro de toxicidade grave causada pelo imatinibe. Nenhum destes pacientes atingiu 12 meses de tratamento e, portanto, não houve avaliação quanto à resposta molecular.

Dos quatro pacientes que apresentaram ausência de resposta molecular após 12 meses de tratamento (e foram analisados na ocasião do diagnóstico) apenas em um de quatro pacientes foi observada alteração na atividade da Pgp, mas não da proteína BCRP (Tabela 11).

**Tabela 11. Características clínicas, atividade das proteínas transportadoras de efluxo e análise da resposta molecular após tratamento clínico com imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica.**

| Amostra | Atividade | | Expressão proteica | | Fase da doença | Tratamento prévio | Resposta molecular |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | PhA+FTC | Rho+CSA | Pgp | MRP1 | | | |
| 1 | 1,00 | 3,59 | 3,88 | 1,14 | FB | IM | * |
| 2 | 1,00 | 2,32 | 3,26 | 6,1 | FB | DX | ** |
| 3 | 1,00 | 1,69 | 1,38 | 1 | FC | DX | *** |
| 4 | 1,00 | 1,00 | 1,62 | 1,00 | FC | DX | ausente |
| 5 | 1,00 | 1,01 | 6,12 | 1,19 | FC | DX | ausente |
| 6 | 1,00 | 1,00 | NR | NR | FA | DX | ausente |
| 7 | 1,00 | 2,37 | 1,18 | 1,14 | FC | DX | ausente |
| 8 | 1,04 | 2,25 | 1,45 | 1,14 | FA | IFN+ARA, IM, DASA | ausente |
| 9 | 1,06 | 1,00 | 2,20 | 1,10 | FC | IFN, IFN+ARA, IM | ausente |
| 10 | 1,00 | 1,20 | 2,72 | 1,00 | FC | DX | completa |
| 11 | 1,00 | 1,34 | 1,00 | 3,16 | FC | DX | completa |
| 12 | 1,00 | 1,27 | 1,88 | 1,26 | FC | DX | maior |
| 13 | 1,00 | 1,21 | 5,89 | 2,72 | FC | DX | maior |
| 14 | 1,00 | 1,00 | 9,33 | 3,59 | FC | DX | maior |
| 15 | 1,00 | 1,10 | 4,71 | 1,18 | FC | DX | maior |
| 16 | 1,00 | 1,00 | NR | 1,24 | FC | DX | maior |
| 17 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,47 | FC | DX | maior |
| 18 | 1,00 | 1,11 | 4,48 | 1,00 | FC | DX | maior |
| 19 | 1,10 | 1,30 | 1,78 | 1,39 | FC | DX | maior |
| 20 | 1,12 | 1,21 | 4,19 | NR | FA | DX | maior |
| 21 | 1,32 | 1,00 | 2,36 | 3,28 | FC | DX | maior |
| 22 | 1,37 | 1,10 | 3,12 | 3,49 | FC | DX | maior |
| 23 | 1,96 | 1,08 | 2,49 | 2,52 | FC | DX | maior |
| 24 | 1,00 | 1,17 | 3,29 | 4,45 | FC | DX | menor |
| 25 | 1,00 | NR | 2,10 | 3,61 | FC | DX | menor |
| 26 | 1,00 | 1,04 | 1,87 | 2,82 | FC | DX | menor |
| 27 | 1,00 | 1,21 | 2,25 | 5,67 | FC | DX | menor |
| 28 | 1,00 | 1,59 | 2,57 | 6,22 | FC | DX | menor |
| 29 | 1,00 | 1,58 | 1,7 | 6,22 | FC | DX | menor |
| 30 | 1,00 | 1,00 | 2,53 | 6,38 | FC | DX | menor |
| 31 | 1,03 | 1,14 | 1,11 | NR | FC | DX | menor |
| 32 | 1,17 | 7,40 | 2,38 | 1,75 | FC | DX | menor |
| 33 | 1,28 | 1,35 | 2,19 | NR | FC | IFN, IM | menor |
| 34 | 1,35 | 1,15 | 2,42 | 3,89 | FC | DX | menor |
| 35 | 1,95 | NR | 3,46 | NR | FC | DX | menor |
| 36 | 1,00 | 1,03 | NR | NR | FA | DX | mínima |
| 37 | 1,04 | 2,04 | 3,27 | NR | FC | IFN, IM | mínima |
| 38 | 1,08 | 1,10 | 3,56 | NR | FC | DX | mínima |
| 39 | 1,26 | 2,48 | 2,66 | NR | FB | DX | mínima |
| 40 | 1,56 | 1,00 | 4,51 | NR | FC | DX | mínima |
| 41 | 1,00 | 1,21 | 2,04 | 2,64 | FA | DX | SD |
| 42 | 1,00 | 1,71 | 1,2 | NR | FA | DX | SD |
| 43 | 1,00 | 1,18 | 1,00 | NR | FC | DX | SD |
| 44 | 1,00 | 1,13 | 2,78 | NR | FC | DX | SD |
| 45 | 1,00 | 1,07 | 1,53 | NR | FA | DX | SD |
| 46 | 1,00 | 1,09 | 3,51 | NR | FC | DX | SD |
| 47 | 1,00 | 1,53 | 2,91 | NR | FB | IFN, IM | SD |
| 48 | 1,00 | 2,38 | 1,83 | NR | FC | IFN, IM | SD |
| 49 | 1,04 | 1,36 | 2,43 | NR | FA | IFN, IM | SD |
| 50 | 1,04 | 2,04 | 2,5 | NR | FB | IM | SD |
| 51 | 1,07 | 1,37 | 4,45 | NR | FC | DX | SD |
| 52 | 1,07 | 1,77 | 2,16 | NR | FC | IM | SD |
| 53 | 1,12 | 1,16 | 3,21 | NR | FC | DX | SD |
| 54 | 1,33 | 1,08 | 3,17 | NR | FC | IFN, IM | SD |
| 55 | 2,32 | 1,00 | 2,61 | NR | FC | DX | SD |

FC= fase crônica; FA= fase acelerada; FB= fase blástica; DX= amostra de paciente ao diagnóstico; IFN= interferon; IM= imatinibe; ARA= arabinosina C; DASA= dasatinibe; NR= ensaio não realizado; PhA+FTC= ensaio funcional para avaliar a atividade dos transportadores de efluxo; Pgp= glicoproteína P;

MRP1= proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas; Rho+CSA= ensaio funcional para avaliar a atividade do transportador Pgp; SD= informação não acessível; *= paciente apresentou resistência clínica, o imatinibe foi descontinuado antes da avaliação de resposta molecular aos 12 meses; **= paciente intolerante ao imatinibe. Alteração do tratamento antes da avaliação de resposta molecular aos 12 meses; ***= paciente apresentou toxicidade grave ao imatinibe. Alteração do tratamento antes da avaliação de resposta molecular aos 12 meses

## 4.4 PARTE IV

### 4.4.1.1 Níveis dos transcritos dos genes *ABCB1, ABCG2* e *SLC22A1* em amostras de pacientes com LMC

Alguns autores demonstraram que a expressão de RNAm dos transportadores de efluxo e influxo (WANG *et al.*, 2008) possuem impacto na resposta clínica ao imatinibe em pacientes com LMC, enquanto outros autores demonstraram o contrário (EECHOUTE *et al*., 2010).

Nesta parte do estudo analisamos o nível de expressão de RNAm, codificado pelos genes *ABCB1*, *ABCG2* e *SLC22A1*, em 63 amostras de pacientes com LMC pelo método de PCR em tempo real. Os genes *ABCB1*, *ABCG2* e *SLC22A1* codificam as proteínas Pgp, BCRP e OCT1, respectivamente.

### 4.4.1.2 Características demográficas e clínicas dos pacientes com LMC

Cinquenta e quatro pacientes estavam na FC e com doença em atividade. Outros cinco pacientes estavam na FA e 4/63 pacientes estavam na FB da LMC (Tabela 12). A idade dos pacientes variou entre 13 e 79 anos, com média de 42,39 anos (Tabela 12).

Em 54 das 63 amostras de pacientes avaliadas foi possível obter informação sobre o índice de Sokal. Aproximadamente 37% dos pacientes apresentaram índice de Sokal de baixo risco e 33% apresentaram índice de Sokal de alto risco (Tabela12). O risco intermediário foi o índice menos frequente dentre os três (15,87%).

#### 4.4.1.3 Níveis dos transcritos do gene *ABCB1* que codifica a proteína Pgp

As amostras de pacientes exibiram níveis significativamente mais baixos do RNAm *ABCB1* do que as amostras de indivíduos saudáveis ($p$ = 0,0011, teste Mann Whitney; Figura 19). As alterações na expressão relativa de *ABCB1*, caracterizadas tanto pelos níveis reduzidos quanto pelos níveis aumentados de RNAm, foram observadas em 94,92% das amostras de pacientes (56/59). A alteração mais frequente foi a redução nos níveis do RNAm *ABCB1* (46/59, 77,96%; Tabela 13). Nestas amostras, a redução variou de 1,1 vezes até aproximadamente 280 vezes menos RNAm de *ABCB1* em relação às amostras de indivíduos saudáveis (Figura 19).

Os níveis aumentados do RNAm *ABCB1* foram observados em 17,95% amostras (10/59), enquanto níveis de RNAm semelhantes aos dos indivíduos saudáveis ocorreram em 3/59 (5,08%) (Tabela 13). O aumento de RNAm nas amostras de pacientes, em relação aos indivíduos saudáveis, variou de 1,3 vezes até 45 vezes mais RNAm *ABCB1* (Figura 20).

**Tabela 12. Características demográficas e clínicas dos pacientes com LMC, analisadas quanto à expressão dos transcritos dos genes *ABCB1*, *ABCG2* e *SLC22A1*.**

| | características | número (%) |
|---|---|---|
| idade | | |
| | variação | 13 ao 79 t |
| | média | 42,39 |
| | mediana | 40 |
| gênero | | |
| | feminino | 32 (52,45) |
| | masculino | 29 (47,54) |
| cor/raça | | |
| | negra/parda | 11 (17,46%) |
| | branca | 42 (68,85%) |
| | AD | 10 (15,87%) |
| Índice de Sokal | | |
| | baixo | 23 (36,50) |
| | intermediário | 10 (15,87) |
| | alto | 21 (33,33) |
| | AD | 9 (14,29) |
| Fase da doença | | |
| | crônica | 54 (85,71) |
| | acelerada | 5 (7,94) |
| | blástica | 4 (6,35) |

AD = Ausência de dados

**Tabela 13. Transcritos do gene *ABCB1* em amostras de pacientes com LMC.**

| Níveis de transcritos de *ABCB1* | Número de amostras |
|---|---|
| Reduzido | 46/59 (77,96%) |
| Basal | 3/59 (5,08%) |
| Aumentado | 10/59 (17,95%) |

As amostras dos pacientes foram categorizadas em níveis de expressão de RNA mensageiro tomando-se como referência a expressão do *ABCB1* em amostras de indivíduos saudáveis.

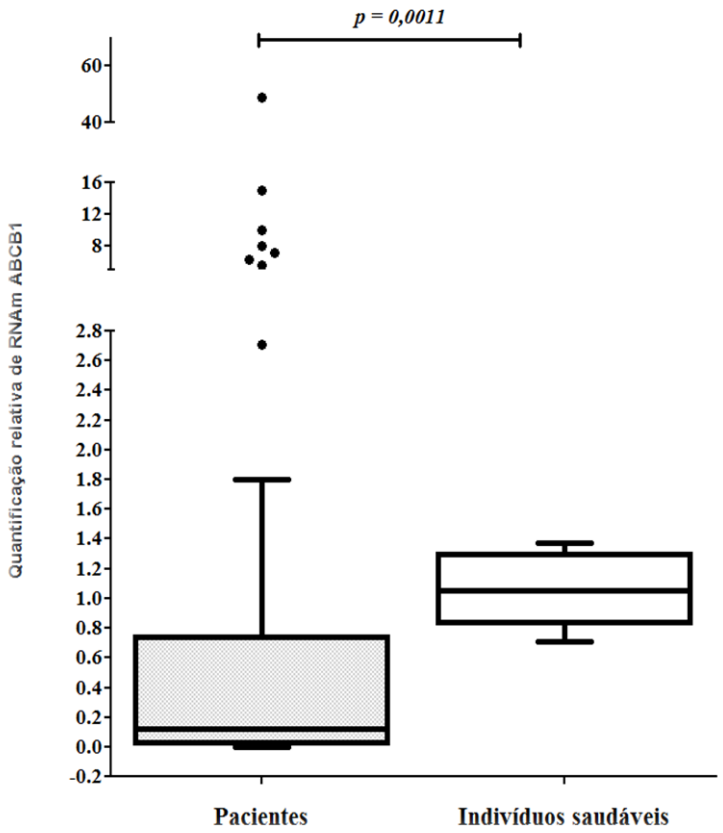



**Figura 19. Quantificação relativa do RNA mensageiro *ABCB1* em amostras de pacientes leucêmicos e em amostras de indivíduos saudáveis**. As amostras foram analisadas pela técnica da PCR em tempo real sendo normalizadas pelo gene constitutivo β-glucuronidase (*GUSB*). Teste estatístico de Mann Whitney.

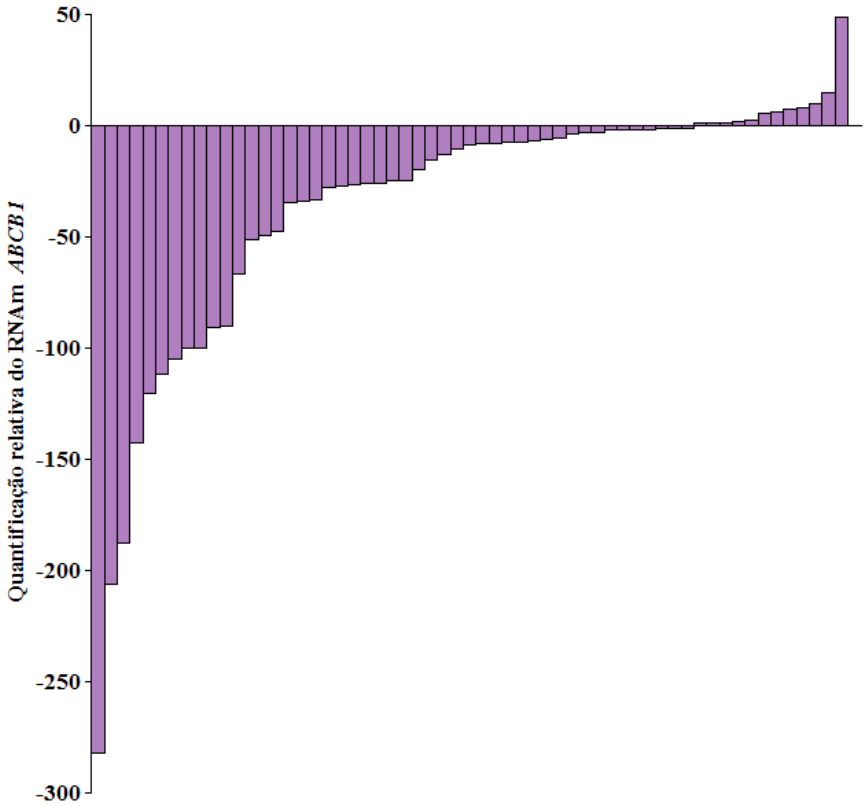



**Figura 20. Níveis de expressão relativa do RNA mensageiro (RNAm) *ABCB1* em amostras de pacientes**. Número de vezes que o RNAm encontrava-se aumentado ou reduzido nas amostras de LMC normalizados em relação à amostra de indivíduo saudável (amostra de referência). Cada barra representa uma amostra de paciente.

### 4.4.1.4 Correlação entre os níveis do RNAm *ABCB1* e da proteína Pgp

A análise pareada de 49 amostras de pacientes demonstrou não haver correlação entre os níveis de RNAm *ABCB1* e da proteína Pgp (r = -0,1089, $p$ = 0,4565, teste de Spearman). Na maioria das amostras foi observada uma relação inversa entre os níveis de RNAm e de proteína. Em 35/49 das amostras (71,42%) os níveis do RNA *ABCB1* estavam reduzidos e os níveis de proteína estavam aumentados (Tabela 14).

Em uma de 49 amostras, os altos níveis de RNAm não se traduziram em altos níveis de proteína, a qual encontrava-se com níveis reduzidos. (Tabela 14).

Em algumas amostras houve concordância entre os níveis de RNAm *ABCB1* e de proteína Pgp. Os níveis aumentados de ambos foram observados em 1,43% (7/49)

das amostras (Tabela 14). Por outro lado, níveis reduzidos de RNAm *ABCB1* e da Pgp ocorreram em 4,08% (2/49) amostras.

**Tabela 14. Correlação entre os níveis proteicos e de transcritos de *ABCB1* em amostras de pacientes com LMC.**

| Níveis de *ABCB1* | Expressão de Pgp | | |
|---|---|---|---|
| | **Reduzido** | **Basal** | **Aumentado** |
| **Reduzido** | 2/49 (4,08%) | 3/49 (6,12%) | 35/49 (71,42%) |
| **Basal** | 0% | 0% | 1/49 (2,04%) |
| **Aumentado** | 1/49 (2,04%) | 0% | 7/49 (1,43%) |

A detecção do RNAm foi feita por PCR em tempo real e a detecção da proteína foi realizada por citometria de fluxo.

#### 4.4.1.4 Níveis dos transcritos do gene *ABCG2*

Os níveis do RNAm *ABCG2* foram analisados em 58 amostras de pacientes com LMC. As amostras não apresentaram diferença estatística significativa quando confrontadas às amostras de indivíduos saudáveis ($p$ = 0,2652, teste de Mann Whitney; Figura 21).

Em 15/58 amostras de pacientes os níveis do RNAm *ABCG2*, que codifica a proteína BCRP, foram semelhantes àqueles observados em amostras de indivíduos saudáveis. O aumento nos níveis de RNAm responderam por 29,31% (Tabela 15) das alterações encontradas. O aumento de RNAm nas amostras dos pacientes variou de 1,2 vezes até 2778 vezes mais RNAm do que nos indivíduos saudáveis (Figura 22).

A redução nos níveis do RNAm *ABCG2* foi a alteração presente no maior número de amostras (26/58, 44,83%; Tabela 15). Algumas amostras de pacientes apresentaram níveis 250 vezes menor de RNAm quando comparados aos indivíduos saudáveis (Figura 21).

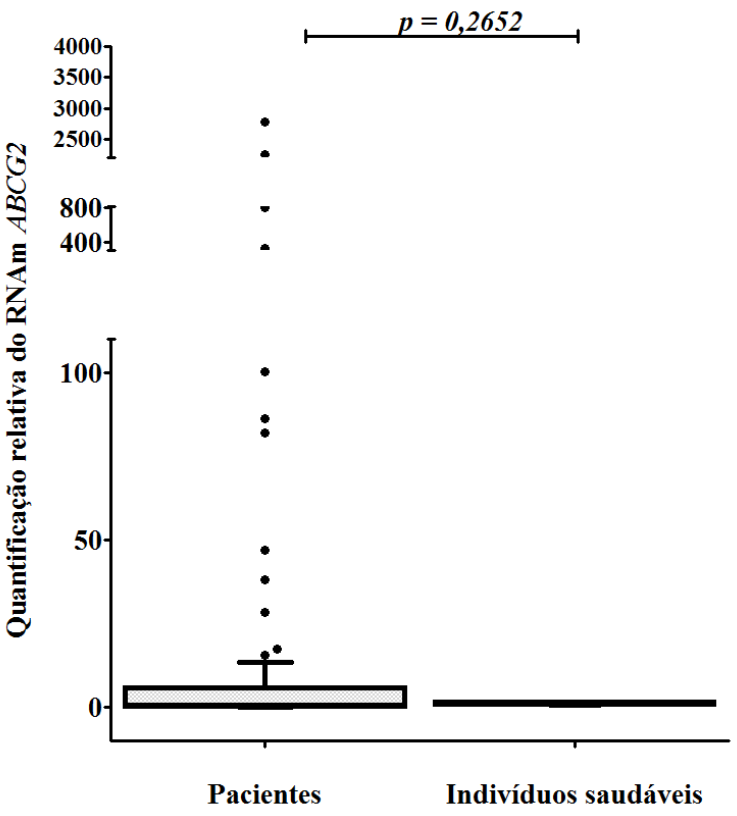



**Figura 21. Quantificação relativa de RNA mensageiro do gene *ABCG2* em amostras de pacientes com LMC e em indivíduos saudáveis**. A quantificação foi feita através da técnica de PCR em tempo real. β-glucuronidase (*GUSB*) foi utilizado como gene endógeno. A linha pontilhada na cor verde representa a mediana dos resultados. O teste estatístico utilizado foi o Mann Whitney.

**Tabela 15. Níveis de RNA mensageiro *ABCG2* em amostras de pacientes com LMC.**

| Níveis de transcritos de *ABCG2* | Número de amostras |
|---|---|
| Reduzido | 26/58 (44,83%) |
| Basal | 15/58 (25,86%) |
| Aumentado | 17/58 (29,31%) |

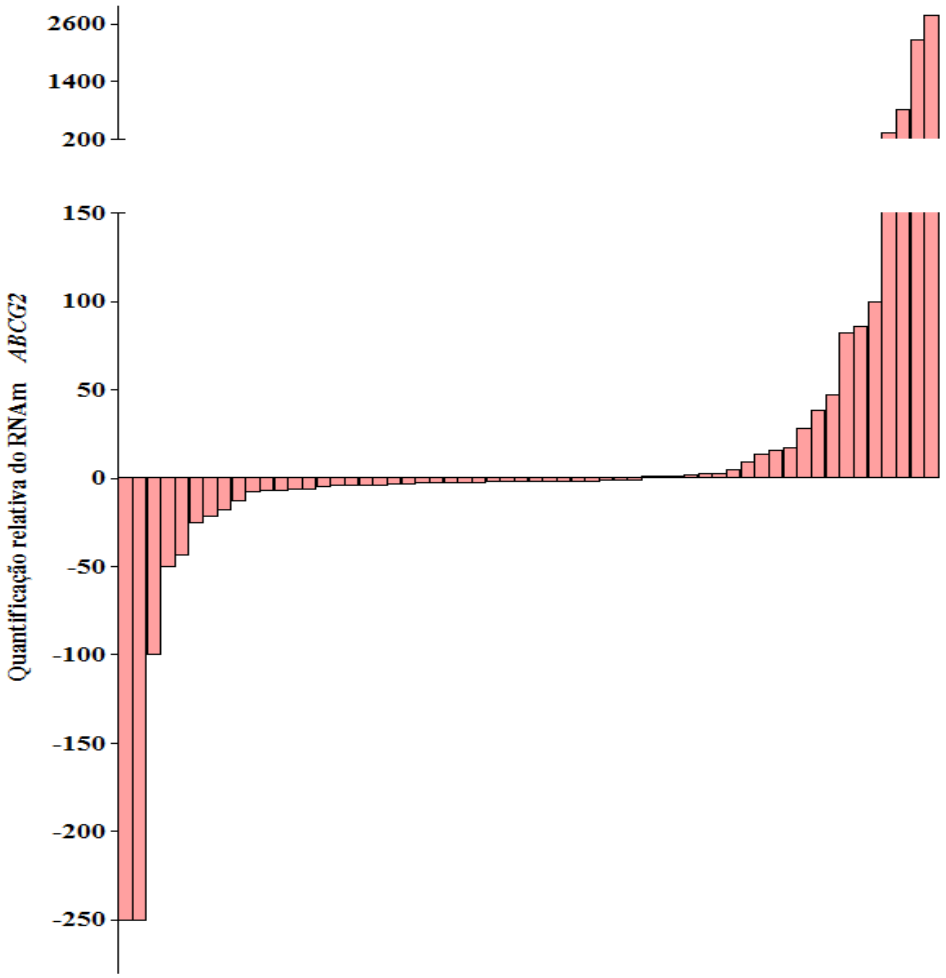



**Figura 22. Níveis de expressão relativa do RNA mensageiro (RNAm) *ABCG2* em amostras de pacientes**. Número de vezes que o RNAm encontrava-se aumentado ou reduzido nas amostras de LMC normalizados em relação à amostra de indivíduo saudável (amostra de referência). Cada barra representa uma amostra de paciente.

### 4.4.1.5 Níveis dos transcritos do gene *SLC22A1*

A análise do gene *SLC22A1* que codifica a proteína transportadora de influxo de drogas OCT1 foi realizada em 57 amostras de pacientes com LMC. As amostras de pacientes tiveram níveis significativamente mais baixos do RNAm *SLC22A1*, quando comparados com as amostras de indivíduos saudáveis ($p$ = 0,0048, teste Mann Whitney; Figura 23). Níveis reduzidos do RNAm *SLC22A1* foram detectados em 78,95% das amostras (45/57; Tabela 16). A redução dos níveis do RNAm *SLC22A1* variou de 1,3 a

525 vezes (Figura 24). Em 14,03% (8/57) das amostras houve aumento dos níveis de RNAm tendo algumas amostras apresentado um aumento de RNA *SLC22A1* cerca de 140 vezes em relação às amostras dos indivíduos saudáveis (Figura 24).

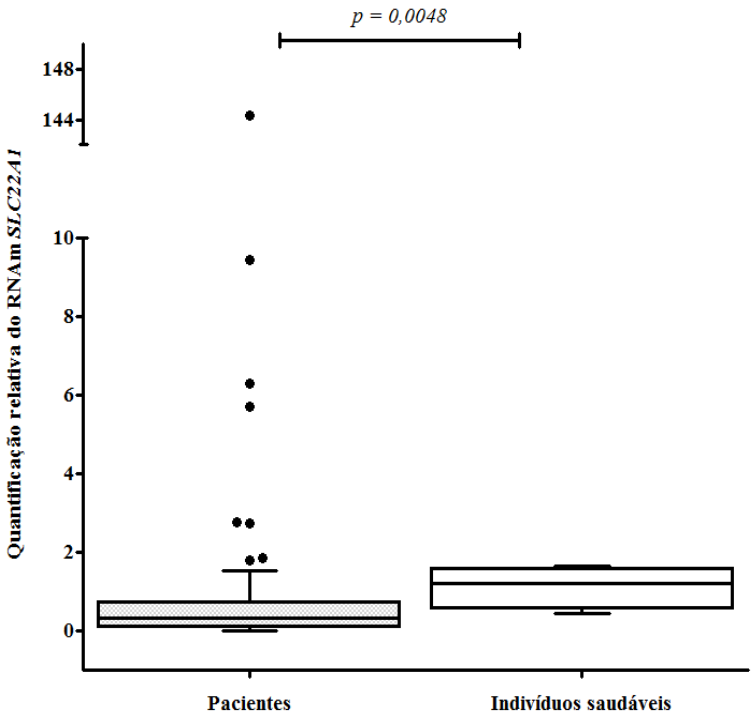



**Figura 23. Quantificação relativa de RNA mensageiro do gene *SLC22A1* em amostras de pacientes com LMC e em indivíduos saudáveis**. A quantificação foi feita através da técnica de PCR em tempo real. β-glucuronidase (*GUSB*) foi utilizado como gene endógeno. A linha pontilhada na cor verde representa a mediana dos resultados. O teste estatístico utilizado foi o Mann Whitney.

**Tabela 16. Níveis de RNA mensageiro *SLC22A1* em amostras de pacientes com LMC.**

| Níveis de transcritos de *SLC22A1* | Número de amostras |
|---|---|
| Reduzido | 45/57 (78,95%) |
| Basal | 4/57 (7,02%) |
| Aumentado | 8/57 (14,03%) |

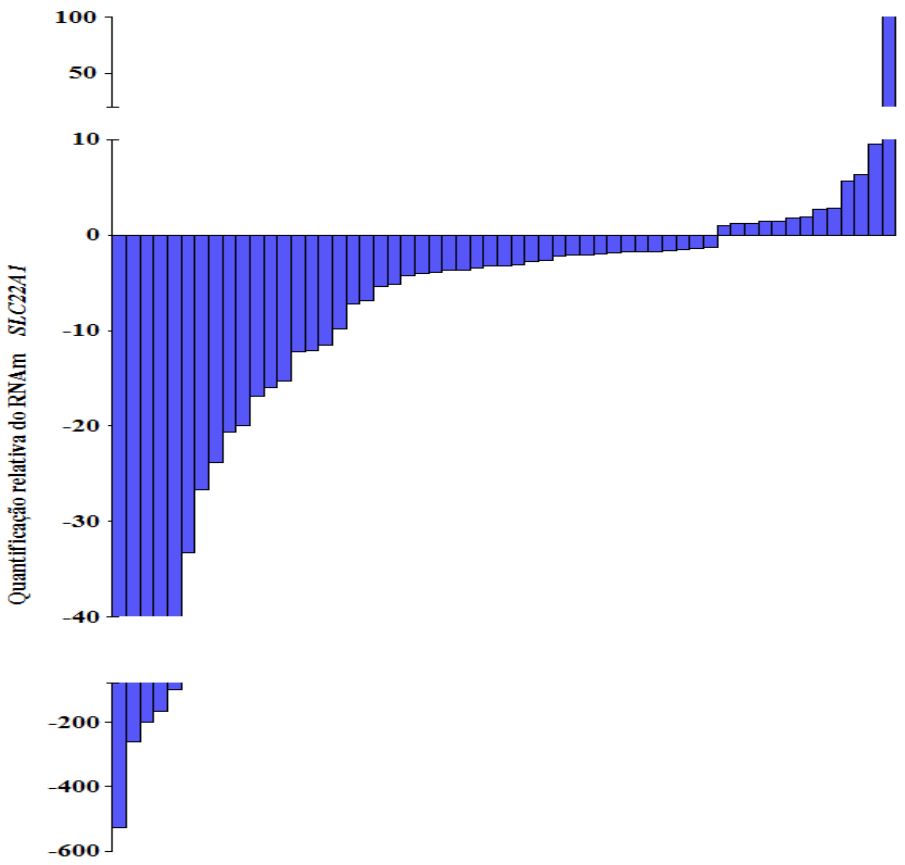



**Figura 24. Níveis de expressão relativa do RNA mensageiro (RNAm) *SLC22A1* em amostras de pacientes**. Número de vezes que o RNAm encontrava-se aumentado ou reduzido nas amostras de LMC normalizados em relação à amostra de indivíduo saudável (amostra de referência). Cada barra representa uma amostra de paciente.

### 4.4.2 Correlação entre os genes *ABCB1*, *ABCG2* e *SLC22A1* e os dados clínicos e demográficos dos pacientes com LMC

#### 4.4.2.1 Gene *ABCB1* e os dados clínicos e demográficos

Entre os pacientes que apresentaram níveis reduzidos de *ABCB1*, a maioria estava na FC (39/46; 84,78%), quatro estavam na FA (4/46; 8,70%) e três na FB (3/46; 6,52%). Apesar do pequeno número de amostras nas fases acelerada e blástica, cinco e quatro respectivamente, foi possível observar que a maioria das amostras cujos pacientes estavam nestas fases também apresentou níveis reduzidos de *ABCB1* (4/5 FA, 3/4 FB) (Tabela 17).

**Tabela 17. Fases da leucemia mielóide crônica e os níveis do RNAm *ABCB1*.**

| | Amostras de pacientes agrupadas segundo a fase da doença | | | Amostras de pacientes sem agrupamento |
|---|---|---|---|---|
| **Níveis de *ABCB1*** | Fase blástica (FB) | Fase acelerada (FA) | Fase crônica (FC) | FB+FA+FC |
| **Reduzido** | 3 | 4 | 39 | 46 |
| **Basal** | 0 | 0 | 3 | 3 |
| **Aumentado** | 1 | 1 | 8 | 10 |
| total de amostras | 4 | 5 | 50 | 59 |

As amostras de pacientes foram agrupadas, ou não, segundo as fases da doença. Os níveis de RNA mensageiro do gene *ABCB1* foram estratificados segundo os níveis de expressão em relação às amostras de indivíduos saudáveis e os resultados foram comparados.

Níveis aumentados de *ABCB1* foram observados em 10 de 59 amostras. A maioria dos pacientes se encontrava na FC (8/10) (Tabela 17). Os três pacientes que apresentaram níveis de RNA semelhantes aos das amostras de indivíduos saudáveis encontravam-se na FC (3/3). Nenhum paciente nas fases consideradas de pior prognóstico da doença (FA e FB) apresentou níveis semelhantes aos dos indivíduos saudáveis (Tabela 17).

As amostras com níveis reduzidos do gene *ABCB1* foram predominantes e não tiveram associação com a fase da doença (Tabela 17) nem com o índice de Sokal (Tabela 18).

Apenas um dos vinte e um pacientes com índice de Sokal baixo apresentou o mesmo nível de expressão de RNAm *ABCB1* que os indivíduos saudáveis (Tabela 18). Os níveis aumentados de *ABCB1* foram observados em 33,33% das amostras de pacientes com índice baixo Sokal e em 10% das amostras de pacientes com índice de Sokal alto (Tabela 18).

**Tabela 18. Índice de Sokal e os níveis de *ABCB1* em amostras de pacientes com leucemia mielóide crônica.**

| | Índice de sokal | | |
|---|---|---|---|
| **Níveis de *ABCB1*** | Baixo | Intermediário | Alto |
| **Reduzido** | 13/21 (61,90%) | 10/10 (100%) | 18/20 (90%) |
| **Basal** | 1/21 (4,76%) | 0 | 0 |
| **Aumentado** | 7/21 (33,33%) | 0 | 2/20 (10%) |

### 4.4.2.2 Gene *ABCG2* e os dados clínicos dos pacientes com LMC

Foram analisadas 58 amostras de pacientes pelo ensaio da PCR em tempo real. Destas amostras, 52/58 (89,66%) pacientes estavam na FC, 3/58 (5,17%) na FA e 3/58 (5,17%) na FB da doença (Tabela 19). Níveis aumentados de RNAm do *ABCG2* foram detectados em 2/3 amostras de pacientes na FB da doença. Em uma das amostras da FB (1/3) foi observado nível reduzido de RNAm. Dois de três pacientes na FA apresentaram níveis basais e 1/3 apresentou níveis reduzidos de RNAm de *ABCG2* (Tabela 19).

**Tabela 19.** F**ases da leucemia mielóide crônica e os níveis de *ABCG2*.**

| | **Amostras de pacientes agrupadas segundo a fase da doença** | | | **Amostras de pacientes sem agrupamento** |
|---|---|---|---|---|
| **Níveis de *ABCG2*** | **FB** | **FA** | **FC** | **FB+FA+FC** |
| **Reduzido** | **1** | **1** | **24** | **26** |
| **Basal** | **0** | **2** | **13** | **15** |
| **Aumentado** | **2** | **0** | **15** | **17** |
| total de amostras | **3** | **3** | **52** | **58** |

As amostras de pacientes foram agrupadas ou não segundo as fases da doença. Os níveis de RNA mensageiro do gene *ABCG2* foram estratificados segundo os

níveis de expressão em relação às amostras de indivíduos saudáveis e os resultados foram comparados.

O índice prognóstico de Sokal foi analisado em 49/58 pacientes cujas amostras foram analisadas por PCR em tempo real para o gene *ABCG2*. Em 30% (6/20) dos pacientes com alto risco de progressão de doença (Sokal alto) os níveis do RNAm *ABCG2* estavam aumentados, mas na maioria destes pacientes o nível de expressão do *ABCG2* que prevaleceu foi o reduzido (Tabela 20). As amostras de pacientes apresentando risco intermediário de Sokal foram distribuídas de forma semelhante entre os níveis reduzido (54,55%) e basal (45,45%) de *ABCG2*. Nenhum paciente com risco intermediário de Sokal apresentou níveis aumentados de *ABCG2* (Tabela 20). Não houve diferença entre os percentuais de amostras com níveis reduzidos (38,89%) e aumentados (33,33%) de *ABCG2* no grupo de pacientes com risco baixo de Sokal (Tabela 20).

**Tabela 20. Análise do índice de Sokal e dos níveis de *ABCG2* em amostras de pacientes com leucemia mielóide crônica.**

| **Níveis de *ABCG2*** | **Índice de sokal** | | |
|---|---|---|---|
| | **Baixo** | **Intermediário** | **Alto** |
| **Reduzido** | 7/18 (38,89%) | 6/11 (54,55%) | 12/20 (60,00%) |
| **Basal** | 5/18 (2,78%) | 5/11 (45,45%) | 2/20 (10,00%) |
| **Aumentado** | 6/18 (33,33%) | 0 | 6/20 (30,00%) |

#### 4.4.2.3 Gene *SLC22A1* e os dados clínicos

No grupo das 57 amostras estudadas para o gene *SLC22A1* a maioria dos pacientes apresentava-se na FC (50; 87,72%), três amostras eram de pacientes na FA e quatro estavam na FB Tabela 21. As três amostras de pacientes na FA, 3/4 amostras de pacientes na FB e 39/50 na FC apresentaram níveis reduzidos do RNAm *SLC22A1*.

Apenas as amostras cujos pacientes estavam na FC apresentaram níveis aumentados do RNAm *SLC22A1*. As amostras exibindo níveis de RNAm semelhantes aos de indivíduos saudáveis foram encontrados em apenas 3/50 amostras de pacientes na FC e em 1/4 na FB.

**Tabela 21. Fases da leucemia mielóide crônica e os níveis do RNAm *SLC22A1*.**

| | Amostras de pacientes agrupadas segundo a fase da doença | | | Amostras de pacientes sem agrupamento |
|---|---|---|---|---|
| **Níveis de *SLC22A1*** | **FB** | **FA** | **FC** | **FB+FA+FC** |
| **Reduzido** | **3** | **3** | **39** | **45** |
| **Basal** | **1** | **0** | **3** | **4** |
| **Aumentado** | **0** | **0** | **8** | **8** |
| total de amostras | **4** | **3** | **50** | **57** |

FB= fase blástica; FA= fase acelerada; FC= fase crônica

Foi possível obter o índice prognóstico de Sokal nos prontuários de 50 pacientes cujas amostras foram estudadas para a detecção dos níveis do RNAm *SLC22A1*. A maioria das amostras apresentou níveis reduzidos de RNAm *SLC22A1*, os quais foram detectados em amostras de pacientes apresentando índice prognóstico de Sokal baixo (70%), intermediário (90%) e alto (85%) não havendo, portanto, associação com nenhum índice de Sokal específico (Tabela 22).

Em 17/20 (85%) das amostras apresentando alto risco de progressão da doença, segundo o índice de Sokal, os níveis do RNAm do transportador de influxo *SLC22A1* estavam reduzidos (Tabela 22).

**Tabela 22. Índice de Sokal e os níveis de RNAm *SLC22A1* em amostras de pacientes com leucemia mielóide crônica.**

| **Níveis de *SLC22A1*** | **Índice de sokal** | | |
|---|---|---|---|
| | **Baixo** | **Intermediário** | **Alto** |
| **Reduzido** | 14/20 (70,00%) | 9/10 (90,00%) | 17/20 (85,00%) |
| **Basal** | 1/20 (5,00%) | 1/10 (10,00%) | 1/20 (5,00%) |
| **Aumentado** | 5/20 (25,00%) | 0 | 2/20 (10,00%) |

#### 4.4.2.4 *ABCB1, ABCG2* e *SLC22A1, e a* resposta ao tratamento com imatinibe

A análise da resposta ao tratamento clínico com imatinibe foi possível em um número restrito de pacientes. Os dados da resposta citogenética obtidos dos prontuários foram escassos, independentes do tempo de resposta a ser analisado (após 6 ou 12 meses de tratamento com imatinibe) e, portanto, tais informações não entraram neste estudo. A avaliação da resposta molecular após 12 meses de tratamento com imatinibe foi possível em 27 de 63 pacientes. A ausência de resposta molecular foi observada em 2 de 27 pacientes que apresentaram níveis reduzidos de RNAm de todos os transportadores analisados. A RMMen foi alcançada por 13 de 27 pacientes e a melhor resposta ao tratamento (RMM), foi alcançada por 10 de 27 pacientes (Tabela 23).

Dez de 63 pacientes responderam inicialmente, ao imatinibe, mas desenvolveram resistência no curso do tratamento. Seis pacientes resistentes ao imatinibe iniciaram o tratamento na FA ou na FB da doença, que é caracterizada pela baixa taxa de resposta clínica a este fármaco (JABBOUR *et al.*, 2011).

Dezenove pacientes (18/63) apresentaram sintomas de toxidade ao imatinibe (Tabela 23). As manifestações clínicas mais comuns de toxidade ao imatinibe foram aplasia da medula óssea (toxidade medular; 11 de 18 pacientes), seguido por alterações das enzimas hepáticas (toxidade hepática; 3 de 18 pacientes). A intolerância ao imatinibe foi observada em apenas um paciente (Tabela 23).

A toxicidade ao imatinibe, com consequente suspensão do tratamento, ou a presença de mutação no alvo da droga justificaram alguns casos de resistência clínica. Entretanto, para alguns pacientes tais ocorrências não explicam todos os casos de resistência observados. Em um paciente (exemplo: paciente de número 1382), houve evolução da FC para a FB, com consequente resistência ao imatinibe, sem interrupção do tratamento ou a presença da mutação do gene BCR-ABL. Este paciente alcançou RMM 12 meses após iniciar o tratamento com inibidores de tirosina quinase, mas apenas quando fez uso de DASA. Foram observadas alterações nos níveis do RNAm do transportador de efluxo BCRP quando a amostra deste paciente foi analisada no momento do diagnóstico. Os níveis do RNAm *ABCG2* estavam aumentados em relação às amostras de indivíduos saudáveis (Tabela 23).

**Tabela 23. Resposta ao tratamento com imatinibe e os níveis de RNA mensageiro dos transportadores de efluxo e influxo em pacientes com LMC.**

| Amostra | *ABCB1* | *ABCG2* | *SLC22A1* | Fase da doença[§] | Toxicidade ao IM | Resposta molecular[¶] | Resposta ao tratamento clínico com IM | Seguimento (meses) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 955 | aumentado | aumentado | reduzido | FC | | SD | Perda de RH, óbito | 6 |
| 974 | aumentado | aumentado | reduzido | FB | x | SD | óbito | 8 |
| 882 | aumentado | aumentado | reduzido | FC | x | SD | | 84 |
| 1227 | aumentado | aumentado | reduzido | FC | | menor | | 24 |
| 680 | aumentado | aumentado | aumentado | FC | x | SD | | 108 |
| 1065 | aumentado | aumentado | aumentado | FC | | SD | | 60 |
| 1292 | aumentado | aumentado | aumentado | FC | | SD | | 36 |
| 1138 | aumentado | aumentado | aumentado | FC | | maior | | 14 |
| 1274 | aumentado | NR | NR | FA | | mínima | Perda de RM, mutação T315I, aguarda transplante | 12 |
| 1232 | aumentado | NR | NR | FC | | menor | | 18 |
| 1382 | basal | aumentado | NR | FC | | maior | Progressão da doença no 1ºmês de tratamento | 12 |
| 1305 | basal | basal | basal | FC | x | SD | | 24 |
| 10621 | basal | reduzido | basal | FC | | SD | | 24 |
| 1376 | NR | aumentado | aumentado | FC | | maior | | 12 |
| 1321 | NR | NR | reduzido | FC | | menor | | 24 |
| 1351 | NR | NR | aumentado | FC | | menor | | 12 |
| 1000 | NR | reduzido | aumentado | FC | | SD | | 36 |
| 1120 | reduzido | aumentado | reduzido | FB | x | SD | óbito | 2 |
| 1195 | reduzido | aumentado | reduzido | FC | | SD | RC ausente após 12 meses de tratamento, mudança de ITK | 24 |
| 1237 | reduzido | aumentado | reduzido | FC | | SD | óbito | 19 |
| 1372 | reduzido | aumentado | reduzido | FC | | SD | | 24 |
| 1344 | reduzido | aumentado | reduzido | FC | | SD | | 12 |
| 1339 | reduzido | aumentado | reduzido | FC | x | maior | | 14 |
| 1216 | reduzido | aumentado | reduzido | FC | | maior | | 12 |
| 1289 | reduzido | basal | reduzido | FA | | SD | Perda de RC aos 18m | 24 |
| 1110 | reduzido | basal | reduzido | FC | | SD | óbito | 12 |
| 1134 | reduzido | basal | reduzido | FC | x | menor | óbito | 16 |
| 1017 | reduzido | basal | reduzido | FC | x | SD | | 60 |
| 1058 | reduzido | basal | reduzido | FC | x | SD | | 12 |
| 1253 | reduzido | basal | reduzido | FC | | SD | | 24 |
| 10805 | reduzido | basal | reduzido | FC | | SD | | 8 |
| 1126 | reduzido | basal | reduzido | FA | x | menor | | 24 |
| 1209 | reduzido | basal | reduzido | FC | x | menor | | 24 |
| 1296 | reduzido | basal | reduzido | FC | | maior | | 18 |
| 1326 | reduzido | basal | reduzido | FC | | maior | | 12 |
| 1100 | reduzido | basal | NR | FC | | SD | óbito | 8 |
| 10696 | reduzido | basal | NR | FC | | menor | | 10 |
| 1352 | reduzido | basal | basal | FC | | maior | | 12 |
| 1318 | reduzido | NR | reduzido | FB | x | SD | Perda de RH após 3 meses de tratamento, óbito | 7 |
| 1073 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | x | SD | Perda de RH após 2 meses de tratamento*, óbito | 36 |
| 1226 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | ausente | Perda de RC após 12 meses de tratamento* | 32 |
| 1105 | reduzido | reduzido | reduzido | FA | x | SD | Perda de RM após 31 meses de tratamento, mudança de ITK | 36 |

Tabela continua na próxima página

Continuação da **Tabela 23.**

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1062 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | x | SD | óbito | 6 |
| 1210 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | mínima | óbito | 36 |
| 1241 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | x | SD | | 1 |
| 1273 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | x | SD | | 36 |
| 999 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | SD | | 36 |
| 1055 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | SD | | 60 |
| 1088 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | SD | | 36 |
| 1158 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | SD | | 36 |
| 1375 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | SD | | 9 |
| 1199 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | mínima | | 36 |
| 1206 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | menor | | 36 |
| 1222 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | menor | | 14 |
| 1233 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | menor | | 24 |
| 1363 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | menor | | 12 |
| 1368 | reduzido | reduzido | reduzido | FA | x | maior | | 12 |
| 1349 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | maior | | 13 |
| 1050 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | maior | | 36 |
| 1303 | reduzido | reduzido | reduzido | FC | | ausente | | 14 |
| 972 | reduzido | reduzido | NR | FC | | SD | | 24 |
| 1144 | reduzido | reduzido | **basal** | FB | | SD | Perda de RC após 12 meses de | 36 |
| 1374 | reduzido | reduzido | **aumentado** | FC | | menor | | 10 |

IM= imatinibe; NR= ensaio não realizado nesta amostra; FC= fase crônica; FA= fase acelerada; FB= fase blástica; x= pacientes que apresentaram toxidade ao imatinibe; SD= informação não consta no prontuário; RH= resposta hematológica; RM= resposta molecular; RC= resposta citogenética; ITK= inibidor de tirosina kinase. * Não aderiu ao tratamento com imatinibe; [§] Fase da doença no momento do estudo dos genes; [¶] A resposta molecular foi avaliada após 12 meses de tratamento.

A busca por mutações no gene *BCR-ABL* foi realizada nas amostras de pacientes que apresentaram resistência ao tratamento clínico com imatinibe. No paciente de número 1274 (1/10; Tabela 23) foi detectada a mutação T315I, que impede a ligação do imatinibe à proteína BCR-ABL, após 12 meses de tratamento clínico. O paciente de número 1274 foi encaminhado para transplante devido ao pior prognóstico conferido por esta mutação que não permite a resposta clínica a nenhum inibidor de tirosina quinase utilizado atualmente no tratamento (JABBOUR AND KANTARJIAN, 2012).

Dos 63 pacientes analisados, 11 tiveram evolução para o óbito. Cinco de 11 pacientes faleceram em consequência da aquisição de resistência ao tratamento clínico com imatinibe. Os outros pacientes tiveram evolução para óbito por causas não relacionadas à LMC. O tempo médio entre o início do tratamento com imatinibe e o óbito foi de 11 meses (mediana de sete meses; Tabela 23).

## 4.5 PARTE V.

### 4.5.1 Alterações na expressão e na atividade do transportador de efluxo Pgp promovidas pelo imatinibe

Após a observação de que os níveis de expressão da proteína Pgp poderiam sofrer alterações em algumas amostras de pacientes durante o curso da LMC (PARTE II da seção de resultados), este fenômeno foi testado *in vitro* em linhagens celulares de LMC. Uma possível explicação para tal fenômeno seria o tratamento clínico ter sido realizado antes do ensaio laboratorial. Para tentar responder a esta questão as células da linhagem celular K562-Lucena 1, Pgp positiva, e a linhagem K562, Pgp negativa, ambas expressando BCR-ABL, foram incubadas com imatinibe e os resultados descritos a seguir.

### 4.5.2 Alteração nos níveis de *ABCB1* RNAm e da Pgp mediante o tratamento com imatinibe nas linhagens celulares K562 e K562-Lucena 1

As linhagens celulares K562-Lucena 1 e K562 foram incubadas com o imatinibe 1 μM e 5 μM por 24 horas. Após o período de incubação os níveis do RNAm *ABCB1* e da proteína Pgp foram analisados. O imatinibe induziu uma redução estatisticamente significativa nos níveis do RNAm *ABCB1* na linhagem K562 quando incubado nas concentrações de 1 μM ($p$= 0,014) e 5 μM ($p$= 0,006) como demonstrado na Figura 25. Por outro lado, na linhagem K562-Lucena 1 (Pgp positiva) o imatinibe promoveu um aumento significativo nos níveis de transcritos do gene *ABCB1*, independente da concentração utilizada (Figura 25).

Para avaliarmos se o aumento dos níveis de RNAm *ABCB1* seriam traduzidos em aumento dos níveis proteicos as linhagens foram avaliadas com o anticorpo monoclonal anti-Pgp por citometria de fluxo. Como demonstrado na Figura 26, 5 μM de

imatinibe foi capaz de induzir um aumento de 2,79 vezes na expressão da proteína Pgp na linhagem celular K562-Lucena 1, enquanto na linhagem K562 nenhuma alteração foi observada. O imatinibe, na concentração de 1μM, não foi capaz de aumentar a expressão de Pgp na linhagem K562-Lucena 1 (Figura 26).

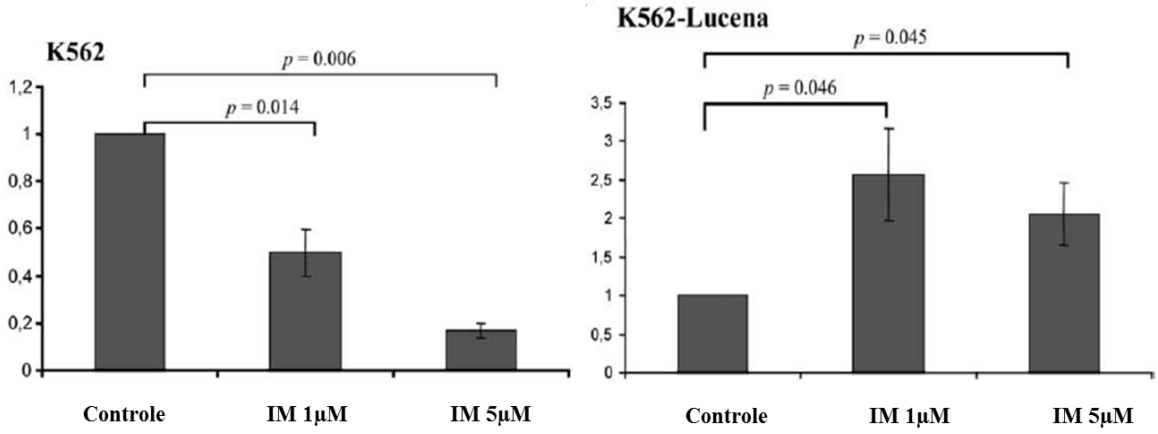



**Figura 25. Modulação da expressão do RNA mensageiro da proteína transportadora de efluxo Pgp em linhagens celulares de LMC.** As linhagens celulares K562 e K562-Lucena 1 foram incubadas com 1 μM e 5μM de imatinibe (IM) por 24h e analisadas por PCR em tempo real.

Para avaliarmos se o aumento dos níveis de RNAm *ABCB1* seriam traduzidos em aumento dos níveis proteicos as linhagens foram avaliadas com o anticorpo monoclonal anti-Pgp por citometria de fluxo. Como demonstrado na Figura 26, 5 μM de imatinibe foi capaz de induzir um aumento de 2,79 vezes na expressão da proteína Pgp na linhagem celular K562-Lucena 1, enquanto na linhagem K562 nenhuma alteração foi observada. O imatinibe, na concentração de 1μM, não foi capaz de aumentar a expressão de Pgp na linhagem K562-Lucena 1 (Figura 26).

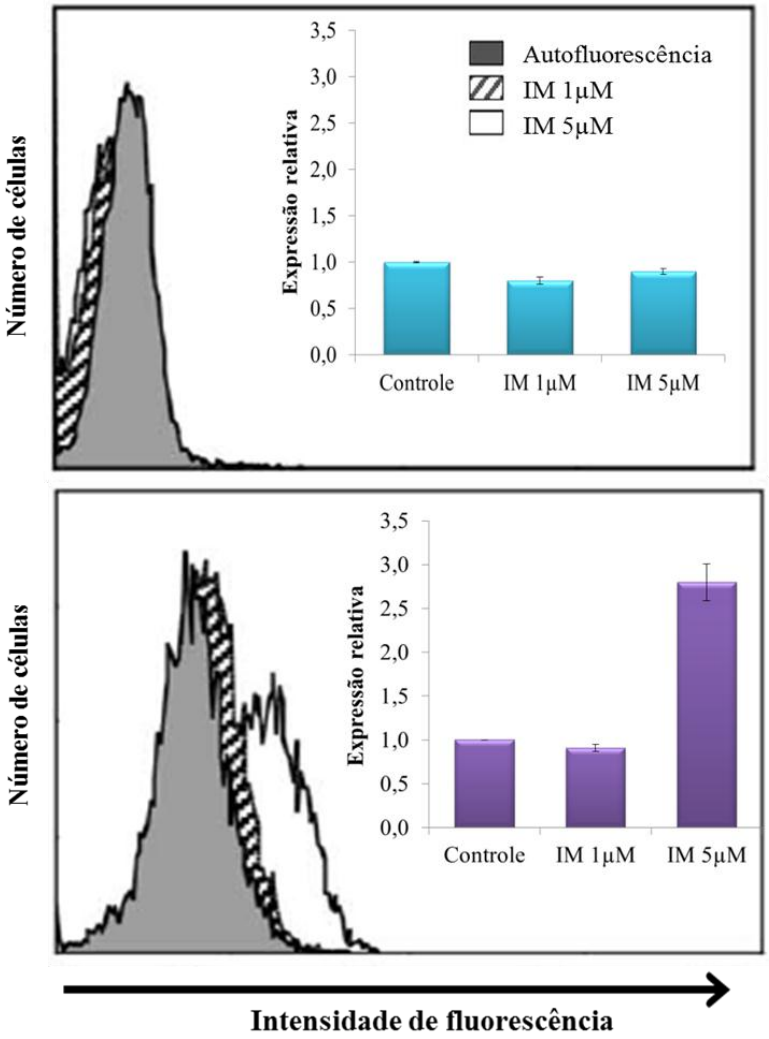



**Figura 26. Modulação da expressão da proteína transportadora de efluxo Pgp em linhagens celulares de LMC.** As linhagens celulares K562 (**A**) e K562-Lucena 1 (**B**) foram incubadas com 1 µM e 5µM de imatinibe (IM) por 24 horas e marcadas com anticorpo monoclonal anti-Pgp (clone UIC2). Os gráficos de citometria são representativos dos três experimentos independentes realizados e demonstrados sob a forma de média. A expressão de Pgp nas células tratadas foi normalizada em relação ao controle que passou a valer 1.

### 4.5.3 Modulação da extrusão da rodamina 123 pelo imatinibe

Com o intuito de verificarmos se o imatinibe seria capaz de funcionar como um agente modulador da bomba de efluxo Pgp, este fármaco foi incubado juntamente com o fluorocromo Rho e o ensaio analisado por citometria de fluxo. Desta forma, o imatinibe foi testado no lugar da CSA como agente modulador (ensaio denominado Rho+CSA). Foram utilizadas as concentrações de 1,0 e 5,0 µM de imatinibe nas mesmas condições

estabelecidas para o ensaio Rho+CSA. Este ensaio foi realizado apenas com a linhagem K562-Lucena 1 que expressa a proteína transportadora de efluxo Pgp.

A média de cinco experimentos resultou em uma RIF igual a 4,0. Para as células incubadas com Rho associado ao imatinibe na concentração de 1,0 μM, a média foi de 1,47. No ensaio, utilizando-se Rho associado ao imatinibe 5,0 μM, a média das RIFs foi de 3,05 (Figura 27).

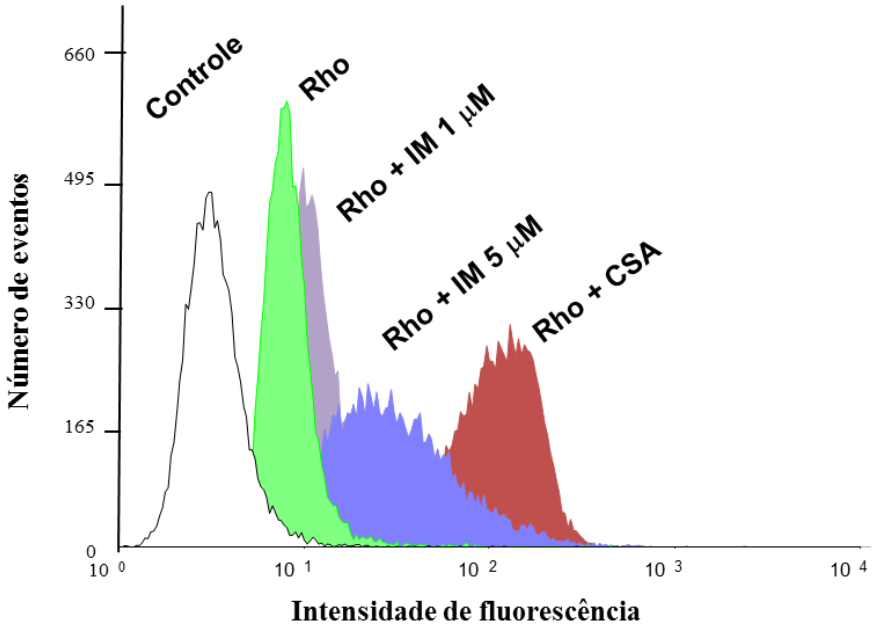



**Figura 27. Imatinibe como agente modulador da bomba de efluxo glicoproteína P**. As células da linhagem K562-Lucena-1 foram incubadas com e sem (autofluorescência) o fluorocromo rodamina 123 (Rho) e as drogas ciclosporina A (CSA) e imatinibe (IM) como agentes moduladores das proteínas transportadoras de efluxo.

### 4.5.4 Morte celular induzida pelo imatinibe em linhagens celulares

Para avaliar se o imatinibe poderia ser substrato para o transportador de efluxo Pgp, a linhagem K562-Lucena 1 foi incubada com diferentes concentrações de imatinibe por diferentes tempos. A resposta da linhagem que expressa Pgp foi comparada com a resposta da linhagem parental K562 que não expressa esta proteína.

As linhagens celulares K562 e K562-Lucena 1 foram incubadas com as concentrações de 0,5, 1,0 5,0 μM por 24, 48 e 72 horas. Ao final de cada incubação as células foram analisadas em citômetro de fluxo para a marcação com anexina V e PI visando verificar a taxa de morte celular.

Na linhagem K562, o percentual de células anexina V positivas foi de 24,48% e 21,52% quando o imatinibe foi administrado nas concentrações de 0,5 e 1,0 μM, respectivamente, por 24 horas (Figura 28A). Estes percentuais aumentaram significativamente quando o tempo de incubação foi aumentado para 48 horas ($p < 0,01$) e 72 horas ($p < 0,01$). A concentração de 5 μM foi capaz de induzir um alto percentual de células positivas para a anexina V (71,40%) no menor tempo de incubação (24 horas) (Figura 28). O tempo de incubação mais prolongado não aumentou o percentual de morte celular quando esta concentração foi utilizada ($p > 0.05$). O teste estatístico utilizado em todas as análises foi o 2-way ANOVA.

A morte celular promovida pelo imatinibe foi significativamente maior na linhagem K562 do que na linhagem K562-Lucena 1 quando ambas foram incubadas com as concentrações de 5 μM por 24 horas ($p < 0.01$), 0,5 μM por 48 horas ($p < 0.01$) e 0,5 μM e 1,0 μM por 72 horas ($p < 0.001$) (Figura 28).

Após 24 horas de incubação, a concentração de 5 μM foi capaz de induzir cerca de 50% de células marcadas com anexina V na linhagem K562-Lucena 1 (Figura 28). Nas outras concentrações e após 24 horas de incubação este percentual foi inferior a 20% nesta mesma linhagem (Figura 28). O percentual de células anexina V positivas, após incubação com imatinibe nas concentrações de 0,5 e 1,0 μM, não diferiu daquele observado quando as células foram incubadas por 24 horas (0,5 μM = 11,82% e 1,0 μM = 15,08%, $p > 0,05$), 48 horas (0,5 μM = 26,14% e 1,0 μM = 37,05%, $p > 0,05$) ou 72 horas (0,5 μM = 34,43% e 1,0 μM = 43,38%, $p > 0,05$). A concentração de 5 μM de

imatinibe induziu 50,41% de morte celular em 24 horas, 71,12% em 48 horas e 72,83% em 72 horas (Figura 28). A taxa de morte celular nesta concentração foi significativamente maior do que nas outras concentrações nos tempos de 24 horas ($p$ <0.001), 48 horas ($p$ <0.001) e 72 horas ($p$ <0.001) (Figura 28). O teste estatístico utilizado em todas as análises foi o 2-way ANOVA.

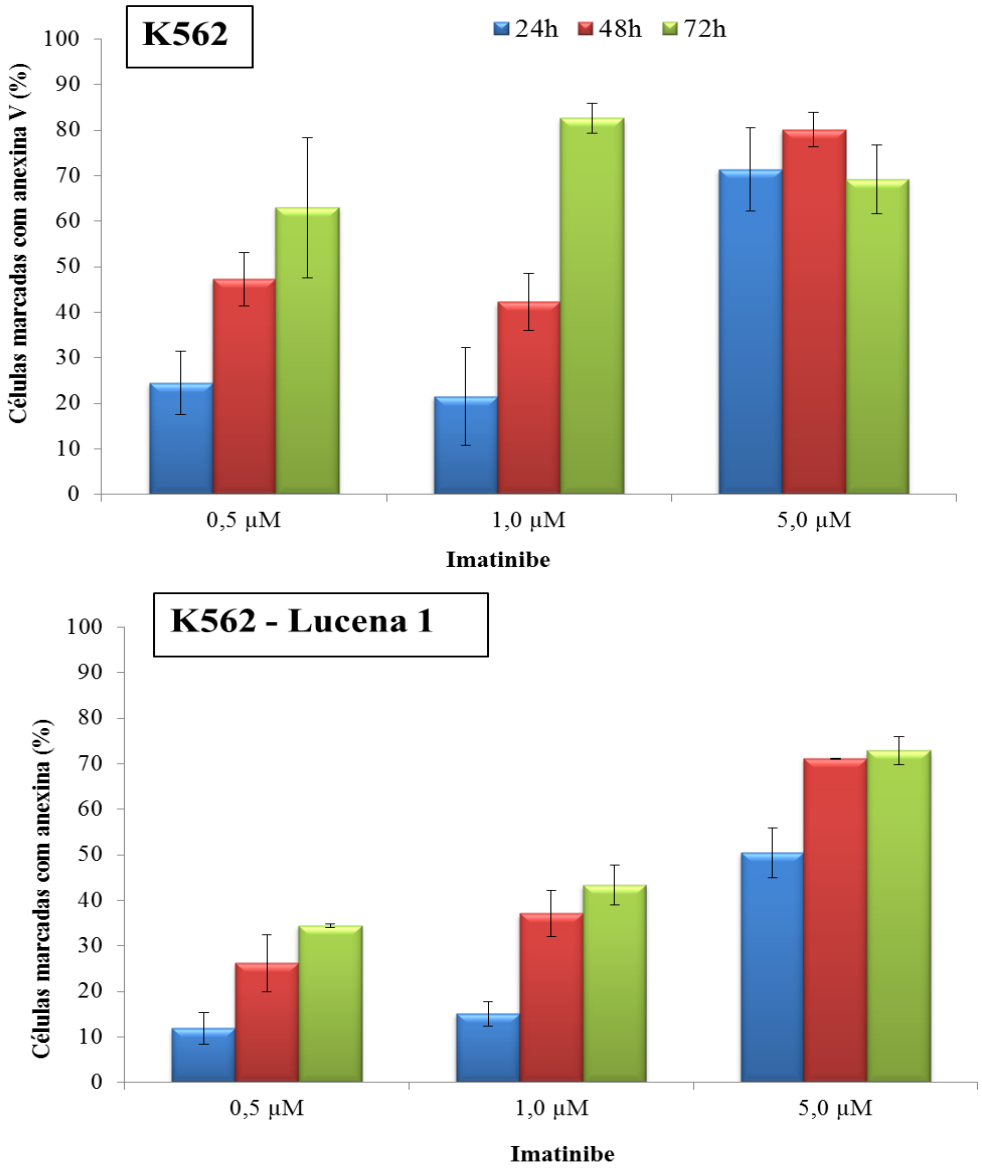



**Figura 28. Morte celular induzida pelo imatinibe avaliada nas linhagens K562 e K562-Lucena 1.** A indução da morte celular foi avaliada através do ensaio de marcação da anexina V e do iodeto de propídeo (PI) analisado por citometria de fluxo. Subtraiu-se o percentual de morte celular induzida pelo imatinibe das células não incubadas com a droga (controle). h = horas

A concentração de imatinibe necessária para induzir 50% de morte nas células (DL50) da linhagem celular K562-Lucena 1 em 24 horas foi calculada em 4,95 μM (Tabela 23) e para K562 foi 3,66 μM (Tabela 24). A linhagem K562-Lucena 1 foi, portanto 1,35 vezes mais resistente ao imatinibe do que a K562 no tempo de 24 horas. Com um tempo de incubação maior, a diferença entre as linhagens chegou a 2,16 vezes no tempo de 48 horas com a linhagem K562-Lucena 1 apresentando uma DL50 de 3,12 μM e a K562 apresentando uma DL50 de 1,44 μM (Tabela 24).

**Tabela 24 Concentração de imatinibe necessária para induzir 50% de morte nas células das linhagens K562 e K562-Lucena 1.**

| tempo de incubação | K562 | K562-Lucena 1 |
|---|---|---|
| 24h | 3,665 μM | 4,950 μM |
| 48h | 1,442 μM | 3,129 μM |
| 72h | IND | 2,439 μM |

IND = valor indeterminado.

## 4.6 PARTE VI.

### 4.6.1 Inibição da atividade tirosina quinase da proteína BCR-ABL frente o tratamento com imatinibe

A metodologia para avaliar a atividade da proteína tirosina quinase BCR-ABL foi padronizada em linhagens celulares e utilizada em amostras de pacientes com LMC permitindo a análise da resistência ou sensibilidade *in vitro* ao imatinibe.

Inicialmente são descritos os dados de padronização do ensaio mostrando a sua capacidade em diferir entre uma linhagem resistente e outra sensível ao imatinibe, e em seguida são mostrados os resultados obtidos em amostras de pacientes com LMC.

#### 4.6.1.1 Inibição da atividade da proteína BCR-ABL em linhagens leucêmicas

As linhagens celulares K562 e K562-Lucena 1 foram utilizadas para padronizar a análise da atividade da proteína BCR-ABL por *Immunoblotting*.

As linhagens foram incubadas com diferentes concentrações de imatinibe por 2 horas e em seguida submetidas à lise celular. Após a eletroforese e a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, a proteína pCrkL foi identificada através da marcação com o anticorpo anti-pCrkL. Foi realizada a densitometria das bandas referentes às células tratadas e não tratadas (controle) e foi feita a normalização dos resultados pela β-actina. As bandas tratadas com imatinibe tiveram o percentual de expressão de pCrkL calculado em relação ao controle que foi considerado como 100% de expressão. Ambas as linhagens expressaram a proteína pCrkL, na ausência de tratamento com imatinibe, indicando que a proteína tirosina quinase BCR-ABL estava ativa (Figura 29, banda controle).

Quando incubado com as linhagens celulares K562 e K562-Lucena 1, o imatinibe reduziu de maneira significativa a expressão da proteína pCrkL em ambas as

linhagens (p<0,000 e p<0,000, respectivamente teste estatístico). Entretanto, o percentual de expressão de pCrkL foi menor e estatisticamente significo na linhagem K562 do que na K562-Lucena 1 quando ambas foram tratadas com 0,5 µM de imatinibe (*p*= 0,0300, teste estatístico, 29,77% *versus* 59,20%, Figura 29B). As concentrações mais elevadas de imatinibe reduziram igualmente a expressão de pCrkL (Figura 29B).

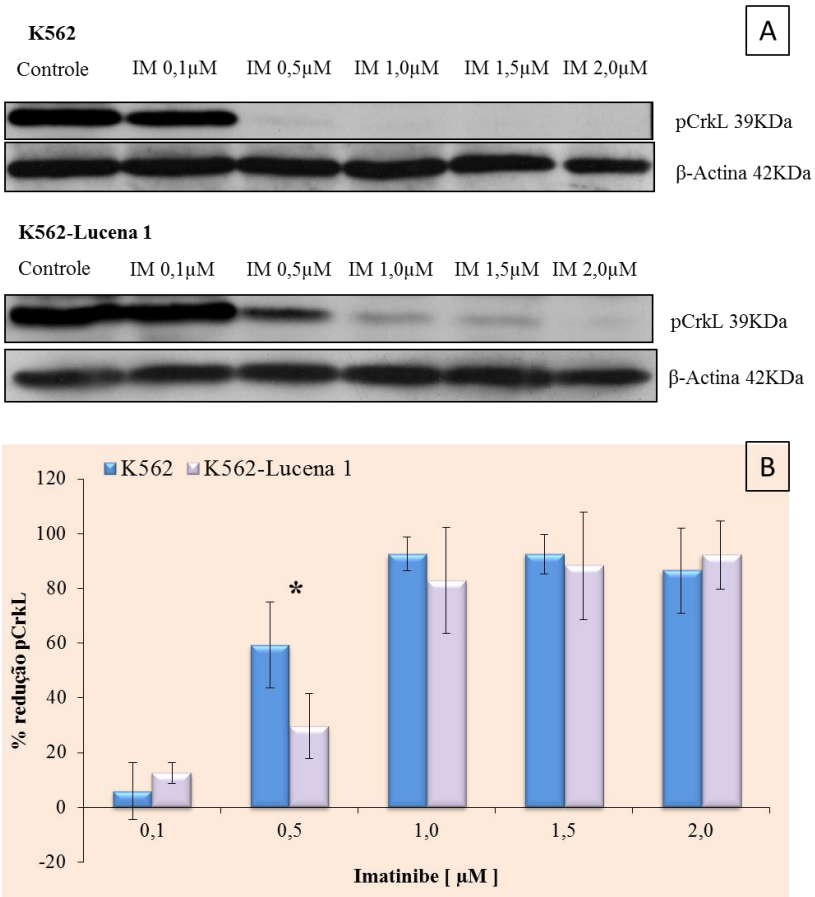



**Figura 29. Atividade da proteína tirosina quinase BCR-ABL através da redução dos níveis da proteína CrkL na forma fosforilada (pCrkL). A**) Resultado representativo de três experimentos independentes. As linhagens K562 e K562-Lucena 1 foram incubadas por 2 horas com diferentes concentrações de imatinibe (IM). pCrkL foi analisada por Western blotting utilizando-se o anticorpo monoclonal que detecta apenas a forma fosforilada da proteína. A expressão da pCrkL foi normalizada pela expressão da β-Actina. **B**) O percentual de redução de pCrkL foi calculado em relação ao controle (sem tratamento com imatinibe). A média dos três experimentos com desvio padrão é mostrada no gráfico de barras. * valor de *p* = 0,0001.

#### 4.6.1.2 Inibição da atividade da proteína BCR-ABL em amostras de pacientes

Após a padronização e a validação do ensaio para avaliar a atividade tirosina quinase mediante tratamento com imatinibe, amostras de pacientes com LMC foram testadas. Dezessete amostras de pacientes foram incubadas com imatinibe por 2 horas com as concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, e 2,0 µM. Após este período a detecção da pCrkL foi realizada por *Immunoblotting.*

As amostras foram analisadas na ocasião do diagnóstico e, portanto, em pacientes que não haviam recebido tratamento prévio. A maioria dos pacientes estava na FC (13/17; Tabela 25 e Tabela 26). Apenas 4/17 pacientes foram diagnosticados na FA e, portanto iniciaram imatinibe na dosagem de 600mg enquanto os pacientes na FC iniciaram o tratamento clínico com 400mg ao dia.

Em 10/17 amostras de pacientes houve redução da proteína pCrkL superior a 50% quando a menor concentração de imatinibe (0,1 µM) foi utilizada *in vitro* (Tabela 25). Neste grupo de amostras os percentuais de redução de pCrkL aproximaram-se de 100% indicando a necessidade de pequenas doses para alcançar a inibição da proteína BCR-ABL. Estas amostras foram então, classificadas com sensíveis (Tabela 25).

Em um grupo de 7/17 amostras foi possível observar que havia a necessidade de concentrações maiores do que 0,1 µM de imatinibe para reduzir em 50% a proteína pCrkL. Em 5/10 amostras foram necessárias concentrações entre 0,1 e 0,5 µM de imatinibe. Dois pacientes (2/17) necessitaram de contrações acima da equivalente administrada ao tratamento clínico dos pacientes: 1µM (Tabela 26). Este grupo de amostras foi classificado como resistente *in vitro* ao imatinibe.

**Tabela 25. Pacientes sensíveis, *in vitro*, à inibição da atividade tirosina quinase da proteína BCR-ABL pelo imatinibe e a relação com o perfil de resistência a múltiplas drogas.**

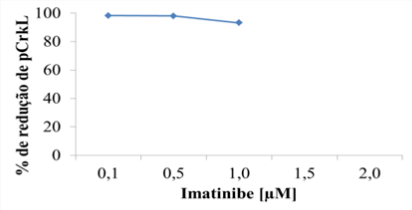
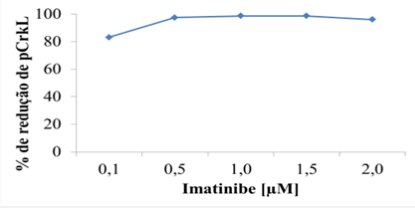
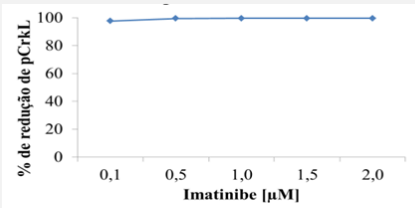
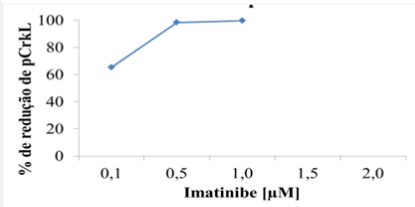
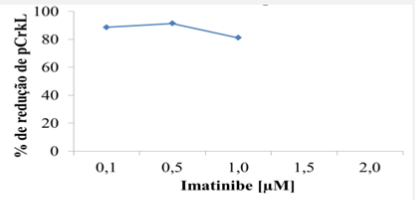
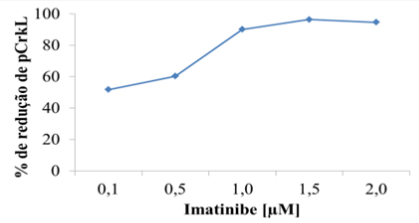
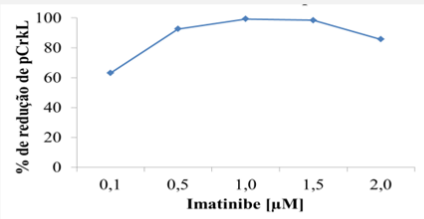
| Nº | Fase da LMC | Atividade da proteína BCR-ABL | Transportadores de efluxo |
|---|---|---|---|
| 2 | FC |   | Rho+CSA + PhA+FTC NR Pgp + |
| 3 | FC |   | Rho+CSA – PhA+FTC – Pgp + |
| 5 | FA |   | Rho+CSA – PhA+FTC – Pgp + |
| 6 | FC |   | Rho+CSA + PhA+FTC + Pgp + |
| 10 | FA |   | Rho+CSA – PhA+FTC – Pgp + |
| 12 | FC |   | Rho+CSA + PhA+FTC + Pgp – |
| 14 | FA |   | Rho+CSA + PhA+FTC + Pgp + |

**Tabela 25 Continuação**

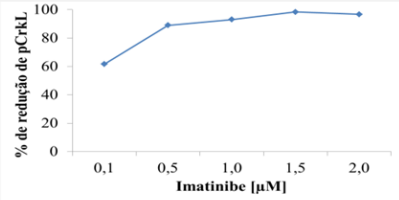
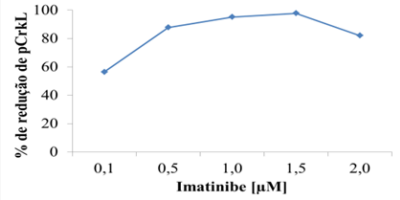
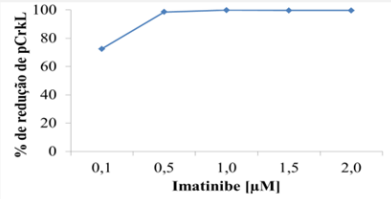
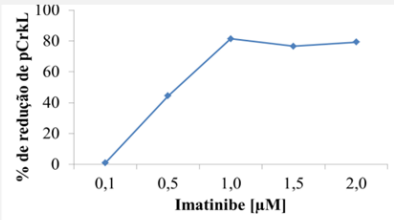
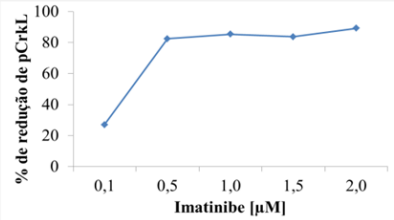
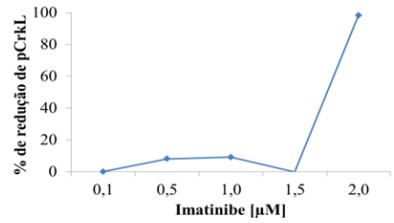
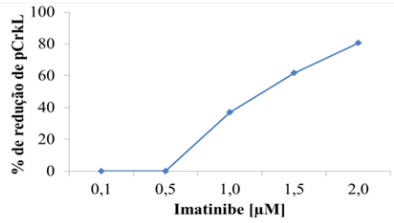
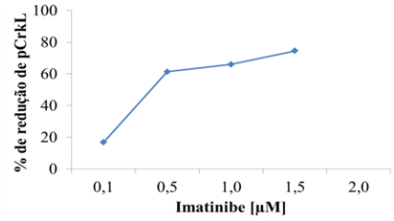
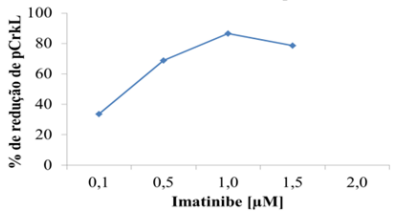
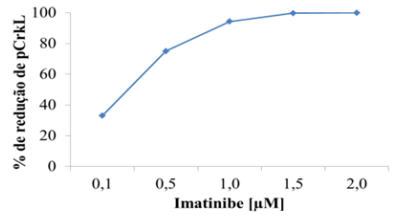
| Nº | Fase da LMC | Atividade da proteína BCR-ABL | Transportadores de efluxo |
|---|---|---|---|
| 15 | FA |  | Rho+CSA – PhA+FTC + Pgp + |
| 16 | FC |  | Rho+CSA + PhA+FTC + Pgp + |
| 17 | FC |  | Rho+CSA + PhA+FTC + Pgp + |

**Tabela 26. Pacientes resistentes, *in vitro*, à inibição da atividade tirosina quinase da proteína BCR-ABL pelo imatinibe e a relação com o perfil de resistência a múltiplas drogas e com a resposta ao tratamento clínico com o imatinibe.**

| Nº | Fase da LMC | Atividade da proteína BCR-ABL | Transportadores de efluxo |
|---|---|---|---|
| 1 | FC |  | Rho+CSA + PhA+FTC NR Pgp + |
| 4 | FC |  | Rho+CSA + PhA+FTC – Pgp + |
| 7 | FA |  | Rho+CSA – PhA+FTC – Pgp + |
| 8 | FC |  | Rho+CSA + PhA+FTC – Pgp + |
| 9 | FC |  | Rho+CSA + PhA+FTC – Pgp + |
| 11 | FC |  | Rho+CSA + PhA+FTC – Pgp + |
| 13 | FC |  | Rho+CSA + PhA+FTC – Pgp + |

#### 4.6.1.3 A inibição da atividade da proteína BCR-ABL e os transportadores de efluxo em amostras de pacientes

A atividade da proteína BCR-ABL, através da redução da expressão de pCrkL, tem sido utilizada para a detecção da resistência ao imatinibe, mas não indica qual o mecanismo envolvido nesta resistência.

Para avaliarmos uma possível participação das proteínas transportadoras de efluxo na resistência ao imatinibe, as amostras dos pacientes foram agrupadas em amostras resistentes e sensíveis dependendo do percentual da redução de pCrkL mediante o tratamento com 0,1 µM de imatinibe. A redução de pCrkL menor do que 50% (<50%pCrkL) foi classificada como amostra resistente e a redução maior do que 50% (>50%pCrkL) em amostras sensíveis. Os ensaios Rho+CSA e PhA+FTC foram realizados nas amostras antes do tratamento com imatinibe. A positividade no ensaio Rho+CSA foi detectada na maioria das amostras resistentes *in vitro* ao imatinibe (6/7; 85,71%; Tabela 27). Contudo, quando confrontadas às amostras sensíveis não houve diferença estatística em relação à frequência de positividade no ensaio Rho+CSA ($p$ = 0,3382; teste estatístico de Fisher; Tabela 27).

Utilizando o ensaio PhA+FTC foi possível detectar a atividade das proteínas transportadoras somente no grupo de amostras que foi sensível *in vitro* ao imatinibe (6/9, 66,67%; Tabela 27). No grupo de amostras resistentes não foi detectada nenhuma amostra com atividade por este método sugerindo que a resposta ao tratamento com imatinibe estivesse associada à ausência de atividade detectada pelo ensaio PhA+FTC.

A expressão da proteína Pgp, analisada através da marcação com o anticorpo monoclonal, foi detectada em 100% das amostras resistentes (<50%pCrkL) e em 90% das amostras sensíveis (>50%pCrkL) não havendo, portanto, diferença entre os grupos quanto ao percentual de amostras positivas (Tabela 27).

**Tabela 27. Resposta ao tratamento com 0,1 µM de imatinibe e a frequência de positividade nos ensaios de atividade e expressão dos transportadores de efluxo em amostras de pacientes com leucemia mielóide crônica.**

| tratamento com IM 0,1µM | Rho+CSA | | PhA+FTC | | Expressão Pgp | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | positiva | negativa | positiva | negativa | positiva | negativa |
| redução pCrkL > 50% | 6/10 (60%) | 4/10 (40%) | 6/9 (66,67%) | 3/9 (33,33%) | 9/10 (90%) | 1/10 (10%) |
| redução pCrkL < 50% | 6/7 (85,71%) | 1/7 (14,28%) | 0/6 (0%) | 6/6 (100%) | 7/7 (100%) | 0/7 (0%) |
| | $p$ = 0,3382 | | $p$ = 0,0278 | | $p$ = 1,0000 | |

Além da avaliação segundo a positividade, ou seja, a presença de um transportador de efluxo funcional, os dados foram avaliados sob a forma de RIF. Esta estratégia permitiu a análise indireta da intensidade da extrusão do fluorocromo para que pudéssemos diferenciar entre uma amostra com baixa atividade e uma amostra com alta capacidade de extrusão de substratos.

O grupo de amostras resistentes analisadas pelo método Rho+CSA apresentou mediana de RIF maior do que a do grupo sensível ($p$ = 0,0281; teste estatístico de Mann Whitney; Figura 30A). Embora a análise do percentual de positividade não tenha demonstrado diferença entre os grupos a análise indireta da intensidade da extrusão sugeriu haver uma maior capacidade de extrusão no grupo das amostras resistentes.

Como referencia de atividade, foram utilizadas amostras de indivíduos saudáveis para avaliar a atividade nos grupos resistente e sensível ao imatinibe. As amostras de indivíduos saudáveis não foram incubadas com imatinibe.

Comparando as RIFs das amostras de pacientes com as de amostras de indivíduos saudáveis, analisadas pelo ensaio Rho+CSA, foi possível observar que a atividade detectada no grupo resistente não estava aumentada. As amostras deste grupo apresentaram o mesmo nível de atividade que os indivíduos saudáveis. O grupo de amostras sensíveis ao imatinibe é que apresentou atividade reduzida, em relação aos indivíduos saudáveis e ao grupo resistente, quando analisado pelo ensaio Rho+CSA (Figura 30).

Na análise das amostras pelo ensaio PhA+FTC, observou-se o contrário. A mediana de RIF das amostras resistentes foi igual à RIF das amostras dos indivíduos saudáveis (RIF = 1,0; Figura 30B). Através deste ensaio, observamos que as amostras que apresentaram maior capacidade de extrusão foram às amostras sensíveis ao imatinibe corroborando os resultados obtidos através da análise do percentual de positividade.

A análise da densidade antigênica revelou não haver diferença entre os grupos sensível e resistente quanto ao nível de expressão proteica da Pgp (Figura 30C). O percentual assim como também a densidade antigênica da proteína Pgp não se correlacionaram com a resposta *in vitro* ao imatinibe. Deve ser salientado, entretanto, que ambos os grupos apresentaram níveis significativamente maiores de RIF do que as amostras de indivíduos saudáveis (Figura 30C).

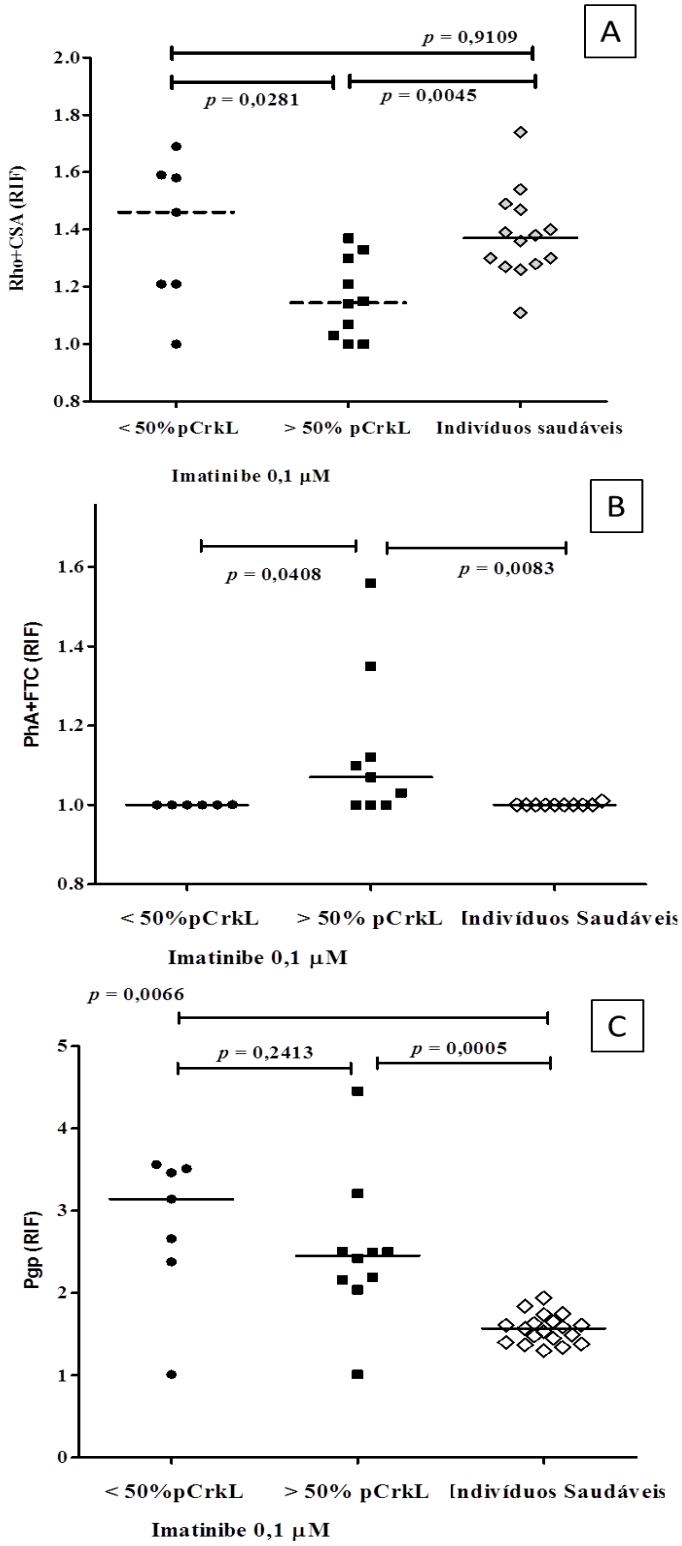



**Figura 30. Pacientes resistentes e sensíveis ao imatinibe *in vitro*, comparados aos indivíduos saudáveis quanto aos níveis de atividade e de expressão dos transportadores de efluxo.** As amostras de pacientes foram agrupadas de acordo com a resposta *in vitro* a 0,1 µM de imatinibe. Foram consideradas amostras resistentes de pacientes com LMC aquelas apresentando redução da proteína fosforilada CrkL (pCrkL) menor do que 50% (<50%pCrkL)

e amostras sensíveis aquelas amostras com redução >50% pCrkL. As análises de atividade e expressão dos transportadores foram realizadas nas amostras de pacientes antes da incubação com o imatinibe. As amostras de indivíduos saudáveis não foram incubadas com imatinibe servindo apenas como amostras de referência. RIF= razão entre intensidades de fluorescências; Rho+CSA= fluorocromo rodamina 123 associado ao modulador ciclosporina A; PhA+FTC = fluorocromo *pheophorbide A* associado ao modulador *fumitremorgin C*. Medianas dos resultados; barras verticais representando a variação obtida em cada ensaio; Teste estatístico Mann Whitney.

#### 4.6.1.4 Correlação entre a inibição da atividade da proteína BCR-ABL e os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com LMC

Os dados da resposta *in vitro* ao imatinibe, analisados através da redução dos níveis de pCrkL, foram comparados com a resposta ao tratamento clínico, analisadas através da redução do número de transcritos de BCR-ABL (resposta molecular).

A RMM, indicativo de resposta ótima ao tratamento clínico com imatinibe foi alcançada em 1/7 pacientes cuja amostra foi resistente e 1/10 pacientes cuja amostra foi sensível *in vitro* ao imatinibe (Tabela 28). A ausência de resposta molecular, indicativa de aquisição de resistência ao medicamento, foi observada em 1/7 amostras resistentes e em 2/10 amostras sensíveis (Tabela 28). Em conjunto, estes dados demonstram que a resposta *in vitro* ao imatinibe e a resposta molecular após o tratamento com imatinibe não diferiram entre os grupos categorizados como sensíveis e resistentes.

Segundo a classificação de Sokal os pacientes foram agrupados em baixo risco (6/17), risco intermediário (3/17) e alto risco para progressão da doença (7/17; Tabela 27). Dos sete pacientes apresentando alto risco, apenas 2/7 necessitaram de uma concentração *in vitro* de imatinibe acima daquela equivalente a utilizada na clínica (1 µM, Tabela 28), sendo a maioria sensível *in vitro*. As amostras dos pacientes classificados como baixo risco foram predominantemente resistentes (4/6; Tabela 28).

**Tabela 28. Efeito *in vitro* e *in vivo* do imatinibe em pacientes com leucemia mieloide crônica apresentando diferentes características clínicas.**

| Nº | Índice de Sokal | IC50 $^{IM}$ | Resposta molecular ** |
|---|---|---|---|
| 10 | alto | <0,1µM | RM Ausente; progrediu para a fase blástica; mudou para dasatinibe; perda de segmento |
| 3 | baixo | <0,1µM | RM Ausente; perda de aderência; perda de resposta molecular; mudança de tratamento |
| 6 | inter | <0,1µM | Perda de aderência ao tratamento |
| 14 | alto | <0,1µM | RMM |
| 2 | alto | <0,1µM | RMMin; progrediu para fase blástica |
| 12 | alto | <0,1µM | RMMen |
| 16 | alto | <0,1µM | RMMen |
| 5 | baixo | <0,1µM | RMMenor; mutação T315I; perda de rmolecular; mudança de tratamento |
| 17 | inter | <0,1µM | RMMen |
| 15 | NR | <0,1µM | RMMin |
| 4 | alto | 0,1-0,5µM | RMMenor |
| 13 | baixo | 0,1-0,5µM | RMMenor |
| 9 | baixo | 0,1-0,5µM | RMMenor |
| 11 | inter | 0,1-0,5µM | Toxicidade grave ao imatinibe; mudança de tratamento |
| 1 | baixo | 0,5-1,0µM | RMMenor |
| 8 | baixo | 1,0-1,5µM | RMM |
| 7 | alto | 1,5-2,0µM | RM Ausente; mudou para dasatinibe; perda de resposta molecular |

FA= fase acelerada; FC= fase crônica; Nº= número do paciente; SD= informação não consta no prontuário. *= Quantificação por western blotting da redução dos níveis de fosforilação da proteína CrkL após tratamento *in vitro* com imatinibe. As concentrações da droga representam a quantidade aproximada, em micromolar, para inibir em 50% a fosforilação de CrkL (ver materiais e métodos seção 3.10). **= A resposta molecular foi avaliada após 12 meses de tratamento clínico com imatinibe e através da análise da redução do número de transcritos do *BCR-ABL*.

# V. DISCUSSÃO

# V DISCUSSÃO

Resistência à quimioterapia é um grande obstáculo ao tratamento de diversas neoplasias, incluindo a LMC. A despeito dos grandes avanços obtidos com o surgimento do imatinibe, com evidente aumento na sobrevida dos pacientes e melhor qualidade de vida, a resistência a esse fármaco é um evento que ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes. (BACCARANI *et al., 2009*). O principal mecanismo de resistência ao imatinibe é a mutação no gene *BCR-ABL*. Entretanto, outros mecanismos de resistência são investigados, em especial aqueles relacionados com as proteínas de efluxo e de influxo de drogas.

Para melhor compreensão dos resultados do nosso estudo, a discussão foi apresentada em tópicos, semelhante à forma como abordamos os resultados do nosso estudo.

## 5.1 Atividade e expressão proteica dos transportadores de efluxo Pgp, MRP1 e BCRP em amostras de pacientes com LMC

Os ensaios voltados à análise da atividade e da expressão da Pgp, ambos por citometria de fluxo, foram previamente reportados pelo nosso grupo em amostras de pacientes com diversos tipos de leucemias, inclusive da LMC (VASCONCELOS *et al*., 2007; SILVA *et al*., 2008; LOURENÇO *et al*., 2008). Em um desses estudos (VASCONCELOS *et al*., 2007), demonstramos a existência de discordância entre a expressão e a atividade dos transportadores de efluxo Pgp e MRP1 em amostras leucêmicas quando a atividade foi detectada pelo ensaio Rho+CSA. Tal discordância também foi observada pelo ensaio utilizando o fluorocromo $DiOC_2$ associado à CSA ($DiOC_2$+CSA). Em pacientes com LMC, os ensaios Rho+CSA e $DiOC_2$+CSA apresentaram discordância em 44,2% das amostras. Entretanto, nas amostras que expressavam a proteína Pgp, o maior número de amostras positivas foi visto através do

ensaio Rho+CSA quando comparado com o ensaio $DiOC_2$+CSA ($p$ = 0,004). Estes dados indicam que para amostras de pacientes com LMC o ensaio Rho+CSA, quando associado à expressão da proteína Pgp, é mais adequado do que o ensaio $DiOC_2$+CSA.

Mais recentemente, estudamos um número substancial de amostras de pacientes com LMC onde avaliamos a presença das proteínas transportadoras de efluxo Pgp e MRP1e utilizamos o ensaio Rho+CSA para avaliar a atividade destas proteínas (VASCONCELOS *et al.*, 2011). A proteína Pgp foi detectada em um percentual elevado de amostras de LMC sendo o maior nível de expressão observado nas amostras de pacientes na FB da doença. De forma semelhante, List *et al* (LIST *et al.*, 2002) observaram a expressão da Pgp em 63% dos pacientes na fase blástica da LMC. No estudo desses autores, a expressão e a atividade da Pgp, analisadas por citometria de fluxo, representaram fatores de mau prognóstico.

Comparado com o nosso estudo, Giles *et al.* (GILES *et al.*, 1999) encontraram níveis mais baixos da expressão da Pgp, ou seja, 57% em FC precoce, 65% na FC tardia, 30% na FA e 62% na FB da LMC. Turkina *et al* (TURKINA *et al.*, 1999) observaram a expressão da Pgp em quase metade dos 40 pacientes na FB da LMC. Em nosso estudo (VASCONCELOS *et al.*, 2011), oposto aos achados de Turkina (TURKINA *et al.*, 1999), a atividade MDR não foi encontrada em todos, mas em 64,42% das amostras com expressão de Pgp. Estes resultados demonstram uma discrepância entre a frequência da expressão e da atividade da Pgp na LMC. Embora a Pgp estivesse superexpressa em grande parte de nossas amostras, a discrepância observada entre a expressão e função sugere que o papel desta molécula como bomba de efluxo poderia estar inibido ou alterado. Os resultados discordantes encontrados entre a atividade e a expressão da Pgp também foram observadas por outros autores (CARTER *et al.*, 2001; LEGRAND *et al.*, 2004). Em um artigo anterior, nosso grupo já havia

demonstrado que as discordâncias entre a expressão e atividade da Pgp eram mais acentuadas nas leucemias mielóides ao contrário das linfóides (VASCONCELOS *et al*, 2007). Diversas razões podem explicar a discordância entre a expressão e a atividade da Pgp, tais como o tipo de anticorpo monoclonal, o fluorocromo, o agente modulador utilizado para detectar o fenótipo MDR (SUVANNASANKHA *et al.*, 2004) e a compartimentalização da Pgp (FERRAO *et al.*, 2001).

Ao contrário do que ocorre com a Pgp, pouco se sabe sobre a expressão da MRP1 em linhagens celulares e em células de pacientes com LMC. Em nosso trabalho, oposto aos achados observados com a expressão da Pgp, não houve discordância entre a expressão da MRP1 e o ensaio Rho+CSA quando a mesma amostra foi analisada por ambos os ensaios, nas fases iniciais, tardia, ou avançada de LMC. No entanto, a atividade da MRP1 (fenótipo $MRP1^+$ $Rho+CSA^+$) foi menor do que o fenótipo $Pgp^+$ $Rho+CSA^+$ ($p$ = 0,003). Esta constatação sugere que a MRP1 funcional é menos frequente em células da LMC. Outra possibilidade é a de que o ensaio da Rho+CSA não seja capaz de detectar a atividade da MRP1 da mesma maneira que ele detecta a atividade da Pgp. Em outro estudo (CARTER *et al.*, 2001), a baixa frequência de expressão da MRP1 também foi encontrada em células da LMC. Além disso, Wang *et al.* observaram que os níveis de MRP1 não se correlacionaram com o resultado do tratamento em pacientes com LMC (WANG *et al.*, 2008). Embora tenha sido demonstrado em estudos *in vitro* que o imatinibe é um substrato para MRP1 (CZYZEWSKI AND STYCZYNSKI, 2009), o papel clínico da superexpressão da MRP1 em células de LMC ainda não foi elucidado.

Com relação ao tratamento clínico, foi demonstrado que o índice prognóstico de Sokal é preditivo de resposta molecular em pacientes com LMC tratados com imatinibe (ROSTI *et al.*, 2003; CASTAGNETTI *et al*., 2009). Assim, foi realizada uma análise

comparativa entre as expressões de Pgp ou MRP1 e o ensaio Rho+CSA em relação às categorias de Sokal. Não houve diferença entre os ensaios de MDR de acordo com os diferentes escores de Sokal. No entanto, a expressão da Pgp, em oposição à da MRP1, foi mais frequente nas amostras de pacientes que apresentaram baixo escore de Sokal do que nas que apresentaram escores intermediário ou alto. Além disso, apenas no grupo de baixo risco havia uma diferença estatística entre as amostras para o fenótipo $Pgp^+$ $Rho+CSA^+$ ao contrário de $MRP1^+$ $Rho+CSA^+$ ($p$ = 0,003). As razões para estes resultados não são completamente compreendidas. Contudo, é importante salientar que as células que expressam Pgp podem ser mais frequentemente funcionais, em oposição àquelas que expressam MRP1, devido ao fato de que as células da LMC são originadas a partir de células tronco hematopoiéticas expressando Pgp e BCRP ($CD34^+$ $CD38^-$) que podem estar contribuindo em grande parte para a atividade MDR observada na LMC (RAAIJMAKERS *et al.*, 2007).

Assim como observado por outros autores (CARTER *et al.*, 2001), nosso grupo também observou a presença da atividade das proteínas MDR na ausência das expressões das proteínas Pgp e MRP1. Tal observação sugere a existência de outra proteína transportadora de efluxo de drogas. Portanto, além da utilização dos ensaios Rho+CSA (VASCONCELOS *et al.*, 2011) e $DiOC_2$+CSA (VASCONCELOS *et al.*, 2007) visando a análise da atividade das proteínas transportadoras nas amostras de pacientes com LMC, implantamos o ensaio PhA+FTC, descrito como específico para a proteína transportadora BCRP (ROBEY *et al.*, 2004). A importância desse ensaio se deve ao fato de que o imatinibe pode ser exportado da célula por esta proteína como observado anteriormente (BURGER *et al.*, 2004).

Utilizando diferentes linhagens celulares como ferramentas para a padronização do ensaio PhA+FTC, foi possível detectar a atividade da proteína BCRP em uma

linhagem que expressava a proteína BCRP, mas não a Pgp. Desta forma, a implantação do ensaio PhA+FTC em linhagens celulares corroboraram os dados publicados por Robey *et al* que apontam este método como específico para a detecção da atividade da BCRP (ROBEY *et al.*, 2004). Após a padronização do ensaio PhA+FTC, foram analisadas 55 amostras leucêmicas de pacientes com LMC. Verificamos que a positividade para a atividade BCRP, através do ensaio PhA+FTC, foi significativamente maior nas amostras dos pacientes quando comparado com as amostras dos indivíduos saudáveis ($p$ = 0,0385). Ressaltamos, porém, que não há registros na literatura sobre a avaliação da atividade da proteína transportadora de efluxo BCRP em amostras de pacientes com LMC, através do ensaio PhA+FTC, tornando impossível comparar nossos resultados com o de outros autores. Entretanto, empregando metodologia diferente, resultados semelhantes foram obtidos por Jordanides *et al,* utilizando amostras de pacientes com LMC na FC enriquecidas com células $CD34^+$. No estudo desses autores, as células tronco leucêmicas apresentaram expressão e atividade aumentadas de BCRP em relação à mesma população de células tronco em indivíduos saudáveis (JORDANIDES *et al.*, 2006). Em nosso estudo, embora não tenhamos utilizados marcadores específicos para a identificação das células tronco nas amostras de pacientes, avaliamos a influência do percentual de células blásticas no nível da atividade da BCRP através do ensaio PhA+FTC. Para tal, comparamos o nível de atividade da BCRP em amostras de LMC na FC com a FB. Não foi detectada diferença estatística entre as duas fases analisadas (FC *vs* FB+FA $p$ = 1,0000).

Independente da fase da doença, as amostras dos pacientes também foram analisadas segundo a origem do material coletado (SP ou MO). Apesar da MO ser fonte de células tronco hematopoiéticas, a atividade da BCRP não foi associada ao tipo de material coletado do paciente ($p$ = 0,467). Nossos dados, portanto, indicam que a

atividade da BCRP detectada pelo ensaio PhA+FTC não pode ser atribuído ao estágio de maturação celular ou ao tipo de material coletado, sugerindo ser uma característica da LMC.

Para avaliarmos se a resistência, potencialmente mediada pela BCRP, estaria relacionada ao tratamento clínico, os resultados das amostras de pacientes previamente tratados foram confrontados com os resultados das amostras analisadas no momento do diagnóstico. A positividade no ensaio PhA+FTC foi significativamente maior nas amostras dos pacientes previamente tratados quando comparados com aqueles que não haviam recebido tratamento ($p$ = 0,0375). Este resultado sugere que o tratamento clínico pode ter estimulado a atividade do transportador BCRP. Reforçando este achado, outros autores observaram a influência do tratamento na atividade funcional da proteína BCRP em outros tipos de leucemias (SVIRNOVSKI *et al*., 2009). Em amostras de pacientes com LLA, analisadas na recaída da doença, a atividade da proteína BCRP estava aumentada quando comparada às amostras analisadas no momento do diagnóstico, sugerindo que o tratamento prévio possa ter estimulado a expressão da BCRP. Em outro estudo, entretanto, não houve alteração da atividade detectada antes ou depois da administração do tratamento clínico em pacientes com LMA ou com LLC (VAN DER POL MA *et al*., 2003).

Conforme comentado anteriormente, as células leucêmicas de pacientes podem apresentar mais de um transportador de efluxo ao contrário do que normalmente é observado em linhagens celulares. Com intuito de avaliarmos se o ensaio PhA+FTC seria capaz de detectar a atividade de outros transportadores de efluxo realizamos, nas mesmas amostras de LMC, o ensaio de atividade PhA+FTC e da expressão das proteínas Pgp e MRP1.

A positividade no ensaio PhA+FTC associada à coexpressão das proteínas Pgp e MRP1 ocorreu em 92% das amostras de LMC embora não tenha sido observado correlação entre os níveis de atividade detectados pelos dois ensaios (PhA+FTC *vs* MRP1, r = 0,1506, *p* = 0,4186; PhA+FTC *vs* Pgp, r = 0,1887, *p* = 0,1803). Estes resultados sugerem que ambas as proteínas podem exercer um papel na extrusão do PhA contrariando os resultados obtidos em linhagens celulares. Entretanto, a possibilidade de haver expressão da proteína transportadora BCRP concomitantemente com as expressões de Pgp e MRP1 não pode ser descartada. A atividade simultânea de proteínas transportadoras de efluxo já foi relatada previamente e foi associada a um pior prognóstico em amostras de pacientes com LMA (LEGRAND *et al*.,1999). Ressaltamos, porém, que a avaliação da atividade da BCRP utilizando o fluorocromo PhA em amostras de pacientes com LMC não pode ser comparada com resultados da literatura, uma vez que o nosso estudo é o primeiro a analisar amostras de LMC com essa metodologia.

A avaliação do ensaio de marcação com o anticorpo monoclonal anti-BCRP associado ao ensaio PhA+FTC poderia elucidar algumas hipóteses acima descritas. Ao longo deste trabalho, testamos alguns anticorpos por citometria de fluxo e também por *immunoblotting* em linhagens celulares. Entretanto, a sensibilidade e a especificidade foram insatisfatórias inviabilizando a detecção da proteína BCRP em amostras de pacientes.

Em algumas amostras de pacientes com LMC, a atividade das proteínas transportadoras de efluxo foi avaliada simultaneamente através de dois ensaios: Rho+CSA e PhA+FTC. O ensaio Rho+CSA foi capaz de detectar a atividade MDR em um número significativamente maior de amostras do que o ensaio PhA+FTC, possivelmente devido à falta de especificidade dos reagentes utilizados.

O fluorocromo Rho é substrato para diferentes proteínas transportadoras de efluxo e a CSA, utilizada neste estudo como modulador da MDR, também é considerada um modulador inespecífico para as proteínas transportadoras da família ABC (QADIR *et al*., 2005; MINDERMAN *et al*., 2002).

O fluorocromo Rho pode ser substrato para várias proteínas transportadoras de efluxo, dentre elas a Pgp (VAN DER SANDT *et al*., 2000) e a MRP1 (DOGAN *et al*., 2004; PEC *et al*., 2002). A proteína BCRP selvagem não tem afinidade por este fluorocromo, contudo a ocorrência da mutação R482T torna esta proteína capaz de extruir a Rho por alterar a especificidade por substratos (HONJO *et al.*, 2001). Portanto, a Rho é capaz de detectar a atividade de um número maior de proteínas transportadoras, sendo o percentual de positividade neste ensaio, maior do que em qualquer outro segundo demonstrado por resultados obtidos no presente estudo e nas publicações de nosso grupo (VASCONCELOS *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2011). Dessa forma, sugerimos que o fluorocromo Rho talvez seja adequado para um *screening* inicial, de forma a indicar a presença de um transportador de efluxo. Nesta situação seria desejável o emprego de um fluorocromo mais específico voltado para a identificação da proteína responsável pelo efluxo de drogas, visto que os moduladores das bombas de efluxo também podem ser específicos.

## 5.2 Níveis dos RNAm dos transportadores de efluxo (*ABCB1* e *ABCG2*) e influxo (*SLC22A1*) em amostras de pacientes com LMC

Algumas publicações descrevem que a detecção dos transportadores de efluxo e de influxo de substâncias no nível de RNAm pode ser utilizada na predição da resposta ao tratamento clínico com imatinibe. Para avaliar esta hipótese, os níveis de RNAm dos transportadores de efluxo e de influxo foram analisadas amostras de pacientes que se

encontravam predominantemente na FC, e naqueles que não tivessem recebido tratamento prévio. Nossos resultados demonstraram que os RNAm dos genes *ABCB1* e *SLC22A1* estavam em níveis reduzidos e o RNAm *ABCG2* não estava alterado na maioria das amostras.

Os níveis reduzidos do RNAm *ABCB1* foram predominantes nas amostras dos pacientes com LMC em relação às amostras de indivíduos saudáveis. Resultados semelhantes foram descritos por Carter *et al*. (CARTER *et al.*, 2001). Embora esses autores não tenham descrito o número de amostras analisadas, foi relatado que algumas amostras apresentaram níveis reduzidos, iguais ou aumentados em relação aos indivíduos saudáveis. Em outro relato, os níveis de RNAm *ABCB1* em amostras de MO de pacientes não diferiram das amostras de MO normal (CROSSMAN *et al.*, 2005), enquanto em um terceiro estudo, foi demonstrado que células tronco e células progenitoras apresentaram níveis mais elevados dos RNAm *ABCB1* do que as células diferenciadas tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com LMC na FC (JIANG *et al*., 2007). Estes artigos demonstram, de forma semelhante aos nossos resultados, a heterogeneidade dos dados existentes em relação aos níveis de RNAm *ABCB1* na LMC.

Algumas publicações relatam que os níveis do RNAm *ABCG2* estão aumentados em células $CD34^+$ em relação à células mononucleares dos mesmos pacientes com LMC na FC (PORRO *et al.*, 2011; JIANG *et al*., 2007) semelhante ao que acontece com os níveis de *ABCB1*. Em nosso estudo comparamos os níveis de RNA *ABCG2* das células de pacientes com aqueles encontrados em leucócitos de indivíduos saudáveis. Os níveis de RNAm *ABCG2* foram semelhantes aos dos indivíduos saudáveis não sendo detectadas alterações (CROSSMAN *et al*., 2005).

Também em nossas amostras de pacientes o gene *SLC22A1*, que codifica a proteína transportadora de influxo OCT1, apresentou níveis reduzidos de RNAm em relação às amostras de indivíduos saudáveis contrariando o que foi descrito por Jiang *et al*. (JIANG *et al*., 2007).

Os estudos anteriormente citados descrevem níveis aumentados dos RNAm dos transportadores de efluxo em células hematopoéticas normais ou leucêmicas e níveis reduzidos em células diferenciadas normais e leucêmicas. Entretanto, em relação aos níveis de expressão do gene SLC22A1 ocorre o oposto. O RNAm está reduzido em células imaturas e aumentado em células diferenciadas. (JIANG *et al*., 2007; PORRO *et al.*, 2011).

Os níveis reduzidos dos RNAm *ABCB1* e *ABCG2* em nossas amostras podem ser explicados pelo estágio de diferenciação das células presentes nas amostras dos pacientes na FC. Esta fase da doença é caracterizada pela presença de células diferenciadas e, portanto, que expressam níveis reduzidos destes transportadores.

Em nosso estudo, foi possível avaliar a expressão proteica e do RNAm da Pgp em 49 amostras de LMC. Foram observados altos níveis de RNAm de *ABCB1* codificando níveis reduzidos da proteína Pgp (2% das amostras) e níveis reduzidos de RNAm codificando níveis aumentados de proteína (71,42% das amostras). Resultados semelhantes aos nossos foram observados por Nakanishi *et al*. analisando linhagens celulares com fenótipo MDR (NAKANISHI AND ROSS *et al*., 2012). Esses autores observaram a superexpressão da proteína BCRP, sem amplificação do gene *ABCG2*, resultado este que também foi confirmado por outros autores (KNUTSEN *et al*., 2000; VOLK *et al*., 2002). Tais achados sugerem a presença de alterações nos mecanismos de regulação pós transcricional nas linhagens celulares descritas nestas publicações e possivelmente nas amostras de pacientes analisados em nosso estudo.

A análise da resposta ao tratamento clínico em nosso estudo ficou comprometida devido à ausência de dados nos prontuários dos pacientes referentes à resposta molecular e citogenética aos 3, 6 e 12 meses de tratamento como preconizado pelo grupo ELN (BACCARANI *et al*., 2009). A informação disponível para o maior número de pacientes foi à resposta molecular após 12 meses de tratamento com imatinibe (27/63 pacientes). Nos pacientes que não possuíam laudo da resposta molecular foram aplicados os seguintes critérios para avaliar a resposta: progressão para outra fase da doença e aquisição de mutação no gene *BCR-ABL*.

Mesmo com níveis reduzidos dos RNAm *ABCB1* e *ABCG2* muitos pacientes apresentaram resistência ao imatinibe em algum momento do tratamento clínico. Em algumas publicações a correlação entre a expressão de RNAm dos transportadores de efluxo e influxo e a resposta ao tratamento clínico foi avaliada. Zhong *et al*. relataram que pacientes apresentando altos níveis do RNAm *ABCB1* não alcançaram RCC (ZHONG *et al*., 2012). Em outro estudo, os pacientes que expressavam altos níveis da proteína Pgp ou apresentavam atividade elevada tiveram sobrevida duas vezes mais curta (TURKINA *et al*., 1999).

Em nosso trabalho, os níveis do RNAm do transportador de influxo OCT1 (*SLC22A1*) estavam reduzidos em 77,78% das amostras dos pacientes resistentes o que poderia indicar a participação deste transportador na resistência clínica. Embora Engler *et al*. (ENGLER *et al*., 2010) tenham descrito que a presença do RNAm *SLC22A1* não seja indicativa da função de OCT1, alguns artigos sugerem que o RNAm e não a proteína ou mesmo a atividade dos transportadores seja fator prognóstico na LMC. Pacientes apresentando altos níveis de *SLC22A1* tiveram taxas superiores de RCC, sobrevida livre de progressão e sobrevida global comparado aos pacientes com níveis reduzidos de *SLC22A1* (WANG *et al*., 2008). Em outros relatos, os níveis reduzidos de

RNAm *SLC22A1* foram associados ao grupo de pacientes que não alcançaram RCC (CROSSMAN *et al*., 2005; ZHONG *et al*., 2012) ou RMC (NARDINELLI *et al*., 2012). White *et al*. contradizem estes achados e descrevem a análise isolada dos níveis do RNAm *SLC22A1* como insuficiente para predizer a resposta ao tratamento clínico com imatinibe e a progressão da doença (WHITE *et al*., 2010; WHITE *et al.*, 2012).

Em apenas um de 63 pacientes com LMC, a resistência ao tratamento clínico com imatinibe pode ser explicada devido à mutação T315I que impede a ligação do imatinibe à proteína BCR-ABL (JABBOUR *et al*., 2009). Em alguns pacientes a resistência pode ter ocorrido devido à diminuição da dose clínica do imatinibe após a constatação de toxicidade ao medicamento.

A ocorrência de toxicidade levou à suspensão do tratamento com imatinibe e, no momento de sua reintrodução, à redução da dosagem da droga. Em 28,57% dos pacientes que apresentaram toxicidade, doses reduzidas de imatinibe podem ter induzido ao desenvolvimento de resistência. Entretanto, em 17,46% pacientes, houve progressão da doença sem toxicidade prévia e/ou alteração da dosagem do imatinibe.

Em resumo, existe discordância na literatura sobre o papel dos níveis de RNAm na avaliação da resposta ao tratamento com imatinibe. Alguns trabalhos atribuem um papel enquanto outros não encontram qualquer associação entre os transportadores e o tratamento. Além disto, são poucos os dados publicados em amostras de pacientes com LMC. Portanto, mais trabalhos são necessários, sobretudo aqueles dirigidos aos mecanismos de regulação pós-transcricional, como microRNA ou polimorfismo, para tentar elucidar o papel dos transportadores na resistência ao tratamento.

### 5.3 Imatinibe como substrato e modulador da Pgp

Para avaliarmos de forma indireta uma possível interação entre o imatinibe e a Pgp, utilizamos linhagens celulares leucêmicas expressando ou não o transportador de efluxo Pgp. O racional para este estudo baseou-se em nossas observações de que o percentual de pacientes na FCI com expressão da Pgp era maior do que aqueles na FCT (VASCONCELOS *et al*., 2011). Além disto, alguns pacientes apresentavam aumento e outros apresentavam diminuição nos níveis de expressão assim como também nos níveis de atividade da Pgp quando estudados em diferentes ocasiões no curso da doença. A razão para a diminuição dos níveis de MDR em pacientes com LMC não é completamente conhecida. Um estudo mostrando a análise sequencial do fenótipo MDR em 14 pacientes com LMC na FB, que haviam recebido quimioterápicos, revelou que 7/9 amostras Pgp negativas permaneceram negativas, mas duas se tornaram Pgp positivas em uma segunda análise (TURKINA *et al*., 1999). Outro estudo também demonstrou mudanças na expressão de Pgp em pacientes com LMC na FA durante o tratamento com imatinibe. Sete pacientes Pgp negativos tornaram-se Pgp positivos após a terapia com o imatinibe, e três mantiveram-se Pgp positivos após a mesma terapia (STROMSKAYA *et al*., 2008). Para compreender melhor os dados obtidos pelo nosso grupo e por outros autores em amostras de pacientes, experimentos em linhagens celulares com expressão ou não da Pgp foram conduzidos.

O imatinibe induziu à morte de forma diferencial em linhagens celulares de acordo com a expressão ou não da Pgp. A linhagem K562 (Pgp-) foi significativamente mais sensível à morte celular do que a linhagem K562-Lucena 1 (Pgp+). Além disso, houve redução da expressão do RNAm *ABCB1* na K562 enquanto os níveis do RNAm, da proteína e da atividade da Pgp na linhagem K562-Lucena 1 aumentaram mediante tratamento com imatinibe. Estes dados corroboram os dados obtidos em amostras de

pacientes com LMC sugerindo que a Pgp pode ter alguma participação na resistência ao imatinibe como demonstram nossos resultados e de outros grupos (CORRÊA *et al*., 2012). Além disso, observamos que o imatinibe aumentou a retenção do fluorocromo Rho no interior da linhagem K562-Lucena 1, Pgp positiva, indicando uma função como modulador da Pgp. Há fortes evidências sugerindo a existência de uma interação entre a Pgp e o imatinibe, porém o tipo de interação ainda não foi descrito. Existem relatos descrevendo o imatinibe como agente modulador e como substrato da Pgp (CORRÊA *et al*., 2012).

Sabe-se que diversas classes de drogas são capazes de induzir a expressão de Pgp. Portanto, é importante salientar que substâncias não anticancerígenas, utilizadas em paralelo ao imatinibe dirigidas para uma série de comorbidades podem também estimular a expressão e/ou atividade da Pgp (SCHUETZ *et al*., 1996; SYNOLD *et al*., 2001; DUBUSKE *et al*., 2005). Além de induzir à expressão da Pgp, estas drogas podem inibir também a atividade da Pgp através do bloqueio do processo de hidrólise de ATP ou por competição pelo sítio de ligação da droga (DUBUSKE *et al*., 2005). Além disso, um número de diferentes constituintes à base de plantas e de alimentos colaboram para modificações potenciais e, desse modo, podem eventualmente causar consequências clínicas relevantes (MARCHETTI *et al*., 2007).

Em conjunto, o nosso estudo e os dados da literatura indicam que o imatinibe nem sempre é capaz de inibir a Pgp, podendo também aumentar a sua expressão e assim colaborar com a resistência clínica ao imatinibe.

## 5.4 Inibição da proteína BCR-ABL pelo imatinibe em células com fenótipo de resistência a múltiplas drogas

Além da importância da identificação do mecanismo envolvido na resistência ao imatinibe, em amostras de pacientes com LMC, é igualmente relevante a detecção de fatores capazes de auxiliar na detecção de um possível prognóstico desfavorável antes do início do tratamento com este fármaco.

A correlação entre os níveis de expressão da proteína CrkL, sob a forma fosforilada, e a presença de BCR-ABL (TEN HOEVE *et al*, 1994a), foi a base para o desenvolvimento de uma estratégia visando prever a resposta clínica ao tratamento com imatinibe. Isso foi possível através da análise da inibição da atividade tirosina quinase BCR-ABL, que é o alvo para este fármaco, através da quantificação dos níveis da proteína CrkL sob a forma fosforilada (pCrkL) (WHITE *et al.*, 2005). Utilizando esta mesma estratégia, avaliamos a linhagem K562 (Pgp-), e a linhagem K562-Lucena 1, (Pgp+) como ferramentas para a padronização e o estabelecimento da técnica. A linhagem K562 necessitou de uma concentração menor de imatinibe para que ocorresse a redução de pCrkL em comparação à linhagem Pgp positiva. Estes dados corroboram os dados observados em nosso estudo que demonstraram a maior resistência da linhagem K562-Lucena1 Pgp+ ao imatinibe. Uma vez validada, esta metodologia foi aplicada à análise das amostras de pacientes.

A linhagem K562 necessitou 0,48 µM para reduzir em 50% a proteína pCrkL, enquanto a linhagem K562-Lucena 1 necessitou de uma concentração de 0,89µM de imatinibe ($p$ = 0,0001), sendo esta diferença estatisticamente significativa. Entretanto, em comparação à maioria das amostras dos pacientes, a linhagem K562 foi mais resistente. A K562 é uma linhagem proveniente de uma paciente na FB da LMC (LOZZIO *et al*., 1975). Esta fase da LMC caracteriza-se pela resistência ao imatinibe

(JABBOUR *et al*., 2012) e em nosso estudo não havia amostras de pacientes na FB. Apesar da FA da LMC apresentar um pior prognóstico em relação a FC (JABBOUR *et al*., 2012), apenas um de cinco pacientes necessitou de concentrações maiores do que 0,1 µM de imatinibe para reduzir pCrkL em 50%.

Tendo em vista os resultados obtidos com as linhagens celulares indicando que imatinibe seria substrato, modulador da Pgp, e que ainda promoveria a sua transcrição, passamos a correlacionar os resultados do percentual de pCrkL com os resultados da expressão da Pgp e a atividade dos transportadores de efluxo de substâncias.

No ensaio Rho+CSA, a frequência de positividade não diferiu entre os grupos resistente e sensível ($p$ = 0,3382). Entretanto, o grupo de amostras com perfil de resistência apresentou maior capacidade de efluxo do que o grupo de amostras com perfil de sensibilidade ($p$ = 0,0281). Levantamos, então, a hipótese de que o nível de intensidade do efluxo seria mais importante do que a constatação da atividade da proteína transportadora de efluxo.

A presença ou os níveis de expressão da proteína Pgp não foi associada à resposta ao imatinibe *in vitro* não podendo ser associada à resistência neste estudo. Utilizando o ensaio PhA+FTC para detectar a atividade dos transportadores de efluxo, foi observado o oposto. As amostras sensíveis apresentaram maior percentual de positividade e maior capacidade de efluxo do que as amostras resistentes. Jordanides *et al.* (JORDANIDES *et al*., 2006) analisando células $CD34^+$, descreveram que a BCRP está superexpressa nestas células e que sua atividade é inibida pelo imatinibe que funcionaria como um agente modulador. Portanto, a superexpressão ou a atividade MDR aumentada não afetaria a concentração intracelular de imatinibe como também não mediaria à resistência nestas células.

A resposta molecular ao tratamento com imatinibe foi analisada após 12 messes de tratamento e o resultado correlacionado com o percentual de redução de pCrkL no momento do diagnóstico. As amostras apresentando ausência de resposta molecular ou que alcançaram RMM foram igualmente distribuídas entre os grupos resistente e sensível. Nosso estudo demonstrou então, que o ensaio de redução dos níveis de pCrkL, avaliado ao diagnóstico, não foi capaz de predizer a resposta molecular avaliada após 12 meses de tratamento com imatinibe.

White *et al* (WHITE *et al.*, 2005) desenvolveram a estratégia $IC50^{Imatinibe}$, que avalia a possibilidade de predição da resposta molecular após 12 meses de tratamento com imatinibe. Entretanto, Shibata *et al*, (SHIBATA *et al*., 2011) demonstraram que em um número muito pequeno de amostras, a ausência de redução de pCrkL mediante incubação com imatinibe ao diagnóstico, não se traduziu em resistência ao tratamento clínico com imatinibe. Porém, na maioria das amostras houve concordância entre a $IC50^{Imatinibe}$ e a resposta ao tratamento clínico. Em outro artigo, pacientes resistentes à terapia com imatinibe apresentaram níveis significativamente menores de pCrkL do que os sensíveis (JILANI *et al*., 2008) sugerindo que a resistência ao imatinibe não seja consequência do aumento de atividade das vias reguladas por BCR-ABL, mas provavelmente pela ativação de outros mecanismos.

## VI DISCUSSÃO GERAL

As proteínas transportadoras da família ABC podem ser consideradas como potenciais alvos terapêuticos. Entretanto, há necessidade crítica de se demonstrar qual transportador é responsável pelo efluxo de drogas antes de considerá-lo como um alvo terapêutico, capaz de ser inibido ou modulado por agentes específicos.

Os dados da literatura demonstram a complexidade do tema, uma vez que a maioria dos estudos examina somente um transportador, podendo se constituir em um

viés de publicação. Entretanto, Wilson *et al*. demonstraram, através de análise da expressão gênica em amostras de LMA, que expressões elevadas das proteínas transportadoras *ABCB1 e ABCG2* foram encontradas em pacientes que exibiram as maiores taxas de resistência associadas com a pior sobrevida global (WILSON *et al*., 2006). Portanto, os dados da literatura, e aqueles encontrados em nosso estudo, indicam que mais de uma proteína transportadora pode estar presente nas células leucêmicas. Tal fato levanta a possibilidade da ocorrência de um maior efluxo de drogas e menor chance de sucesso com substâncias que são substratos para essas proteínas, e também com os agentes moduladores das bombas de efluxo. Além disso, hoje se sabe que o processo da resistência a drogas é multifatorial. No caso da LMC, os pacientes podem eventualmente apresentar associação de proteínas de efluxo e de influxo e mutação *BCR-ABL* tornando a resposta ao imatinibe clinicamente improvável.

Apesar dos estudos clínicos utilizando agentes moduladores, associados aos quimioterápicos, não terem demonstrado resultados satisfatórios (KOLITZ *et al*., 2010; DAENEN et al., 2004), do transportador ABCB1/Pgp pode se mostrar capaz de conferir um pior prognóstico (WILSON *et al*., 2006; BURNETT *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2008)**.** Dessa forma, uma investigação mais ampla e criteriosa se faz necessária para respondermos a pergunta se o acúmulo reduzido do imatinibe, determinado por proteínas transportadoras de efluxo e/ou de influxo, são responsáveis pela falha terapêutica em pacientes com LMC.

O nosso estudo foi capaz de demonstrar que o imatinibe atua não somente como substrato, mas também como modulador do efluxo de substâncias, aumentando dessa forma, a complexidade sobre o assunto.

Como observado em nosso estudo, a expressão e a atividade da Pgp são predominantes na LMC em relação aos outros transportadores de efluxo. Este achado é

de relevância clínica, pois o imatinibe, considerada a droga de escolha para o tratamento atual da LMC, é substrato para a Pgp. Portanto, a combinação de estratégias utilizadas em nosso estudo, incorporando o ensaio de redução dos níveis de pCrkL, tem o potencial de identificar a emergência da resistência ao imatinibe e contribuir para a escolha de terapias alternativas.

# VII. CONCLUSÕES

- As discordâncias observadas entre a expressão e a função da Pgp sugerem que a Pgp possua outros papéis além da extrusão de substâncias;

- A proteína MRP1 parece desempenhar um papel de menor relevância na resistência aos fármacos em células leucêmicas de pacientes com LMC;

- O ensaio PhA+FTC mostrou ser capaz de distinguir a ausência e a presença de atividade da proteína BCRP em linhagens e em células de com LMC;

- Níveis reduzidos de RNAm *ABCB1*, associados aos níveis elevados da expressão da Pgp, sugerem desregulação no mecanismo de tradução e/ou degradação com consequente acúmulo desta proteína.

- O imatinibe induz alteração nos níveis da proteína Pgp e do RNAm *ABCB1* em linhagens Pgp positivas e negativas e em células de pacientes após o tratamento clínico com este fármaco.

- O imatinibe é capaz de impedir a extrusão de rodamina e atuar como agente modulador do efluxo mediado pela proteína Pgp.

- A atividade dos transportadores de efluxo, avaliada por ambos os ensaios Rho+CSA e PhA+FTC, foi mais frequente em pacientes previamente tratados comparada com os pacientes não tratados.

- As células de pacientes resistentes ao imatinibe (avaliado pelo ensaio pCrkL) apresentam altos níveis de atividade das proteínas transportadoras ao contrário das células sensíveis ao imatinibe.

- Os ensaios utilizados isoladamente não são capazes de detectar a atividade das três proteínas de efluxo, indicando assim a necessidade da utilização dos dois ensaios (Rho+CSA e PhA+FTC).

- A inibição da atividade TK proporcionada pelo imatinibe nas amostras de pacientes com LMC ocorre de forma independente da expressão da Pgp e da atividade da BCRP.

- Células Pgp positivas necessitam de maior concentração de imatinibe para inibir a atividade TK e induzir a morte celular ao contrário das células Pgp negativas, sugerindo que o imatinibe seja substrato da Pgp.

# VIII. PERSPECTIVAS

1. **Desenvolvimento e caracterização de uma linhagem celular MDR, resistente ao imatinibe, a partir de uma linhagem não-MDR.**
   - Investigar possível amplificação e ou mutação no alvo do imatinibe (*BCR-ABL*),
   - Verificar se há alteração nos níveis de expressão do transportador de influxo de drogas - proteína OCT1- e das proteínas inibidoras da apoptose: XIAP, survivina, c-IAP1, c-IAP2;
   - Caracterizar o perfil de resistência cruzada aos TKIs (nilotinibe e dasatinibe) e a outros quimioterápicos;
   - Testar o efeito antitumoral de novos compostos antitumorais.

2. **Testar a capacidade do imatinibe em promover a retenção de outros inibidores de TK utilizados no tratamento da LMC.**

3. **Implantar o monitoramento, através da análise sequencial da resposta ao tratamento clínico com imatinibe por meio da redução da proteína pCrkL.**

## IX. REFERÊNCIAS

ADVANI A. S. & PENDERGAST AM. BCR-ABL variants: biological and clinical aspects. Leukemia Research 26: 713-720, 2002.

BACCARANI M, CORTES J, PANE F, *et al*. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. J Clin Oncol. 2009 Dec 10;27(35):6041-51.

BACCARANI M, SAGLIO G, GOLDMAN J, *et al*. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2006 Sep 15;108(6):1809-20.

BAIN BJ. Diagnosis from the blood smear. N Engl J Med. 2005; 353(5):498-507.

BARBER DL, MASON JM, FUKAZAWA T, *et al*. Erythropoietin and interleukin-3 activate tyrosine phosphorylation of Cbl and association with Crk adaptor proteins. Blood. 1997 May 1;89(9):3166-74.

BELLAMY WT. P-glycoprotein and multidrug resistance. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1996; 36: 161-183.

BHATIA R, HOLTZ M, NIU N, *et al*. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. Blood 2003;101:4701-7.

BIRGE RB, KALODIMOS C, INAGAKI F, TANAKA S. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. Cell Commun Signal. 2009 May 10;7:13.

BRANFORD S, RUDZKI Z, WALSH S et al. Detection of *BCR-ABL* mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. Blood 102: 276-283, 2003.

BUCHDUNGER E, ZIMMERMANN J, METT H et al. Inibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylamino-pyrimidine derivative. Cancer Res 1996; 56: 100-04.

BURGER H, VAN TOL H, BOERSMA AW, *et al*. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. Blood. 2004 Nov 1;104(9):2940-2.

BURNETT AK, MILLIGAN D, GOLDSTONE A, *et al.* The impact of dose escalation and resistance modulation in older patients with acute myeloid leukaemia and high risk myelodysplastic syndrome: the results of the LRF AML14 trial. Br J Haematol. 2009 May;145(3):318-32.

CARTER A, DANN EJ, KATZ T, *et al*. Cells from chronic myelogenous leukaemia patients at presentation exhibit resistance not mediated by either MDR1 or MRP1. Br J Haematol 2001;114:581–590.

CASADO FJ, MONTSERRAT E, GIL J, *et al*. Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Molina-Arcas M, Bellosillo B. Blood 2003 15;101(6):2328-34.

CASTAGNETTI F, PALANDRI F, AMABILE M, *et al*; GIMEMA CML Working Party. Results of high-dose imatinib mesylate in intermediate Sokal risk chronic myeloid leukemia patients in early chronic phase: a phase 2 trial of the GIMEMA CML Working Party. Blood. 2009;113(15):3428-34.

CLARKSON B, STRIFE A, WISNIEWSKI D, *et al*. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. Leukemia 2003; 17:1211-1262.

COLICELLI J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. Sci Signal 2010; 14:3(139):re6.

CORBIN AS, LA ROSÉE P, STOFFREGEN EP, et al. Several *BCR-ABL* kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. Blood 2003; 101: 4611-4.

CORRÊA S, PIZZATTI L, DU ROCHER B, *et al*. A comparative proteomic study identified LRPPRC and MCM7 as putative actors in imatinib mesylate cross-resistance in Lucena cell line. Proteome Sci. 2012;10:23.

CROSSMAN LC, DRUKER BJ, DEININGER MW, *et al*. hOCT 1 and resistance to imatinib. Blood. 2005 Aug 1;106(3):1133-4.

CZYZEWSKI K AND STYCZYNSKI J. Imatinib is a substrate for various multidrug resistance proteins. Neoplasma 2009;56:202–207.

DAENEN S, VAN DER HOLT B, VERHOEF GE, *et al*. Addition of cyclosporin A to the combination of mitoxantrone and etoposide to overcome resistance to chemotherapy in refractory or relapsing acute myeloid leukaemia: a randomised phase II trial from HOVON, the Dutch-Belgian Haemato-Oncology Working Group for adults. Leuk Res. 2004 Oct;28(10):1057-67.

DALEY GQ, VAN ETTEN RA, BALTIMORE D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science. 1990 Feb 16;247(4944):824-30.

DE JONGE-PEETERS SD, KUIPERS F, DE VRIES EG, VELLENGA E. ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. Crit Rev Oncol Hematol. 2007 Jun;62(3):214-26.

DE KLEIN A, VAN KESSEL AG, GROSVELD G, *et al*. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. Nature. 1982 Dec 23;300(5894):765-7.

DEAN M, FOJO T, BATES S. Tumour stem cells and drug resistance. Nat Rev Cancer 2005;5:275–84.

DEININGER MW, GOLDMAN JM, LYDON N, MELO JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL positive cells. Blood 1997; 90: 3691-98.

DEININGER MW, GOLDMAN JM, MELO JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000 Nov 15;96(10):3343-56. Review.

DHOOGE C, DE MOERLOOSE B, LAUREYS G, *et al*. Expression of the multidrug transporter P-glycoprotein is highly correlated with clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: results of a long-term prospective study. Leuk Lymphoma. 2002 Feb;43(2):309-14.

DOGAN AL, LEGRAND O, FAUSSAT AM, *et al*. Evaluation and comparison of MRP1 activity with three fluorescent dyes and three modulators in leukemic cell lines. Leuk Res. 2004 Jun;28(6):619-22.

DRUKER BJ, TALPAZ M, RESTA DJ *et al*. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2001; 344: 1031-1037.

DRUKER BJ, TAMURA S, BUCHDUNGER E et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on growth of BCR-ABL positive cells. Nat Med 1996; 2: 561-566.

DUBUSKE LM. The role of P-glycoprotein and organic anion-transporting polypeptides in drug interactions. Drug Saf. 2005;28(9):789-801.

EECHOUTE K, SPARREBOOM A, BURGER H, et al., Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice. Clin Cancer Res. 2011 Feb 1;17(3):406-15.

ENGLER JR, FREDE A, SAUNDERS VA, et al. Chronic myeloid leukemia CD34+ cells have reduced uptake of imatinib due to low OCT-1 activity. Leukemia. 2010 Apr;24(4):765-70. Epub 2010 Feb 11.

ENOMOTO A, WEMPE MF, TSUCHIDA H, *et al*. Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition. J Biol Chem. 2002 Sep 27;277(39):36262-71.

FADERL S, TALPAZ M, ESTOV Z, *et al*. CML: biology and therapy. Ann Intern. Med. 1999;131 (3), 201-219.

FELLER SM. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. Oncogene. 2001 Oct 1;20(44):6348-71.

FERRAO P, SINCOCK P, COLE S, ASHMAN L. Intracellular P-gp contributes to functional drug efflux and resistance in acute myeloid leukemia. Leuk Res 2001;25:395–405.

FRAZER R, IRVINE AE, MCMULLIN MF. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. Ulster Med J. 2007 Jan;76(1):8-17.

GAMBACORDI-PASSERINI, C. B., GUNBY, R. H., PIAZZA R *et al*, Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. Lancet Oncol. 2003; 4:75-85. Review.

GAMBACORTI-PASSERINI C, LE COUTRE P, MOLOGNI L *et al*. Inhibitor of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR-ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. Blood Cells Mol Dis 1997; 23: 380-94.

GILES FJ, KANTARJIAN HM, CORTES J *et al.* Multidrug resistance protein expression in chronic myeloid leukemia: associations and significance. Cancer 1999; 86: 805-813.

GOLDMAN JM AND MELO JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med. 2003;349(15):1451-64. Review.

GOLDMAN JM. Chronic myeloid leukemia-still a few questions. Exp Hematol 2004;32:2–10.

GONG S, LU X, XU Y, *et al*. Identification of OCT6 as a novel organic cation transporter preferentially expressed in hematopoietic cells and leukemias. Exp Hematol. 2002 Oct;30(10):1162-9.

GOODELL MA, BROSE K, PARADIS G, *et al*. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J Exp Med. 1996 Apr 1;183(4):1797-806.

GORRE ME, MOHAMMED M, ELLWOOD K, *et al*. Clinical resistance to STI-571cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science 2001; 293:876-80.

GOTTESMAN MM, FOJO T, BATES SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer. 2002 Jan;2(1):48-58.

GRAHAM SM, JORGENSEN HG, ALLAN E, *et al*. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571in vitro. Blood 2002;99:319-25.

GROFFEN J, STEPHENSON JR, HEISTERKAMP N *et al*. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. Cell. 1984 Jan;36(1):93-9.

HAMILTON A, ALHASHIMI F, MYSSINA S, *et al*. Optimization of methods for the detection of BCR-ABL activity in Philadelphia-positive cells. Exp Hematol. 2009 Mar;37(3):395-401.

HAMILTON A, ELRICK L, MYSSINA S, *et al*. BCR-ABL activity and its response to drugs can be determined in CD34+ CML stem cells by CrkL phosphorylation status using flow cytometry. Leukemia. 2006 Jun;20(6):1035-9.

HAZLEHURST LA, BEWRY NN, NAIR RR, PINILLA-IBARZ J. Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation. Cancer Control. 2009 Apr;16(2):100-7. Review.

HEDIGER MA, ROMERO MF, PENG JB, *et al*. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins: Introduction. Pflugers Arch. 2004 Feb;447(5):465-8.

HEHLMANN R, HOCHHAUS A, BACCARANI M *et al*. Chronic myeloid leukaemia. Lancet. 2007 Jul 28;370(9584):342-50. Review.

HEISTERKAMP N, JENSTER G, TEN HOEVE J, *et al*. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. Nature. 1990 Mar 15;344(6263):251-3.

HERNÁNDEZ-BOLUDA JC, CERVANTES F. Prognostic factors in chronic myeloid leukaemia. Best Practice & Research Clinical Haematology 2009; 22:343–353.

HOCHHAUS A, KREIL S, CORBIN AS, *et al*. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. Leukemia. 2002;16:2190-2196

HOLTZ MS, SLOVAK ML, ZHANG F, *et al*. Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in cDiagnhronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. Blood 2002;99:3792-800.

HOLYOAKE T, JIANG X, EAVES C, EAVES A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. Blood 1999;94: 2056-64.

HONJO Y, HRYCYNA CA, YAN QW, *et al.* Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. Cancer Res. 2001 Sep 15;61(18):6635-9.

HOUGHTON PJ, GERMAIN GS, HARWOOD FC, *et al*. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. Cancer Res. 2004;64:2333-2337.

HU S, FRANKE RM, FILIPSKI KK, *et al*. Interaction of imatinib with human organic ion carriers. Clin Cancer Res. 2008 May 15;14(10):3141-8.

ILLMER T, SCHAICH M, PLATZBECKER U *et al*. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. Leukemia 2004; 18: 401-408.

ISAKOV N. A new twist to adaptor proteins contributes to regulation of lymphocyte cell signaling. Trends Immunol. 2008 Aug;29(8):388-96.

JABBOUR E AND KANTARJIAN H. Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management. Am J Hematol. 2012 Nov;87(11):1037-45.

JABBOUR E, CORTES J, SANTOS FP, *et al.*, Results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia patients who failed tyrosine kinase inhibitors after developing BCR-ABL1 kinase domain mutations. Blood. 2011; 117:3641–7.

JABBOUR E, FAVA C AND KANTARJIAN H. Advances in the biology and therapy of patients with chronic myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol. 2009 Sep;22(3):395-407.

JAGANI Z, SINGH A AND KHOSRAVI-FAR R. FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis. Biochim Biophys Acta. 2008 Jan;1785(1):63-84. Review.

JIANG X, ZHAO Y, SMITH C, *et al*. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. Leukemia. 2007 May;21(5):926-35.

JILANI I, KANTARJIAN H, GORRE M, *et al*. Phosphorylation levels of BCR-ABL, CrkL, AKT and STAT5 in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells implicate alternative pathway usage as a survival strategy. Leuk Res. 2008 Apr;32(4):643-9.

JORDANIDES NE, JORGENSEN HG, HOLYOAKE TL, MOUNTFORD JC. Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate. Blood. 2006;108:1370-1373.

KANTARJIAN H, SAWYERS C, HOCHHAUS A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to Imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. New Engl J Med. 2002;346:645-652.

KANTARJIAN HM, O'BRIEN S, CORTES JE *et al.* Complete cytogenetic and molecular responses to interferon- alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long term prognosis. Cancer 2003; 97: 1033-1041.

KNUTSEN T, RAO VK, RIED T, *et al*. Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines. Genes Chromosomes Cancer. 2000 Jan;27(1):110-6.

KOEPSELL H, LIPS K, VOLK C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. Pharm Res. 2007 Jul;24(7):1227-51.

KOLITZ JE, GEORGE SL, MARCUCCI G, *et al*.. P-glycoprotein inhibition using valspodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808. Blood. 2010 Sep 2;116(9):1413-21.

KREILL S, MULLER MC, HANFSTEIN B. Management and clinical outcome of CML patients after imatinib resistance associated with ABL kinase domain mutations. Blood 102 (Suppl 1): 71a, 2003.

LAVERDIÈRE C, CHIASSON S, COSTEA I, *et al*. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002 Nov 15;100(10):3832-4.

LEE SJ. Chronic myelogenous leukaemia. Br J Haematol. 2000 Dec;111(4):993-1009. Review.

LEGRAND O, SIMONIN G, BEAUCHAMP-NICOUD A, *et al.* Simultaneous activity of MRP1 and Pgp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with *in vivo* resistance in adult acute myeloid leukemia. Blood. 1999 Aug 1;94(3):1046-56.

LEGRAND O, ZOMPI S, PERROT JY *et al*. P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein-1 activity in 132 acute myeloid leukemias according to FAB subtypes and cytogenetics risk groups. Haematologica 2004;8:34–41.

LEWIS JM, BASKARAN R, TAAGEPERA S, *et al*. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:15174-9.

LIST AF, KOPECKY KJ, WILLMAN CL, *et al*. Cyclosporin inhibition of P-glycoprotein in chronic myeloid leukemia phase. Blood 2002;100:1910–1912.

LIST AF. Role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia. Leukemia 1996; 10: 937-942

LOURENÇO JJ, MAIA RC, SCHEINER MA, *et al*. Genomic variation at the MDR1 promoter and P-glycoprotein expression and activity in AML patients. Leuk Res. 2008 Jun;32(6):976-9.

LOZZIO CB AND LOZZIO BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood. 1975 Mar;45(3):321-34.

LUGO TG, PENDERGAST AM, MULLER AJ, WITTE ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of *BCR-ABL* oncogene products. Science. 1990 Mar 2;247(4946):1079-82.

MAHON FX, BELLOC F, LAGARDE V *et al*. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. Blood 2003; 101: 2368-2373.

MALIEPAARD M, SCHEFFER GL, FANEYTE IF, *et al*. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. Cancer Res. 2001;8:3458-3464.

MARCHETTI S, MAZZANTI R, BEIJNEN JH AND SCHELLENS JHM. Concise Review: Clinical relevance of drug-drug and herb-drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1. P-glycoprotein). The Oncologist 2007;12:927–941.

MAURO MJ, DRUKER BJ,MAZIARZ RT. Divergent clinical outcome in two CML patients who discontinued imatinib therapy after achieving a molecular remission. Leuk Res 2004;28 Suppl1:S71-3.

MELO JV AND BARNES DJ. Chronic myeloid leukemia as a model of disease evolution in human cancer. Nat Rev Cancer 2007; 7(6):441-453.

MINDERMAN H, SUVANNASANKHA A, O'LOUGHLIN KL, *et al*. P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein and breast cancer resistance protein-mediated transport: substrate and modulator specificity. Proc Am Assoc Cancer Res 2002; 43:496

NAKANISHI T AND ROSS DD. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. Chin J Cancer. 2012 Feb;31(2):73-99

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. 2006 Jul 15;108(2):678-84.

NARDINELLI L, SANABANI SS, DIDONE A, *et al.* Pretherapeutic expression of the hOCT1 gene predicts a complete molecular response to imatinib mesylate in chronic-phase chronic myeloid leukemia. Acta Haematol. 2012;127(4):228-34.

NICHOLS GL, RAINES MA, VERA JC, *et al*. Identification of CRKL as the constitutively phosphorythelated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells. Blood 84:2912, 1994.

NOWELL PC E HUNGERFORD DA. A minute chromosome in human chronic. Science. 1960; 132:1497.

ODA T, HEANEY C, HAGOPIAN JR, *et al*. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. J Biol Chem 1994; 269: 22925–22928.

OGAWA S, TOYOSHIMA H, KOZUTSUMI H, *et al*. The C-terminal SH3 domain of the mouse c-Crk protein negatively regulates tyrosine-phosphorylation of Crk associated p130 in rat 3Y1 cells. Oncogene. 1994 Jun;9(6):1669-78.

OKABE M, UNNO M, HARIGAE H, *et al*. Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: a doxorubicin importer. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Aug 5;333(3):754-62.

OLSON DP, TAYLOR BJ, LA M, *et al*. The prognostic significance of P-glycoprotein, multidrug resistance related protein 1 and lung resistance protein in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of 295 newly diagnosed patients by the Children's Oncology Group. Leuk Lymphoma 2005;46:681–91.

OZER H, GEORGE SL, SCHIFFER CA *et al*. Prolonged subcutaneous administration of recombinant alpha 2b interferon in patients with previously untreated Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myelogenous leukemia: effect on remission duration and survival: cancer and Leukemia Group B Study 8583. Blood 1993; 82: 2975-2984.

PARK TJ, BOYD K, CURRAN T. Cardiovascular and craniofacial defects in Crk-null mice. Mol Cell Biol. 2006 Aug;26(16):6272-82.

PEC MK, AGUIRRE A, FERNÁNDEZ JJ, *et al*. Dehydrothyrsiferol does not modulate multidrug resistance-associated protein 1 resistance: a functional screening system for MRP1 substrates. Int J Mol Med. 2002 Nov;10(5):605-8.

PEGGS K, MACKINNON S. Imatinib mesylate- the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2003; 348: 1048-1050.

PENG XX, TIWARI AK, WU HC, *et al*. Overexpression of P-glycoprotein induces acquired resistance to imatinib in chronic myelogenous leukemia cells. Chin J Cancer. 2012 Feb;31(2):110-8.

PLUK H, DOREY K AND SUPERTI-FURGA G. Autoinhibition of c-Abl. Cell 2002;108:247-59.

PORRO A, IRACI N, SOVERINI S, *et al*. c-MYC oncoprotein dictates transcriptional profiles of ATP-binding cassette transporter genes in chronic myelogenous leukemia CD34+ hematopoietic progenitor cells. Mol Cancer Res. 2011 Aug;9(8):1054-66.

QADIR M, O'LOUGHLIN KL, FRICKE SM, *et al*. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. Clin Cancer Res. 2005 Mar 15;11(6):2320-6.

QUINTÁS-CARDAMA A, KANTARJIAN HM, CORTES JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. Cancer Control. 2009 Apr;16(2):122-31. Review.

RAAIJMAKERS MH. ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutical targets in acute and chronic myeloid leukemia. Leukemia 2007;21:2094–2102.

REDAELLI A, BELL C, CASAGRANDE , *et al*. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. Expert. Re. Anticancer Ther., v. 4, n. 1, p. 85-96, 2004.

RESS A, MOELLING K. Bcr is a negative regulator of the Wnt signaling pathway. Nature, London, v6, 1095-1100, 2005.

ROBEY RW, MEDINA-PÉREZ WY, NISHIYAMA K, *et al*. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. Clin Cancer Res. 2001 Jan;7(1):145-52.

ROBEY RW, STEADMAN K, POLGAR O, et al. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. Cancer Res. 2004 Feb 15;64(4):1242-6.

ROSTI G, TRABACCHI E, BASSI S *et al*. Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Risk and early cytogenetic response to imatinib and interferon in chronic myeloid leukemia. Haematologica. 2003 Mar;88(3):256-9.

ROWLEY JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973 Jun 1;243(5405):290-3.

RUMJANEK VM, TRINDADE GS, WAGNER-SOUZA K et al. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. An Acad Bras Cienc. 2001 Mar;73(1):57-69. Review

SALGIA R, LI JL, EWANIUK DS, *et al.* BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function. J Clin Invest 1997;100:46-57.

SATTLER M AND SALGIA R. Role of the adapter protein CRKL in signal transduction of normal hematopoietic and BCR/ABL-transformed cells. Leukemia 1998;12: 637–644.

SAWYERS CL. Chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 1999; 340: 1330-1340.

SCHINDLER T, BORNMANN W, PELLICENA P et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. Science 2000; 289: 1938-42.

SCHINKEL AH, JONKER JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. Adv Drug Deliv Rev. 2003 Jan 21;55(1):3-29. Review

SCHUETZ EG, BECK WT AND SCHUETZ JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. Mol Pharmacol. 1996 Feb;49(2):311-8.

SHEN DW, GOLDENBERG S, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Decreased accumulation of [14C]carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. J Cell Physiol. 2000 Apr;183(1):108-16.

SHIBATA M, EZOE S, ORITANI K *et al*. Predictability of the response to tyrosine kinase inhibitors via in vitro analysis of Bcr-Abl phosphorylation. Leuk Res. 2011 Sep;35(9):1205-11.

SILVA KL, VASCONCELLOS DV, CASTRO ED, *et al*. Bisphosphonates induce apoptosis in CLL cells independently of MDR phenotype. Cancer Chemother Pharmacol. 2008 Jun;62(1):165-71.

SILVER RT, WOOLF SH, HEHLMANN R *et al.* An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hidroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. Blood 1999; 94: 1517-1536.

SOKAL JE, COX EB, BACCARANI M. Prognostic discrimination in ‘good risk’ chronic granulocytic leukemia. Blood. 1984 Apr;63(4):789-99.

STROMSKAYA TP, RYBALKINA EY, KRUGLOV SS, *et al*. Role of P-glycoprotein in evolution of populations of chronic myeloid leukemia cells treated with imatinib. Biochemistry (Mosc). 2008 Jan;73(1):29-37.

SUVANNASANKHA A, MINDERMAN H, O’LOUGHLIN KL, *et al.* Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in acute myeloid leukemia: discordance between expression and function. Leukemia 2004;18:1252–1257.

SVIRNOVSKI AI, SHMAN TV, SERHIYENKA TF, *et al*. ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells. Hematology. 2009 Aug;14(4):204-12.

SWERTS K, DE MOERLOOSE B, DHOOGE C, *et al*. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Eur J Cancer. 2006 Feb;42(3):295-309.

SYNOLD TW, DUSSAULT I AND FORMAN BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. Nat Med. 2001 May;7(5):584-90.

TALPAZ M, KANTARJIAN HM, KURZROCK R et al. Interferonn-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia: Philadelphia chromosome-positive patients. Ann Intern Med 1991; 114: 532-538.

TEN HOEVE J, ARLINGHAUS RB, GUO JQ AND HEISTERKAMP N. Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia/ leukemia. Blood 1994a; 84:1731.

TEN HOEVE J, KAARTINEN V, FIORETOS T, *et al*. Cellular Interactions of CRKL, an SH2-SH3 Adaptor Protein. Cancer Res. 1994b May 15;54(10):2563-7.

TEN HOEVE J, MORRIS C, HEISTERKAMP N AND GROFFEN J. Isolation and chromosomal localization of CRKL, a human Crk-like gene. Oncogene 1993; 8: 2469–2474.

THOMAS J, WANG L, CLARK RE, PIRMOHAMED M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. Blood. 2004;104:3739-3745.

TURKINA AG, LOGACHEVA NP, STROMSKAYA TP. Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML). Adv Exp Med Biol 1999; 457: 477-488.

UPHOFF CC, DREXLER HG. Detection of mycoplasma contaminations. Methods Mol Biol. 2005; 290:13-23.

VALERA ET, SCRIDELI CA, QUEIROZ RG, *et al*. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia.). São Paulo Med J. 2004 Jul 1;122(4):166-71.

VAN DER POL MA, BROXTERMAN HJ, PATER JM, *et al*. Function of the ABC transporters, P-glycoprotein, multidrug resistance protein and breast cancer resistance protein, in minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Haematologica. 2003 Feb;88(2):134-47.

VAN DER SANDT IC, BLOM-ROOSEMALEN MC, DE BOER AG AND BREIMER DD. Specificity of doxorubicin versus rhodamine-123 in assessing P-glycoprotein functionality in the LLC-PK1, LLC-PK1:MDR1 and Caco-2 cell lines. Eur J Pharm Sci. 2000 Sep;11(3):207-14.

VASCONCELOS FC, CAVALCANTI GB JR, SILVA KL, *et al*. Contrasting features of MDR phen otype in leukemias by using two fluorochromes: implications for clinical practice. Leuk Res. 2007 Apr;31(4):445-54.

VASCONCELOS FC, SILVA KL, SOUZA PS *et al.* Variation of MDR proteins expression and activity levels according to clinical status and evolution of CML patients. Cytometry B Clin Cytom. 2011 May;80(3):158-66.

VOLK EL, FARLEY KM, WU Y, et al. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. Cancer Res. 2002 Sep 1;62(17):5035-40.

WANG L, 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. 2008 Feb;83(2):258-64.

WHITE DL, DANG P, ENGLER J, *et al*. Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. J Clin Oncol. 2010 Jun 1;28(16):2761-7.

WHITE DL, RADICH J, SOVERINI S, *et al*. Chronic phase chronic myeloid leukemia patients with low OCT-1 activity randomized to high-dose imatinib achieve better responses and have lower failure rates than those randomized to standard-dose imatinib. Haematologica. 2012 Jun;97(6):907-14.

WHITE DL, SAUNDERS V, GRIGG A, *et al*. Measurement of *in vivo* BCR-ABL kinase inhibition to monitor imatinib-induced target blockade and predict response in chronic myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2007a Oct 1;25(28):4445-51.

WHITE DL, SAUNDERS V, LYONS AB, *et al*. In vitro sensitivity to imatinib-induced inhibition of ABL kinase activity is predictive of molecular response in patients with de novo CML. Blood. 2005 Oct 1;106(7):2520-6.

WHITE DL, SAUNDERS VA, DANG P, *et al*. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. Blood. 2007b Dec 1;110(12):4064-72.

WILSON CS, DAVIDSON GS, MARTIN SB, *et al*. Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. Blood. 2006 Jul 15;108(2):685-96.

WUCHTER C, LEONID K, RUPPERT V, *et al*. Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia. Haematologica. 2000 Jul;85(7):711-21.

YONEZAWA A, MASUDA S, YOKOO S, *et al*. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). J Pharmacol Exp Ther. 2006 Nov;319(2):879-86.

ZHANG X AND REN R. BCR-ABL efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. Blood. 1998 Nov 15;92(10):3829-40.

ZHONG JS, MENG FY, XU D, *et al*. Correlation between imatinib trough concentration and efficacy in Chinese chronic myelocytic leukemia patients. Acta Haematol. 2012;127(4):221-7.

ZHOU S, SCHUETZ JD, BUNTING KD, *et al*. The ABC transporter Brcp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side population phenotype. Nat Med 2001;7:1028–34.

# ANEXO A

Original Article

# Variation of MDR Proteins Expression and Activity Levels According to Clinical Status and Evolution of CML Patients

**Flavia C. Vasconcelos,[1,2,3] Karina L. Silva,[1,2] Paloma Silva de Souza,[1,2] Luiz Felipe R. Silva,[1] Arthur Moellmann-Coelho,[3] Claudete E. Klumb,[1,3] and Raquel Ciuvalschi Maia[1,3*]**

[1]Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Brazil

[2]Programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Oncologia, INCA, RJ, Brazil

[3]Serviço de Hematologia, Hospital do Câncer I, INCA, Brazil

**The involvement of the multidrug resistance (MDR) mediated by ABC transporter proteins P-glycoprotein (Pgp) and multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) overexpressions in patients with chronic myeloid leukemia (CML) are not completely understood. Pgp and MRP1 expressions and activity were analyzed in samples from 158 patients with chronic myeloid leukemia (CML). Using flow cytometry, Pgp expression was more frequently observed in early chronic ($P = 0.00$) and in advanced ($P = 0.02$) CML phases when it was compared to MRP1 expression. Variation of MDR expression and activity were observed during the CML evolution in patients previously treated with interferon and imatinib. In the K562-Lucena cell line, Pgp positive, imatinib caused an enhancing in Pgp expression at protein and mRNA levels, whereas in the Pgp negative cell line, this drug was capable of decreasing *MDR1*/Pgp mRNA levels. Our result emphasizes the importance of understanding the different aspects of MDR status in patients with CML when they are under investigation in determining imatinib resistance.** © 2010 International Clinical Cytometry Society

**Key terms: chronic myeloid leukemia; P-glycoprotein; MRP1; rhodamine-123 efflux assay; flow cytometry**

How to cite this article: Vasconcelos FC, Silva KL, Souza PS, Silva LFR, Moellmann-Coelho A, Klumb CE, Maia RC. Variation of MDR proteins expression and activity levels according to clinical status and evolution of CML patients. Cytometry Part B 2011; 80B: 158–166.

Multidrug resistance (MDR) mediated by the drug efflux pump ABCB1/P-glycoprotein (Pgp), codified by *ABCB1*, has already been established as one of the most important drug resistance mechanisms in acute leukemia (1,2). Conversely, in chronic myeloid leukemia (CML), few studies have been conducted in samples from patients focusing on MDR proteins and its relation with clinical features or implications in treatment response. Some of these studies were conducted before imatinib era and/or were performed in a small group of patients with CML (3–5). On the other hand, MDR mediated by the Pgp has been a subject of many investigations conducted in CML cell lines. The reasons for such interest can be explained by the studies conducted previously (6–9) demonstrating evidences that Pgp plays a role for the development of imatinib resistance.

Multidrug resistance-associated protein-1, called ABCC1/MRP1, also a drug efflux pump, presents a less understood role in patients with CML, and only an expressive number of studies, comprising patients with

Grant sponsors: FINEP, FAPERJ-PensaRio, Swissbridge Foundation, INCT e Programa de Oncobiologia-UFRJ/Fundação do Câncer.

*Correspondence to: Raquel C. Maia, Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Hospital do Câncer I, Instituto Nacional de Câncer, Praça da Cruz Vermelha 23, 6° andar, Centro, Rio de Janeiro, RJ 20230-130, Brazil.

E-mail: rcmaia@inca.gov.br

Received 3 July 2010; Revision 29 September 2010; Accepted 25 October 2010

Published online 2 December 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.20580

© 2010 International Clinical Cytometry Society

CML, approached this subject (5). Nevertheless, to our knowledge, there is no report indicating that MRP1 contributes to imatinib resistance.

Due to the fact that Pgp and MRP1 proteins in CML samples from patients have not been systematically evaluated, our aim was to analyze a large number of CML samples to verify the existence or coexistence of MDR phenotype at specific CML phases or Sokal scores. Indeed, investigated whether MDR phenotype in patients with CML emerges spontaneously or may be acquired as a result of the previous CML treatment.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

From July 2001 to July 2008, a total of 245 peripheral blood samples taken from 158 patients with CML were included in this study, which was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institution Ethics Committee.

The diagnosis of CML was based on standard clinical data and confirmed by cytogenetics and molecular analysis. Distinct prognostic groups were categorized as low-, intermediate- and high-risk as defined by Sokal score system (10). Ninety and nine patients were analyzed at early chronic phase (at diagnosis) and therefore, had not been submitted to any chemotherapeutic drugs, except hydroxyurea. Other patients were selected due to the fact that their disease was in the late chronic phase (defined here as more than 1 year from time of diagnosis) and without cytogenetics response. The third group of patient was analyzed in the advanced phase (here considered as accelerated and blastic phases). These last two groups of patients have been previously treated with hydroxyurea, interferon-α, or imatinib, either in an isolated or combined fashion. Taking into account that in this study we achieved samples analyzed before the imatinib era, many patients were treated on an interferon-α-based regimen adopted according to institutional guidelines at the time of diagnosis. However, some patients had the therapy schema modified to imatinib after emerging interferon-α resistance or intolerance. In a group of patients it was possible to analyze Pgp and MRP1 expressions and activities twice during the course of their disease. The second CML samples were collected from patients in different periods of time and also at different CML phases. Therefore, after they had received different types of treatment.

### Leukemic Cells

Peripheral blood cells from CML patients were isolated through density gradient centrifugation by Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, USA). Collected cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and kept in culture medium consisting of RPMI-1640 medium and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS).

### Cell Lines

The human erythroblastoid CML K562 cell line and its vincristine-resistant derivative K562-Lucena were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS at 37°C in humidified atmosphere with 5% $CO_2$. K562-Lucena cell line was maintained in the presence of 60 nM vincristine. K562-Lucena cell line that displays Pgp/*ABCB1/MDR1* was developed by continuous exposure of K562 cells to increasing levels of vincristine (11). K562 cell line was used as negative control for Pgp and MRP1 protein expressions, while K562-Lucena was used as positive control for Pgp expression. As positive control for MRP1 expression we used GLC-4-ADR (small cell lung carcinoma).

### Determination of Pgp and MRP1 Expressions in Cell Lines and Cells from CML Patients

For analyzing of Pgp expression, $5 \times 10^5$ leukemic cells were incubated with PBS plus 1% bovine serum albumin (PBS/BSA) for 15 min. Direct staining of cells was done with 5 μL of PE-conjugated monoclonal antibody against Pgp (clone UIC2, Coulter, USA) for 30 min at room temperature. After that, cells were washed twice, fixed with PBS plus paraformaldheyde 1% and then analyzed by flow cytometry. To measure intracellular epitope of MRP1, $5 \times 10^5$ cells were permeabilized using FACS lysing solution (Becton Dickinson, USA) for 10 min. After centrifugation cells were washed in 0.5% Tween-20/PBS and incubated with PBS/BSA. Five microliters of FITC-conjugated anti-MRP1 (Becton Dickinson, USA) monoclonal antibody was incubated for 30 min at room temperature. After washing twice, cells were fixed with PBS plus paraformaldheyde 1% and then analyzed by flow cytometry. Results were expressed as the ratio of mean fluorescence intensity (RFI). The RFI was obtained dividing the mean fluorescence (MFI) of cells incubated with anti-Pgp or anti-MRP1 divided by MFI of cells without monoclonal antibodies (12,13).

### Determination of Pgp Activity in Cell Lines and Cells from Patients

Activity of Pgp was assayed in cells from patients according previous studies (12,13), which the same procedure was applied to cell lines. Cells ($5 \times 10^5$) were incubated with 200 ng/ml rhodamine-123 (Rho-123) plus 200 ng/ml cyclosporine A (CSA) for 45 min at room temperature. Cells were washed in ice cold PBS and incubated with CSA in dye-free medium for a further 45 min at room temperature. After the end of incubation, cells were immediately analyzed by flow cytometry. Cells without Rho-123 or CSA were used to evaluate cell autofluorescence. Results were expressed as the ratio of the MFI of cells incubated with Rho-123 and CSA, divided by the MFI of cells with Rho-123 alone after subtracting the MFI representing the autofluorescence.

### Sample Analysis

Cells were analyzed by flow cytometry using Summit v4.3 software (Dako, USA). Leukemic cells were gated based on forward and side scatter characteristics (FSC × SSC). Patients on chronic, blastic and accelerated phase were gated on granulocyte, blasts or both FSC × SSC regions, respectively, as shown in Figure 1. Ten

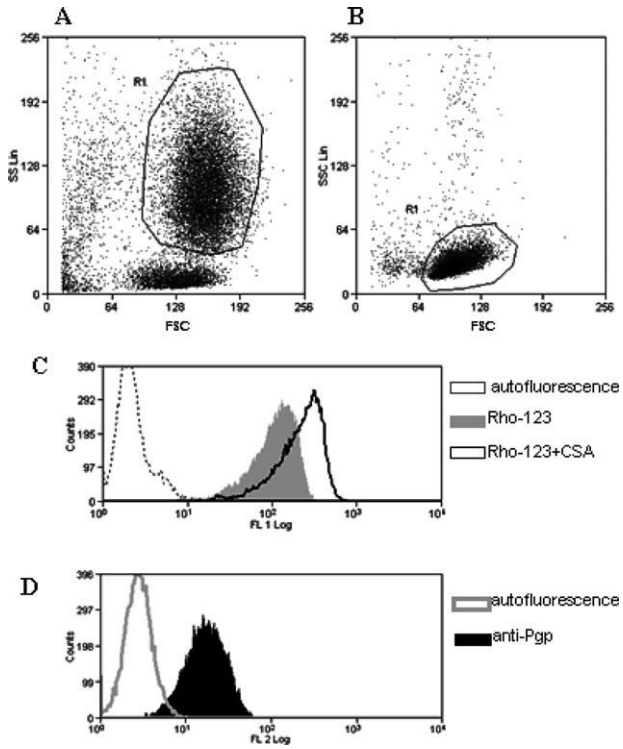



FIG. 1. Flow cytometry analysis of chronic myeloid leukemia cells. (**A**) Cells from chronic and (**B**) blastic phase were gated based on forward (FSC) and side scatter (SSC) patterns as described in Material and Methods section. (**C**) Illustrative case of positive pump efflux activity in cells incubated with rhodamine-123 (Rho-123) and cyclosporine A (CSA). The result was calculated as the ratio of the mean fluorescence intensity (RFI) of cells treated with Rho-123 and CSA, divided by the RFI of cells treated with Rho-123 alone after subtracting the MFI representing of autofluorescence. (**D**) Illustrative case of positive P-glycoprotein (Pgp) expression in cells incubated with monoclonal antibody anti-Pgp UIC2 and phycoerythrin (PE), a secondary antibody. The results were expressed as the ratio of the mean fluorescence intensity (RFI) of UIC2 and PE, divided by RFI of cells treated only with the secondary antibody. All analysis was performed on gated cells.

thousand cells were acquired on region of interest. The cutoff for positivity for both expression and activity (RFI $\geq$ 1.1) was based on previous studies by using a CML K562 cell line (Pgp negative) and its vincristine-resistant derivative K562-Lucena (Pgp positive) cell lines (12,13). In addition, an arbitrary choice of RFI (<2.0 = low expression or activity) and high (>2.0 = high expression or activity) was used in this study on attempting to discriminate possible associations with the highest or lowest RFI levels in specific CML phases.

### Analysis of Pgp Expression at Protein and mRNA Levels in K562 and K562-Lucena Cell Lines After Treatment with Imatinib

K562 and K562-Lucena cell lines ($2 \times 10^5$ cells/ well) were cultured in 2000 μl of RPMI medium with 10% FCS at humidified atmosphere containing 5% $CO_2$ for 24 h in the presence or absence of imatinib 1 μM and 5 μM. After this period, the levels of Pgp protein and MDR1 mRNA expressions were evaluated by flow cytometry and real-time qRT-PCR, respectively.

For MDR1 mRNA expression analysis, a total RNA from K562 and K562-Lucena cell lines, treated or not with imatinib, were isolated using the guanidinium thiocyanate method (Trizol Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA was treated with DNAse (Ambion, Austin, TX) to eliminate contaminating DNA. cDNA was synthesized with the Ready-To-Go T-Primed First-Strand Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ). MDR1 mRNA was amplified by real-time qRT-PCR using an assay on demand probes (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time monitoring of PCR amplification of cDNAs was carried out using Taqman Universal master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). 200 nM of probe and 100 nM of each both MDR1 and β-actin primers. Relative quantification (RQ) of target gene expression was performed by employing a comparative Ct method using arithmetic formulas as described in the Taqman user manual. β-actin (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used as a reference gene for all samples to normalize the Ct values for the target gene. All experiments were carried out in the StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### Statistical Analysis

The associations between Pgp and MRP1 as well as the association between each MDR protein expression and Rho-123 efflux, observed in individual sample of CML, were analyzed by Chi-square nonparametric test. Student's *t*-test was used to compare MDR1 mRNA expression of treated cells with imatinib in relation to control. The level of probability of 5% ($P < 0.05$) was accepted as significant. In the recommended cases, we used the nonparametric Kruskal–Wallis test.

## RESULTS

### Demographic and Clinical Characteristics of CML Patients

Patient characteristics are summarized in Table 1. A total of 245 samples from 158 patients with CML were analyzed. The median age was 43 years old (range: 1–81). There was a higher proportion of male in relation to female patients (93 : 65). The highest number of patients was categorized as low ($n = 63$) followed by intermediate ($n = 48$) and high ($n = 34$) under the Sokal score system. In 13 cases it was not possible to obtain the Sokal score information. Samples of each CML phase were analyzed, although accelerated and blastic phase were grouped as advanced phase, as described in Material and Methods. In this way, we obtained a more homogeneous proportion of samples in each category: early ($n = 102$), late ($n = 70$), and advanced ($n = 73$).

### Pgp and MRP1 Expressions in Patients with CML

Pgp expression was observed in 196 of 220 CML (88.3%) samples, independent of the CML phase. The levels of antigenic density evaluated through RFI ranged widely. Although the highest levels of Pgp expression were seen in the early and advanced phases, the median of RFI was found in a similar proportion in all CML phases. The median of RFI was 2.22 (range: 1.11–11.25), 2.13 (range:

Table I
*Patient Characteristics*

| Characteristics | Number (%) |
|---|---|
| All patients | 158 |
| All samples[a] | 245 |
| Age at diagnosis (year) | |
| ≤30 | 35 |
| 31–55 | 80 |
| ≥56 | 43 |
| Gender | |
| Male | 93 (58.9) |
| Female | 65 (41.1) |
| Sokal Score | |
| Low | 63 (39.9) |
| Intermediate | 48 (30.4) |
| High | 34 (21.5) |
| Not specified | 13 (82.2) |
| CML phase[a] | |
| Early chronic | 102 (41.6) |
| Late chronic | 70 (28.6) |
| Accelerated | 24 (9.8) |
| Blastic | 49 (20.0) |

CML, chronic myeloid leukemia.
[a]Some patients were studied in more than one CML phase.

1.11–6.12), and 2.10 (range: 1.19–10.73) in early chronic, late chronic, and advanced phases, respectively.

MRP1 expressions were found in 98 of 147 (66.7%) samples. The levels of antigenic density ranged from 1.1 to 13.30. In the same way, as observed in Pgp expression, the high levels of RFI in the positive samples were seen in the early chronic (median: 2.00; range: 1.10–8.10) and advanced (median: 1.50; range: 1.10–13.30) phases. A less variation in RFI levels was observed in the late chronic phase (median: 1.40; range: 1.10–3.30).

By using an arbitrary choice of RFI for designating low or high levels of positive Pgp or MRP1 expressions, we observed that the percentage of samples exhibiting the highest or the lowest Pgp ($P = 0.6276$) and MRP1 ($P = 0.3756$) expression levels was indistinctly present in all CML phases (Table 2).

### Pgp and MRP1 Expressions According to CML Phases

The number of positive cases for Pgp expression ($P = 0.11$) as well as the positive cases for MRP1 ($P = 0.77$) did not vary in a significant way according to different CML phases. However, a significant difference was found between the number of Pgp positive (85 of 95, or 89.4%) and the number of MRP1 positive (45 of 73, or 61.6%) samples in the early chronic phase ($P = 0.000$) (Fig. 2A). There was no difference between the number of positive samples for Pgp and MRP1 expressions in the late phase ($P = 0.210$), as shown in Figure 2B. We could observe again, as shown in Figure 2C, a significant difference in the advanced phase, where Pgp expression was detected in 56 of 64 (87.5%) samples, whereas MRP1 was positive in 21 of 34 (61.8%) samples ($P = 0.003$).

### MDR Activity in Samples from Patients with CML

MDR activity, analyzed by Rho-123 efflux assay, was positive in 157 of 230 (71.2 %) samples. The median values of RFI for the early chronic, late chronic, and advanced CML phases were very similar: 1.25, 1.38, 1.35, respectively, despite of the highest RFI levels observed in the advanced phase (range: 1.16–5.84). There was no significant difference ($P = 0.09$) between Rho-123 efflux positive samples analyzed at either different CML phases: early (64.2%), late (79.4%), and advanced (63.9%) CML phases (Fig. 2). However, as seen in Table 2, when an arbitrary cutoff was used for designating low or high RFI levels for positive activity, there was a significant difference among the CML phases. The more elevated number of samples exhibiting the highest Rho-123 efflux was observed in blastic phase ($P = 0.0007$).

### Associations Between MDR Phenotypes

The co-expression of Pgp and MRP1 was observed in 85 of 140 (60.7%) patients. The association between MDR functionality (Rho-123+) and Pgp expression (Pgp+) was found in 143 of 222 samples (64.4%). On the other hand, the association between Rho-123+ and

Table II
*MDR Levels (Negative, Low, or High) According to Different Chronic Myeloid Leukemia Phases*

| | Negative *N* (%) | Low *n* (%) | High *n* (%) | *P* value |
|---|---|---|---|---|
| Rhodamine-123 efflux | | | | |
| Early phase | 40 (39.2) | 58 (56.9) | 4 (3.9) | |
| Late phase | 13 (20.0) | 49 (75.4) | 3 (4.6) | 0.0007 |
| Accelerate phase | 8 (33.3) | 14 (58.3) | 2 (8.3) | |
| Blastic phase | 18 (37.5) | 20 (41.6) | 10 (20.8) | |
| P-glycoprotein expression | | | | |
| Early phase | 14 (14.9) | 38 (40.4) | 42 (44.7) | |
| Late phase | 6 (9.5) | 28 (44.4) | 29 (46.0) | 0.6276 |
| Accelerate phase | 3 (17.6) | 7 (41.2) | 7 (41.2) | |
| Blastic phase | 3 (6.7) | 16 (35.6) | 26 (57.8) | |
| MRP-1 expression | | | | |
| Early phase | 14 (18.7) | 51 (68.0) | 10 (13.3) | |
| Late phase | 10 (24.4) | 26 (63.4) | 5 (12.2) | 0.3756 |
| Accelerate phase | 5 (38.5) | 7 (53.8) | 1 (7.7) | |
| Blastic phase | 8 (34.8) | 10 (43.5) | 5 (21.7) | |

MDR, multidrug resistance; *N*, number of negative samples; *n*, number of positive samples; (%), frequency. $\chi^2$ test was performed. Low and high, arbitrary choice of ratio of median fluorescence intensity (RFI) for designating MDR expression or activity <2.0 and >2.0, respectively.

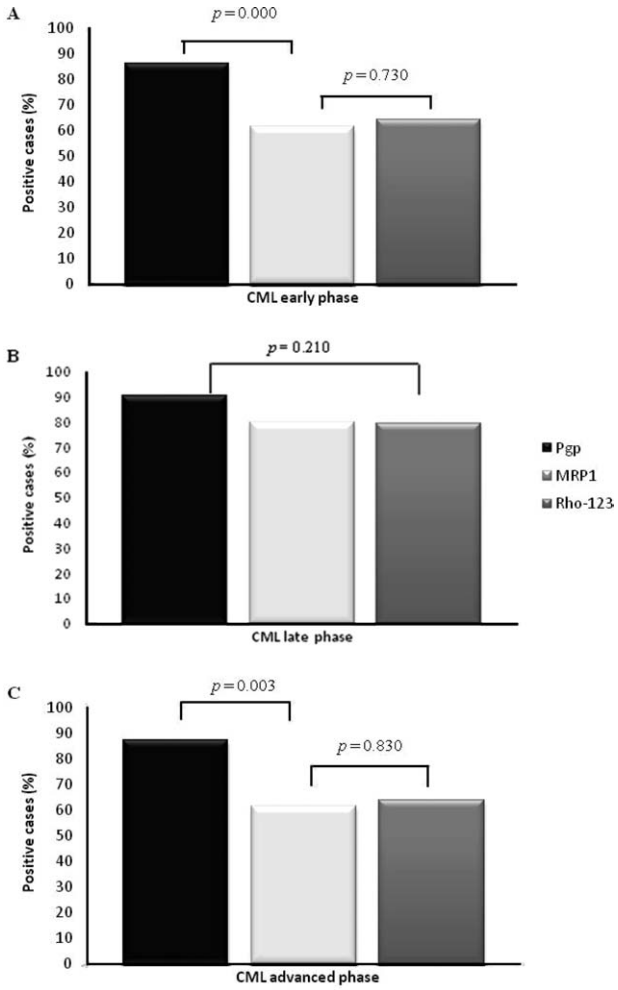



FIG. 2. Frequency of multidrug resistance (MDR) phenotype in different phases of patients with CML. P-glycoprotein (Pgp), multidrug resistance-associated protein (MRP1) expressions, and rhodamine-123 (Rho-123) efflux were analyzed concerning their positive associations in different CML phases. Chi-square nonparametric test was used to verify an association between the characteristics being analyzed.

MRP1+ was observed in 70 of 143 samples (48.9%), with this difference being statistically significant ($P$ = 0.003) (Fig. 3A).

The co-expression between Pgp and MRP1 associated with MDR activity (Pgp+ MRP1+ Rho-123+) was found in 60 of 140 samples (42.8 %). This phenotype showed a significant difference ($P$ = 0.000) when it was compared with the phenotype Pgp+Rho-123+, with a percentage of 64.4% (Fig. 3B). Otherwise, as seen in Figure 3C, when the phenotype Pgp+ MRP1+ Rho-123+ was compared with the phenotype MRP1+ Rho-123+ there was no statistical difference ($P$ = 0.303).

Pgp expression efflux-independent (Pgp+Rho-123$^-$) was found in 57 of 222 samples (25.7%). This percentage is fivefold higher than the inverse phenotype Pgp$^-$Rho-123+, which was observed in 4.9%, or 11 of 222 samples.

MRP1 expression efflux-independent (MRP1+ Rho-123$^-$) was observed in 24 of 143 samples (16.8%), and the opposed phenotype MRP1$^-$Rho-123+ was observed in a slightly higher percentage (32 of 143 samples or 22.8%).

### Pgp and MRP1 Expressions and MDR Activity According to Sokal Score

There was no difference among the low, intermediate, or high Sokal scores, when each one of the parameter Pgp expression ($P$ = 0.815), MRP1 expression ($P$ = 0.433), or Rho-123 efflux ($P$ = 0.703) was compared with these scores system. However, there was a very strong difference ($P$ = 0.001) between the number of

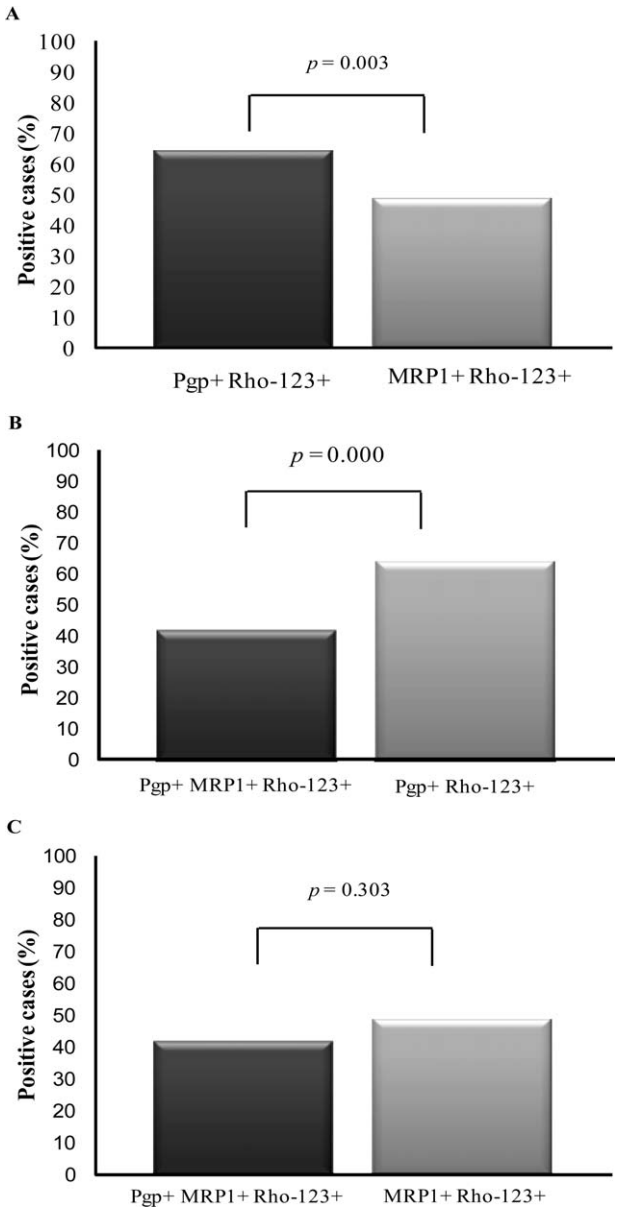



FIG. 3. Frequency of different characteristics of the MDR phenotype in patients with CML. The figure showns the capacity of the fluorochrome rhodamine-123 (Rho-123) to detect P-glycoprotein (Pgp) or MRP1 compared to its capacity to detect the of Pgp and MRP1 co-expression. Chi-square nonparametric test was used to verify an association between the characteristics being analyzed.

positive Pgp expression (38 of 43, or 88.37%) and the number of positive MRP1 expression (20 of 36, or 55.55%) samples in the low Sokal category (Fig. 4A). Also, in the same low Sokal group it was possible to observe a significant difference among the frequencies of MDR activity (57.7%) and Pgp expression (88.37%) ($P = 0.001$). Otherwise, no statistic difference was found in relation to Rho-123+ and MRP1+ samples ($P = 0.84$). Indeed, in the intermediate ($P = 0.167$) and high ($P = 0.47$) Sokal categories, there were no significant differences in relation to MDR protein expressions and the positivity to Rho-123 efflux assay (Fig. 4B and 4C).

### Pgp and MRP1 Variation According to CML Phases and Previous Treatment

The next step in our work was to investigate whether Pgp and or MRP1 expressions might arise or be attenuated spontaneously during the evolution of CML and/or due to the previous CML treatment.

Compared to the first assays, increase in the levels of Pgp expression (20 of 47; 42.5%) as well as a decrease (27 of 47; 57.4%) was found when the second assays were performed. This finding was mainly observed when the CML progressed from early to late chronic phase (Table 3). The RFI levels of Rho-123 efflux did not follow all these samples, but it was simultaneously increased (10 of 17 or 58.8%) or decreased (17 of 27 or 62.9%) of the samples.

An increase of the levels of MRP1 expression was observed in 4 of 23 patients (17.4%), whereas decrease of the levels of this protein was seen in 9 of 23 cases (39.1%) and unmodified MRP1 expression were observed in 10 of 23 patients, during the evolution of CML (data not shown).

### Modulation of Pgp Expression Induced by Imatinib in CML Cell Lines

Based on results obtained from patient cells, we further investigated whether it would be possible to reproduce in vitro, using CML cell lines, the same picture as observed in cells from patients. For this, the K562 Pgp negative and K562-Lucena Pgp positive CML cell lines were incubated with imatinib at different concentrations for 24 h. Analyzing the K562 cell line, no significant difference of Pgp protein expression was observed by flow cytometry (Fig. 5A). However, the K562-Lucena Pgp positive cell line enhanced the expression of Pgp protein, especially at a concentration of 5 μM (Fig. 5B). To evaluate whether this modulation occurs only at protein levels, we performed the qRT-PCR technique to analyze MDR1 mRNA expression after imatinib treatment. Interestingly, imatinib, at both concentrations, was able to decrease significantly the MDR1 mRNA expression in the K562 cell line, which does not express Pgp at protein level. Nevertheless, this drug significantly increased the expression of MDR1 mRNA in K562-Lucena cells, which overexpressed Pgp at the protein level (Figs. 5C and 5D).

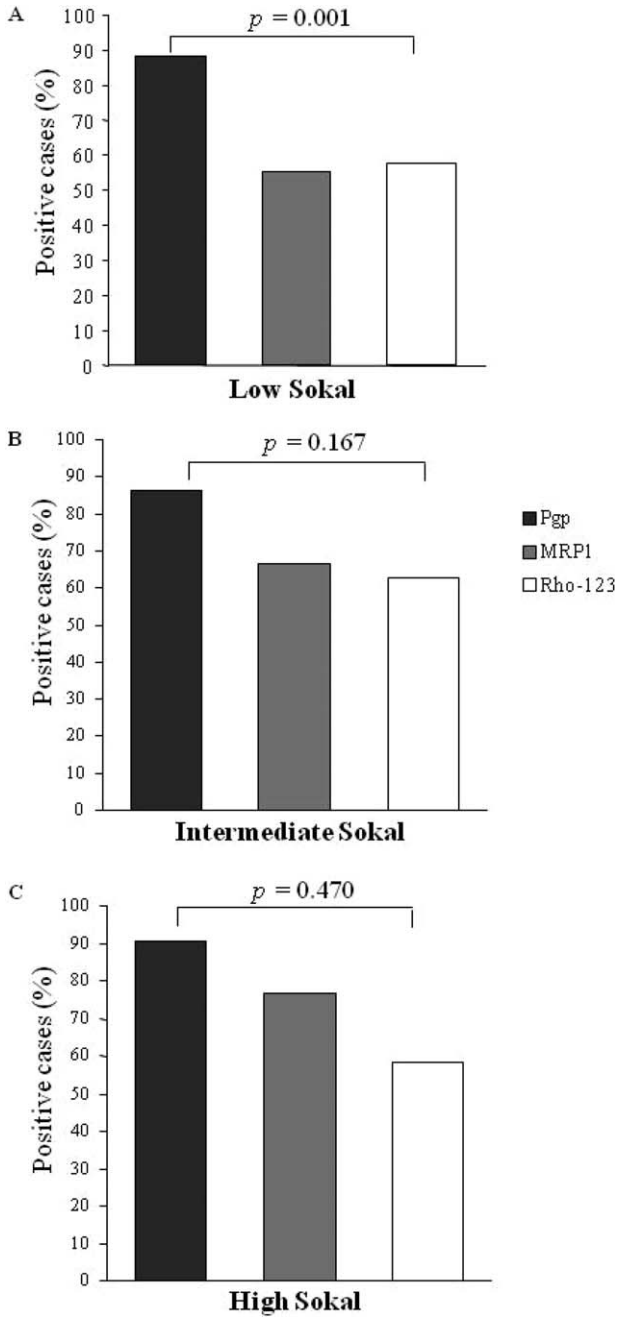



FIG. 4. Frequency of MDR proteins and activity according to Sokal score. P-glycoprotein (Pgp), MRP1 expressions, and rhodamine-123 (Rho-123) efflux were correlated with Sokal score system. Chi-square nonparametric test was used to verify an association between the characteristics being analyzed.

## DISCUSSION

The contribution of MDR transporter proteins in influencing the treatment response in patients with CML remains unclear. In this study, we detected a very high (~90%) as well as in advanced phases. List et al (14) observed Pgp expression in 63% of patients with CML in the blastic phase, in wherein Pgp expression and activity,

Table III
*P-Glycoprotein Expression According to Evolution of CML Patients*

| CML phase on first assay | CML phase on second assay | Increase of Pgp[a] *n/N* | Decrease of Pgp[a] *n/N* | Variation of the period of time (median)[b] |
|---|---|---|---|---|
| Early chronic | Late chronic | 8/19 | 11/19 | 5–60 (20) |
| Early chronic | Advanced | 4/8 | 4/8 | 1–72 (13) |
| Late | Late | 4/8 | 4/8 | 1–64 (16) |
| Late | Advanced | 4/12 | 8/12 | 3–28 (14) |

CML, chronic myeloid leukemia; *n*, number of samples exhibiting alteration of expression level; *N*, number of samples analyzed on different CML phases; Pgp, P-glycoprotein.
[a]In some situation an increase or decrease in Pgp levels arose in a short period of time, after the first assays, although the median of period of time was higher. Samples from patients in both situations received different treatment modalities including imatinib.
[b]Variation of the period of time from first to second assay evaluated in months.

both analyzed by flow cytometry, represented adverse prognostic factors.

Compared to our study, Giles et al. (3) found the lower levels of Pgp expression, namely 57% in the early chronic phase, 65% in the late chronic phase, 30% in the accelerated phase, and 62% in the blastic phase of CML. Turkina group (4) observed Pgp expression in nearly half of the 40 patients at the CML blastic phase. Here, as opposed to the Turkina study (4), MDR activity was not found in all, but in 64.42% of the Pgp positive samples. These findings demonstrate a discrepancy between the frequency of the Pgp expression and frequency of the Pgp activity in CML. Although Pgp was overexpressed in a large number of our samples, the efflux pump role of this molecule was inhibited or altered. The discordant results found between Pgp activity and Pgp expression were also observed by others (5,15). Moreover, in a previous report, our group showed discordances between Pgp expression

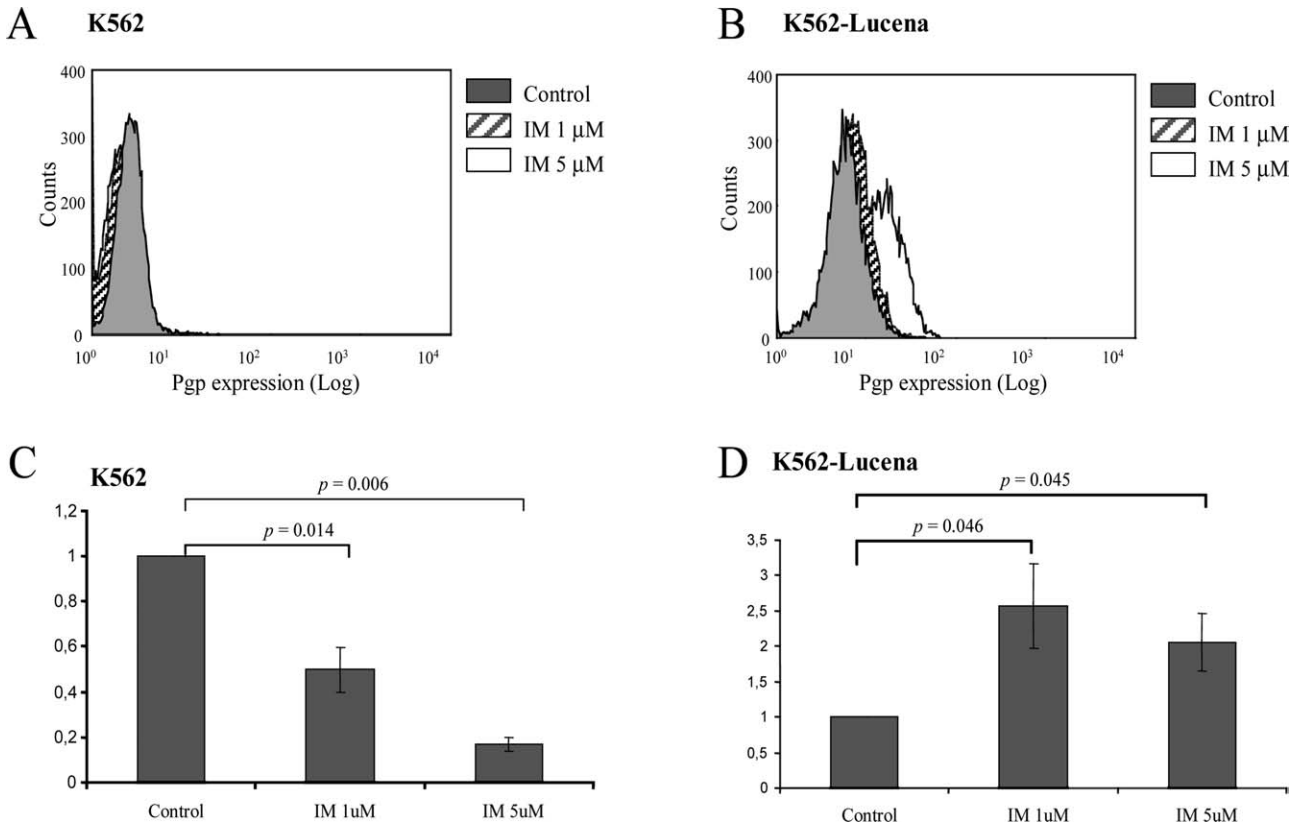



Fig. 5. Modulation of Pgp expression in K562 and K562-Lucena cell lines after treatment with imatinib. Cell lines were treated with imatinib at concentrations of 1 μM and 5 μM for 24 h. Histograms show the expression of P-glycoprotein (Pgp) protein in K562 (**A**) and K562-Lucena (**B**) cell lines. Cells were incubated with anti-Pgp monoclonal antibody and the Pgp expression was evaluated by flow cytometry. Figures are representative of three independent experiments. Levels of *MDR1* mRNA expression in K562 (**C**) and K562-Lucena (**D**) cell lines treated or not with imatinib, analyzed by qRT-PCR. Columns represent the mean ± standard deviation of three independent experiments. The Student's *t*-test was used to compare the mRNA expression of treated cells in relation to control (untreated cells).

and Pgp activity in acute and in chronic leukemias, being more intense in myeloid as opposed to lymphoid cells (12). Diverse reasons can explain the discordance between Pgp expression and activity, such as the type of monoclonal antibody, fluorochrome or modulatory agent used to detect MDR phenotype (16) and the Pgp compartmentalization (17).

As opposed to Pgp, very little is currently known about *ABCC1/*MRP1 expression in cell lines and in cells from patients with CML. In our work, conversely to Pgp expression, no discordance between MRP1 expression and Rho-123 efflux was observed when the same sample was analyzed for both assays in the early, late, or advanced phases of CML. However, the MRP1 activity (MRP1+ Rho-123+ phenotype) was less detected than the Pgp+Rho-123+ phenotype ($P = 0.003$). This finding shows that MRP1 functional is less present in CML cells. Another possibility would be that the Rho-123 assay is not able to detect MRP1 activity in the same way that it detects Pgp. Low frequency of MRP1 expression was also found in CML cells (5). Indeed, in a recent study, ABCC1/MRP1 levels did not correlate with treatment outcome in patients with CML (18). To our knowledge, the clinical role of MRP1 overexpression in CML cells remains to be clarified, although it was already shown that imatinib is a substrate for MRP1 in in-vitro studies (19).

It had been shown that Sokal prognostic score is predictive of molecular response in patients with CML treated with imatinib (20,21). Thus, we performed an analysis comparing either Pgp or MRP1 expressions or Rho-123 efflux assay, in relation to Sokal categories. There was no difference among the MDR assays according to the different Sokal scores. However, Pgp, as opposed to MRP1 expression, was more frequent in low Sokal as compared to intermediate or high Sokal scores. In addition, only in the low Sokal group there was a statistic difference between the samples for the Pgp+ Rho-123+ phenotype as opposed to MRP1+Rho-123+ ($P = 0.003$). The reasons for these findings are not completely clear. However, it is important to emphasize that cells exhibiting Pgp expression can be more frequently functional, as opposed to MRP1 expression, due to the fact that CML cells originated from $CD34^+$ $CD38^-$ hematopoietic stem cells which ABCB1/Pgp, in addition ABCG2/BCRP, is thought to contribute in large part to the MDR activity observed in these cells (22).

A possible explanation of the fact that Pgp+ phenotype had been more frequently found in early, instead of late chronic CML stages suggests that this molecule, which is frequently overexpressed in CML cells at diagnosis, might undergo downregulation during the course of the disease. Therefore, we analyzed a group of 47 CML samples, in two different time-points of the CML. A decrease of Pgp expression levels was observed in 57.4% cases. These findings were accompanied by a decrease in Rho-123 efflux levels in 62.9% cases. The reason for the decrease of MDR levels in patients with CML is not completely known. However, in our study, the sensitive K562 cell line exhibited *MDR1* mRNA level significantly decreased when cells were incubated with imatinib 1 μM and 5 μM. On the other hand, 20 of 47 patients exhibited an increase of Pgp expression during CML evolution with approximately half of these exhibiting an increase in Rho-123 efflux levels. Previous sequential analysis comprising 14 blast phase CML patients, who had received chemotherapeutic drugs, revealed that 7 of 9 Pgp negative samples remained negative but two became Pgp positive in a second analysis (4). Recently, it was demonstrated that there were changes in Pgp expression in patients with accelerated CML phase during imatinib treatment. Seven Pgp negative patients became Pgp positive after imatinib therapy for 6–12 months, and three remained Pgp positive after the same therapy for 12–16 months (23).

Interestingly, our results gives support to better understand the alterations observed in MDR status of patients with CML showing in cell lines and cells from patients with CML that imatinib is able to greatly, and in short time, increase MDR1/Pgp levels in cells that already have innate MDR expression. Conversely, this agent is able to decrease MDR1 mRNA levels in cells that do not present Pgp expression.

It is well known that a wide type of drugs is able to induce Pgp expression. Therefore, it is worth noting that the non-anticancer substances, which are used in parallel to imatinib, as therapy for a number of clinical disorders, can stimulate Pgp expression or/and activity in in-vitro studies (24–27). Besides stimulating Pgp expression, these drugs can also inhibit Pgp activity by blocking of the ATP hydrolysis process or by competition for drug-binding sites (27). Moreover, a number of different herbal constituents and food may also collaborate for potential Pgp modifications and, thereby, may have clinical relevant consequences (28). This was the case of our study in which the results of MDR status were not analyzed with respect to all possible variables that might influence MDR alterations.

In conclusion, our study indicates that imatinib does not always inhibit Pgp, but might also increase its expression herein can collaborate to clinical imatinib resistance. We emphasized the importance of understanding the alterations of these proteins in the evolution of the CML patients in order to prevent an imatinib acquired resistance mediated by the MDR phenomenon.

Conflict of interest statement**:** The authors declare no conflict of interest related to the publication of this manuscript.

## LITERATURE CITED

1. McLornan DP, McMullin MF, Johnston P, Longley DB. Molecular mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukaemia. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2007;3:363–377.
2. Brozek J, Bryl E, Płoszyńska A, Balcerska A, Witkowski JM. P-glycoprotein activity predicts outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr Hematol Oncol 2009;31:493–499.
3. Giles FJ, Kantarjian HM, Cortes J, Thomas DA, Talpaz M, Manshouri T, Albitar M. Multidrug resistance protein expression in chronic myeloid leukemia. Cancer 1999;86:805–813.
4. Turkina AG, Logacheva N, Stromskaya T, Zabotina T, Kuznetzov SV, Sachibzadaeva KK, Tagiev A, Juravlev VS, Khoroshko ND, Baryshnikov AY, et al. Studies of some mechanisms of drug resistance in

chronic myeloid leukemia (CML). Adv Exp Med Biol 1999;457: 477–488.
5. Carter A, Dann EJ, Katz T, Shechter Y, Oliven A, Regev R, Eytan E, Rowe JM, Eytan GD. Cells from chronic myelogenous leukaemia patients at presentation exhibit resistance not mediated by either MDR1 or MRP1. Br J Haematol 2001;114:581–590.
6. Hegedus T, Orfi L, Seprodi A, Váradi A, Sarkadi B, Kéri G. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins. MDR1 and MRP1. Biochim Biophys Acta 2002; 1587:318–325.
7. Mahon F-X, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. Blood 2003;101:2368–2373.
8. Widmer N, Colombo S, Buclin T, Decosterd LA. Functional consequence of MDR1 expression on imatinib intracellular concentrations. Blood 2003;102:1142.
9. Hirayama C, Watanabe H, Nakashima R, Nanbu T, Hamada A, Kuniyasu A, Nakayama H, Kawaguchi T, Saito H. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. Pharm Res 2008;25:827–835.
10. Sokal JE, Cox EB, Baccarini M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, Tso CY, Braum TJ, Clarkson BD, Cervantes F, et al.; Italian Cooperative CML Study Group. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. Blood 1984;63:789–799.
11. Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, de-Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC, Capella MA. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. An Acad Bras Cienc 2001;73:57–69.
12. Vasconcelos FC, Cavalcanti GB Jr, Silva KL, de Meis E, Kwee JK, Rumjanek VM, Maia RC. Contrasting features of MDR phenotype in leukemias by using two fluorochromes: implications for clinical practice. Leuk Res 2007;31:445–454.
13. Maia RC, Vasconcelos FC, Bacelar RS, Salustiano EJ, Silva LFR, Pereira DL, Moellman-Coelho A, Netto CD, Silva AJ, Rumjanek VM, et al. Pterocarpanquinone LQB-118: A novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells with multifactorial drug resistance mechanisms. Invest New Drugs 2010 May 25. [Epub ahead of print]
14. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Slovak M, Douer D, Dakhil SR, Appelbaum FR. Cyclosporin inhibition of P-glycoprotein in chronic myeloid leukemia phase. Blood 2002;100:1910–1912.
15. Legrand O, Zompi S, Perrot JY, Faussat AM, Benderra Z, Chaoui D, Marie JP. P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein-1 activity in 132 acute myeloid leukemias according to FAB subtypes and cytogenetics risk groups. Haematologica 2004;8:34–41.
16. Suvannasankha A, Minderman H, O'Loughlin KL, Nakanishi T, Greco WR, Ross DD, Baer MR. Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in acute myeloid leukemia: discordance between expression and function. Leukemia 2004;18:1252–1257.
17. Ferrao P, Sincock P, Cole S, Ashman L. Intracellular P-gp contributes to functional drug efflux and resistance in acute myeloid leukemia. Leuk Res 2001;25:395–405.
18. Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. Clin Pharmacol Ther 2008;83:258–264.
19. Czyzewski K, Styczynski J. Imatinib is a substrate for various multidrug resistance proteins. Neoplasma 2009;56:202–207.
20. Rosti G, Trabacchi E, Bassi S, Bonifazi F, de Vivo A, Martinelli G, Alberti D, Fincato G, Saglio G, Baccarani M; Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Risk and early cytogenetic response to imatinib and interferon in chronic myeloid leukemia. Haematologica 2003;88:256–259.
21. Castagnetti F, Palandri F, Amabile M, Testoni N, Luatti S, Soverini S, Iacobucci I, Breccia M, Rege Cambrin G, Stagno F, et al.; GIMEMA CML Working Party. Results of high-dose imatinib mesylate in intermediate Sokal risk chronic myeloid leukemia patients in early chronic phase: A phase 2 trial of the GINEMA CML Working Party. Blood 2009;113:3428–3434.
22. Raaijmakers MHGP. AT. P-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutical targets in acute and chronic myeloid leukemia. Leukemia 2007;21:2094–2102.
23. Stromskaya TP, Rybalkina EY, Kruglov SS, Zabotina TN, Mechetner EB, Turkina AG, Stavrovskaya AA. Role of P-glycoprotein in evolution of populations of chronic myeloid leukemia cells treated with imatinib. Biochemistry (Mosc) 2008;73:29–37.
24. Schuetz EG, Beck WT, Shuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. Mol Pharmacol 1996;49:311–318.
25. Geik A, Eichelbaum M, Burk O. Nuclear recptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. J Biol Chem 2001;276:14581–14587.
26. Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. Nat Med 2001;7:584–590.
27. DuBuske LM. The role of P-glycoprotein and organic anion-transporting poplypeptides in drug interactions. Drug Saf 2005;28:789–801.
28. Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, Schellens JHM. Concise Review: Clinical relevance of drug-drug and herb-drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1. P-glycoprotein). The Oncologist 2007;12:927–941.

# ANEXO B

# ANEXO B

**Trabalhos científicos, relacionados ao tema da tese, realizados como colaboradora e publicados durante o desenvolvimento deste estudo.**

DE SOUZA REIS FR, DE FARIA FC, CASTRO CP, DE SOUZA PS, VASCONCELOS FD, BELLO RD, DA SILVA AJ, COSTA PR, MAIA RC. The Therapeutical Potential of A Novel Pterocarpanquinone LQB-118 to Target Inhibitor Of Apoptosis Proteins In Acute Myeloid Leukemia Cells. Anticancer Agents Med Chem. 2012 Jun 18. [Epub ahead of print].

SCHEINER MA, DA CUNHA VASCONCELOS F, DA MATTA RR, DAL BELLO FIGUEIRA R JR, MAIA RC. ABCB1 genetic variation and P-glycoprotein expression/activity in a cohort of Brazilian acute myeloid leukemia patients. J Cancer Res Clin Oncol. 2012 Jun;138(6):959-69.

NESTAL DE MORAES G, DE SOUZA OS, COSTAS FCF, VASCONCELOS FC, REIS FR, MAIA RC. The Interface between BCR-ABL-Dependent and -Independent Resistance Signaling Pathways in Chronic Myeloid Leukemia. Differentiation and Cell Survival of Myeloid Leukemia Cells. Volume 2012 (2012), Article ID 671702, 19 pages.

DE SOUZA PS, DA CUNHA VASCONCELOS F, SILVA LF, MAIA RC. Cyclosporine A enables vincristine-induced apoptosis during reversal of multidrug resistance phenotype in chronic myeloid leukemia cells. Tumour Biol. 2012 Aug;33(4):943-56.

SOUZA PS, VASCONCELOS FC, DE SOUZA REIS FR, NESTAL DE MORAES G, MAIA RC. P-glycoprotein and survivin simultaneously regulate vincristine-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. Int J Oncol. 2011 Oct;39(4):925-33.

REIS FR, VASCONCELOS FC, PEREIRA DL, MOELLMAN-COELHO A, SILVA KL, MAIA RC. Survivin and P-glycoprotein are associated and highly expressed in late phase chronic myeloid leukemia. Oncol Rep. 2011 Aug;26(2):471-8.

NESTAL DE MORAES G, SILVA KL, VASCONCELOS FC AND MAIA RC. Survivin overexpression correlates with an apoptosis-resistant phenotype in chronic myeloid leukemia cells. Oncol Rep. 2011 Jun;25(6):1613-9.

MAIA RC, VASCONCELOS FC, DE SÁ BACELAR T, SALUSTIANO EJ, DA SILVA LF, PEREIRA DL, MOELLMAN-COELHO A, NETTO CD, DA SILVA AJ, RUMJANEK VM, COSTA PR. LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. Invest New Drugs. 2011 Dec;29(6):1143-55.