



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM ANÁLISES CLÍNICAS

**EXPRESSÃO DOS GENES *ABCA7* E *ABCC12* EM CÉLULAS DO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA.**

ADRIANE MARIA BEZERRA DA SILVA

Belém-Pará
2015

ADRIANE MARIA BEZERRA DA SILVA

**EXPRESSÃO DOS GENES *ABCA7* E *ABCC12* EM CÉLULAS DO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA.**

Artigo apresentado ao Programa de Pós-Graduação
em Análises Clínicas Profissional da Universidade
Federal do Pará para obtenção do grau de Mestre em
Análises Clínicas Profissional.

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues de
Lemos

Co-orientadora: Prof. Dr. Rita de Cássia Mousinho
Ribeiro

Belém-Pará
2015

ADRIANE MARIA BEZERRA DA SILVA

**EXPRESSÃO DOS GENES *ABCA7* E *ABCC12* EM CÉLULAS DO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA.**

Artigo apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas Profissional, conforme o Art.63 do Regimento interno, o Trabalho de Conclusão de Mestrado, o qual pode ser apresentado no formato tradicional de dissertação ou outros formatos, conforme o Artigo Terceiro da Portaria Normativa No.7 de 22 de junho de 2009 do Ministério da Educação, que dispõe sobre o Mestrado Profissional.

Formato escolhido: Artigo

Corpo Editorial

Revista: International Journal of Laboratory Hematology

Editor: Szu-Hee Lee

Fator de Impacto: 1.87

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: 50/68 (Hematology)

Online ISSN: 1751-553X

Orientador: Prof^o. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Co-orientadora: Prof. Dr. Rita de Cássia Mousinho Ribeiro
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Banca Examinadora: Prof^o. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Prof^a. Dra. Caroline Aquino Moreira Nunes
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Prof^o. Dr. André Salim Khayat
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Prof^o. Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA
(Suplente)

Belém, maio de 2015

“ Eu vos louvarei de todo o coração, Senhor, porque
ouvistes as minhas palavras. Na presença dos anjos
eu vos cantarei” Salmo 137,1

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e às pessoas mais importantes da minha vida, meus amados e queridos pais, Cesar e Olga. À eles que sempre me apoiaram, me incentivaram, me ajudaram e que sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades, vitórias e conquistas que Ele me proporciona a cada dia, em especial esta que estou concluindo agora. Recomeço um novo caminho sob uma perspectiva mais madura em relação ao meu profissionalismo.

Agradeço a meus pais, Cesar e Olga, todo carinho, incentivo, dedicação, preocupação, cuidado, etc, que tem por mim. Sou muito grata a vocês por tudo. Tenho a honra de ser a filha de vocês.

À minha querida irmã Andresa Maria, por sempre está ao meu lado, pelas brincadeiras, pela convivência, por tocar violão quando eu estava estudando (por mais que achasse que me atrapalhava, no fundo gosto de te escutar tocar maninha).

Aos meus familiares que sempre acreditaram em mim, em especial minha avó Maria José, minha tia e madrinha Zuleide, e meu tio Walter.

Agradeço ao Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos pela orientação, que de certa forma acabou sendo ao acaso. Obrigada por me acolher em seu grupo de pesquisa, pela oportunidade, por tentar me mostrar que podemos fazer pesquisa de maneira tranquila e calma, e escrever somente o essencial.

À Prof. Dr. Rita Mousinho pela co-orientação, pela correção de meu trabalho escrito, pelo apoio e incentivo desde a graduação, obrigada.

Aos amigos e colegas de Tecnologia em Gestão Pública do IFPA, que me ajudaram nos trabalhos paralelos as aulas de mestrado, e sempre diziam: “vamos ser verdadeiros Gestores Públicos, vamos fazer a diferença no serviço público, afinal estamos estudando para isso”. Não desistir jamais, é isso aí gente.

Aos amigos e colegas de mestrado, em especial a Márcia, João de Deus e Ruth, que compartilharam os seus conhecimentos e debateram ideias, além do tempo que passamos estudando juntos.

Amigos são essenciais para o crescimento de qualquer indivíduo por isso agradeço a vocês pela convivência e discussões de trabalho. À vocês Darlen, Edinelson, Camila Pâmela, Ana Paula, Paulinha, obrigada.

Obrigada ao Ministério Universidade Renovadas por me mostrar de uma forma diferente como fé e razão sempre andam juntas. Jovens de Deus que dizem sim as obras de Deus sem medir esforços (“Confiai-Lhe todas as vossas preocupações, porque Ele tem cuidado de vós” I Pedro 5,7). Em especial aos amigos Ritielly, Shirley, Sabino e Cássia.

Àos irmãos em Cristo da minha Paróquia, Santa Maria de Belém, que estão junto comigo na caminhada de fé, em especial aos da Pastoral da Catequese e o Ministério de Música Louvor e Vida. Sem oração não somos nada.

E claro, o meu agradecimento aos meus amigos da Fundação Hemopa. Alguns eu trago desde minha graduação quando era orientanda do Prof. Arno Hamel, como a Conceição Leão, Charles, Edilene, Rúbia. Outros que conheci nestes últimos anos, como Adriana, Patrícia, Ruth, Waldeci, e Thais, e ao grupo do Coral da Fundação. À equipe da GEBIM: Carlos Eduardo, Andreza, Jairo, Iago, Cibele, Camila e Thayanne que contribuíram bastante no decorrer do meu trabalho, sou grata a vocês.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós” (Charles Chaplin). Espero ter deixado o meu melhor por onde passei.

Obrigada a todos! Que Deus nos abençoe.

EXPRESSÃO DOS GENES *ABCA7* E *ABCC12* EM CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA.

ADRIANE MARIA BEZERRA DA SILVA

A.M.B.SILVA*^{1,2}

*Autor Correspondente

e-mail: adrianedemaria@gmail.com

ANDREZA LOPES MAIA*^{1,2}

A.L.MAIA

e-mail: andreza_maia@ymail.com

IAGO BARROSO RAMOS^{1,2}

I.B.RAMOS

e-mail: iago.b.ramos@gmail.com

CAMILA DA SILVA SARMENTO¹

C.S.SARMENTO

e-mail: camila.s.sarmento@gmail.com

RUTH MERIEN DE FREITAS VIEIRA¹

R.M.F. VIEIRA

e-mail: rmfv.vieira@gmail.com

JAIRO ALGUSTO AMERICO DE CASTRO²

J.A.A.CASTRO

Email: jairoaacaastro@gmail.com

CAROLINE AQUINO MOREIRA-NUNES^{1,3}

C.A.MOREIRA-NUNES

e-mail: carolfam@gmail.com

JOSÉ ALEXANDRE RODRIGUES DE LEMOS^{1,2}

J.A.R.LEMOS

e-mail: jose.alexandre@icould.br

¹UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Rua Augusto Corrêa, 01 - Guamá. CEP 66075-110.

Caixa postal 479.

Belém - Pará - Brasil

²FUNDAÇÃO CENTRO DE HEMOTERAPIA E HEMATOLOGIA DO PARÁ

Laboratório de biologia celular e molecular

Rua dos Caripunas, 2109 - Batista Campos CEP 66033-000

Belém - Pará - Brasil

³HOSPITAL OPHIR LOYOLA

Av. Magalhães Barata, 992 - São Brás CEP 66060-281

Belém - Pará - Brasil

EXPRESSÃO DOS GENES *ABCA7* E *ABCC12* EM CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA.

A.M.B. SILVA^{1,2}, A.L.MAIA^{1,2}, I.B.RAMOS^{1,2}, C.S.SARMENTO¹, R.M.F. VIEIRA¹, J.A.A.CASTRO², C.A.MOREIRA-NUNES^{1,3}, J.A.R.LEMOS^{1,2}

¹UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

²FUNDAÇÃO CENTRO DE HEMOTERAPIA E HEMATOLOGIA DO PARÁ

³HOSPITAL OPHIR LOYOLA

Autor Correspondente: Adriane Maria Bezerra da Silva, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará, Rua dos Caripunas, 2109 - Batista Campos, CEP 66033-000, Belém - Pará - Brasil

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) tem o Mesilato de Imatinib (MI) como seu tratamento em primeira linha. Os genes *ABCA7* e *ABCC12*, pertencentes à família de transportadores ABC- *ATP-binding cassette family* (ABC Family), apresentaram expressão diferenciada em estudo de sequenciamento de transcriptoma em pacientes com LMC. Dessa forma, objetivou-se quantificar a expressão dos genes *ABCA7* e *ABCC12* em células do sangue periférico de pacientes portadores de LMC e validá-los como genes envolvidos na resposta ao Mesilato de Imatinib.

MÉTODOS: Análise da expressão gênica teve como base os valores do *cycle threshold* (CT) através de PCR em Tempo Real, onde foi realizado a comparação da expressão entre pacientes e controles, levando em consideração a definição de resposta dos pacientes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa BIOSTAT 5.0, e índice de EUTOS foi calculado conforme o cálculo online deste escore.

RESULTADOS: As médias da expressão gênica no grupo controle e nos pacientes de acordo com a eficácia da terapia apresentou a expressão do *ABCA7* diminuída no grupo de pacientes em diagnóstico (1,1344), e a expressão do *ABCC12* aumentada (5,1655). Na comparação em relação a resposta, observou-se valores significativos nos seguintes casos: controle *ABCA7* e pacientes em diagnóstico ($p < 0,001$) e pacientes com resposta alerta ($p = 0,0165$). O teste de Regressão Logística simples indicou que não há dependência entre o escore diagnóstico e a expressão gênica de *ABCA7*.

CONCLUSÃO: Possivelmente o gene *ABCA7* está associado à adesão terapêutica com MI; e o gene *ABCC12* não possui resposta clara de sua relação com a LMC.

Palavras-chaves: Leucemia Mielóide crônica, Mesilato de Imatinib, adesão terapêutica, Gene *ABCA7* e Gene *ABCC12*.

INTRODUÇÃO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal que pode ser caracterizada em três fases: crônica, acelerada e blástica. Sua principal característica é a presença do cromossomo Philadelphia (Ph), proveniente da translocação recíproca t(9;22)(q34;q11) que leva ao surgimento de um gene quimérico BCR-ABL cuja oncoproteína possui uma tirosino cinase desregulada (1). Seu diagnóstico depende da presença do cromossomo Ph e/ou da presença do rearranjo BCR-ABL (2). Possui incidência de 1 a 2 casos por 100.000 pessoas/ano com idade mediana de diagnóstico em torno de 65 anos(3).

O Mesilato de Imatinib (MI), medicamento que compõe o tratamento da LMC em primeira linha (4) é monitorado como forma de avaliação ao tipo de resposta e detecção de eventuais resistências ao tratamento. O MI inibe a atividade da quinase Abl por competição com o ATP, evitando a ligação e inibindo a fosforilação da tirosina de substratos de proteínas necessários para a função de transformação de Bcr-Abl (5), podendo levar a eliminação do clone leucêmico (1).

A terapêutica na LMC visa obter a resposta completa, podendo ser avaliada através das respostas progressivas: hematológica, citogenética e molecular, que correspondem à diminuição gradual do número de células leucêmicas no doente (6). A Escala Internacional (IS) avalia melhor a resposta molecular como a razão dos transcritos *BCR-ABL* para transcritos *ABL*, ou outro controle reconhecido internacionalmente, e é expressa como *BCR-ABL* numa escala logarítmica, em que 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% e 0,001% corresponde a uma diminuição de 1, 2, 3, 4, 4,5, e 5 logs, respectivamente; onde o termo resposta molecular completa deve ser substituída por leucemia molecularmente indetectável, com a especificação do número de cópias do gene transcrito do controle (7). A introdução de técnicas para a identificação e medição dos transcritos BCR-ABL tem evoluído ao longo dos

anos e permitiu avaliação mais precisa de resposta a terapias específicas para LMC, introduzindo o conceito de redução \log_{10} a partir de baseline padronizado para pacientes não tratados(8).

De acordo com as recomendações do comitê *European LeukemiaNet* (ELN) para o tratamento de pacientes na fase crônica, três escores prognósticos podem ser utilizados: Sokal (Sokal et al., 1984), Euro (Hasford et al., 1998) e EUTOS (Hasford et a., 2011), que são baseados em dados clínicos e hematológicos. Sendo que não há nenhuma evidência de que um escore seja superior ao outro (7). O escore EUTOS é um instrumento válido para a predição dos efeitos terapêuticos, em especial de inibores de tirosina cinase (ITC) de Imatinib (9), é o escore mais atual e mais simples de ser calculado. Ele prevê resposta citogenética completa 18 meses após o início da terapia, importante preditor para o curso da doença. Pacientes que não apresentam esta resposta neste período são menos propensos a alcançar uma resposta ótima e possuem um risco elevado de progressão da doença para fase blástica e acelerada (10).

Segundo Baccarani e colaboradores (2013) (7) o fator prognóstico mais importante é a resposta ao tratamento com ITCs, que pode ser classificada em Ótima, Alerta e Falha e verificadas em períodos de três meses, seis meses, doze meses e qualquer tempo. A avaliação das respostas permitem monitorar a doença e assim permitir mudanças oportunas na terapia caso necessário.

As três vias metabólicas: glicólise, lipogênese e ciclo do ácido tricarboxílico são responsáveis por manter equilibrada a homeostase energética da célula normal. Genes envolvidos nestas vias desempenham um papel importante na tumorigênese, podendo ser um potencial marcador diagnóstico e alvos terapêuticos, onde se encontram mais elevados na fase mais precoce de câncer (11). Yvan-Charvet e colaboradores (2010) (12) sugerem que o HDL suprime a proliferação de células progenitoras mielóides por promover o efluxo de colesterol.

As células tumorais dependentes de metabolismo lipídico desregulado propõe que as proteínas envolvidas nesse processo possam ser alvos quimioterápicos para o tratamento do câncer(13).

As proteínas pertencentes a família de Transportadores ABC - *ATP-binding cassette family* (ABC Family) são amplamente reconhecidas pela sua importância no efluxo de drogas nas células (14) e podem ter um papel terapêutico importante para superar a resistência a medicamentos (15), já que a resistência a múltiplas drogas (MDR) em células neoplásicas é também causada pela superexpressão dos transportadores ABC (16). Os genes *ABCA7* e *ABCC12* apresentaram expressão diferenciada em estudo de sequenciamento massivo de transcriptoma, mostrando uma menor expressão em sangue periférico (1,47 e 2 vezes respectivamente) em pacientes com LMC quando comparado aos controles(17).

O gene *ABCA7* é expresso em tecidos mielo-linfático com maior expressão em leucócitos periféricos, timo, baço, e medula óssea (18), sugerindo dessa forma um papel fundamental no desenvolvimento de linhagens celulares hematopoiéticas. O gene *ABCA7* apresenta elevado grau de homologia com o gene *ABCA1*. Estudos mostram que a expressão do gene *ABCA7* encontra-se aumentada pelo colesterol celular enquanto que o *ABCA1* encontra-se diminuída (19). O *ABCA7* medeia apolipoproteína- dependente de HDL, liberando tanto colesterol e fosfolípido celular mesmo na ausência de *ABCA1*. A reação é semelhante à do *ABCA1*, porém a afinidade por apolipoproteínas para as células e a regulação de sua expressão são diferentes (20). A transcrição da expressão do gene *ABCA7* é regulada negativamente por colesterol celular, mediada pela proteína de ligação do elemento de regulação de esterol-(SREBP)2 que se liga ao SRE no promotor, no sentido oposto ao do *ABCA1* (21). Segundo Meurs e colaboradores (2012) (22) o *ABCA7* pode desempenhar um papel na proliferação de células T e a eritropoiese no baço. Estudos revelam que este gene está associado à Doença de Alzheimer (23) (24), e com a fagocitose em vários alvos, incluindo a apoptose das células (25).

O gene *ABCC12*, também conhecido por MRP9 se expressa em níveis baixos em testículos, ovários e tecidos da próstata (26). MRP9 é uma proteína de membrana e tem expressão limitada em tecidos essenciais, podendo ser um alvo terapêutico em terapias-alvo com anticorpos, conjugados de anticorpos e imunotoxinas (27). Este gene foi observado em linhagem de células de carcinoma e adenocarcinoma originados a partir do pulmão, cólon, mama e próstata (28). Porém até o presente momento a função fisiológica e o envolvimento na quimioterapia do câncer ainda não está clara(29).

Este trabalho objetivou quantificar a expressão dos genes *ABCA7* e *ABCC12* em células do sangue periférico de pacientes portadores de LMC, validá-los como genes envolvidos na resposta ao Mesilato de Imatinibe e verificar a existência de suas expressões com o índice EUTOS.

MATERIAL E MÉTODOS

A população de estudo foi composta por 116 pacientes do Hospital Ophir Loyola, ambos os sexos, diagnosticados com LMC e em tratamento com MI que são atendidos no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA) para monitoramento molecular de *BCR-ABL*, e por 35 indivíduos controle. O consentimento informado foi obtido para todos os pacientes de acordo com as diretrizes institucionais. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação HEMOPA, recebendo o certificado de número CAAE: 07039412.0.0000.0015 em 24 de outubro de 2012.

Foram coletados amostras de sangue periférico, através de punção venosa para retirada de 5 mL de material, que foram acondicionado em tubos com anticoagulante EDTA, e encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Fundação HEMOPA.

A extração de RNA de leucócitos periféricos foi executada com o protocolo de extração trizol-cloroformio realizado conforme instrução do fabricante. O RNA total foi extraído pelo método TRIZOL® *Reagent* (Invitrogen, USA), conforme instruções do fabricante e algumas modificações. Em seguida realizou-se a reação de RT-PCR no termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*), com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*LifeTech*). Uma mistura de 20 µL contendo os reagentes do kit (10x RT Buffer, 25X dNTP Mix, 10x RT *Random Primers* e *MultiScribe TM Reverse Transcriptase*) e água ultra-pura foi preparada de acordo com as instruções protocoladas pelo fabricante. A essa mistura foi adicionado 20 µL do RNA hidratado. O total de 40 µL foi levado ao termociclador seguindo o perfil térmico de duas etapas com 37°C por 60 minutos, 85°C por 5 minutos e finalizado com um resfriamento de 4°C. Ao término da reação o cDNA foi congeladas no freezer -20°C.

A reação da PCR em Tempo Real foi realizada utilizando o kit comercial *TaqMan Gene Expression Master Mix + Assay-by-Design*[®] (*Applied Biosystems*), no equipamento *ABI Prism 7000* (*Applied Biosystems*). Quantificou-se o gene *ABL*, como controle, o *ABCA7*, *ABCC12* e os transcritos *B2A2* e *B3A2*. A reação foi composta de 3 µL de cDNA das amostras, anteriormente preparada, 6,8 µL de água ultra-pura, 10 µL do master mix e 0,8 µL de Assays (de acordo com o gene alvo), totalizando uma reação de 20 µL para cada amostra e gene. Todas as reações ficaram incubadas a 50 °C durante 2 min, 60 °C durante 30 min e 95 °C durante 10 min, seguido por 50 ciclos de 95 °C durante 15s e 60 °C durante 1 min.

A análise da expressão gênica teve como base os valores do *cycle threshold* (CT), no qual é o número do ciclo no nível limiar de captação da fluorescência, sendo, portanto a métrica estatística primária de interesse (30). Os dados foram organizados em uma planilha no Windows Excel (Microsoft[®]), e calculado de acordo com Lemos e colaboradores (2005) (31).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico Bioestat 5.0 (32). A partir dos valores de CT, foi realizado a comparação da expressão gênica entre pacientes e controles, levando em consideração a definição de resposta dos pacientes. A comparação foi realizada estatisticamente através do Teste *t* de Student para os resultados que apresentarem distribuição normal e teste Mann Whitney para os testes que não estiverem dentro da normalidade, sendo $p \leq 0,05$ considerado indicativo de diferença estatística. Foi realizado o Teste Exato de Fisher para verificar se as proporções observadas nas diferentes categorias estão ou não associadas, e o Teste de Regressão Logística Simples para verificar se havia dependência entre o resultado de escores EUTOS e a expressão gênica.

O índice de EUTOS foi calculado conforme o cálculo online deste escore, disponível em: http://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos_score/index_eng.html. Sendo que todos os valores foram obtidos antes de qualquer tratamento.

RESULTADOS

Um total de 116 pacientes com LMC do Hospital Ophir Loyola foram incluídos neste estudo. A idade mediana dos pacientes foi de 43 anos (variação de 04 - 85 anos). A relação masculino/feminino foi de 67/49, e de pacientes responsivos/não responsivos de 39/42.

A eficácia da terapia foi observada de acordo com a resposta do paciente ao tratamento. Foram considerados responsivos os pacientes que apresentaram resposta Ótima e Alerta, e não responsivos os que apresentaram resposta Falha. 29 pacientes apresentavam-se em diagnóstico e seis não estavam sendo tratados com Imatinib no momento do estudo. O fluxograma de estudo é mostrado na figura 1.

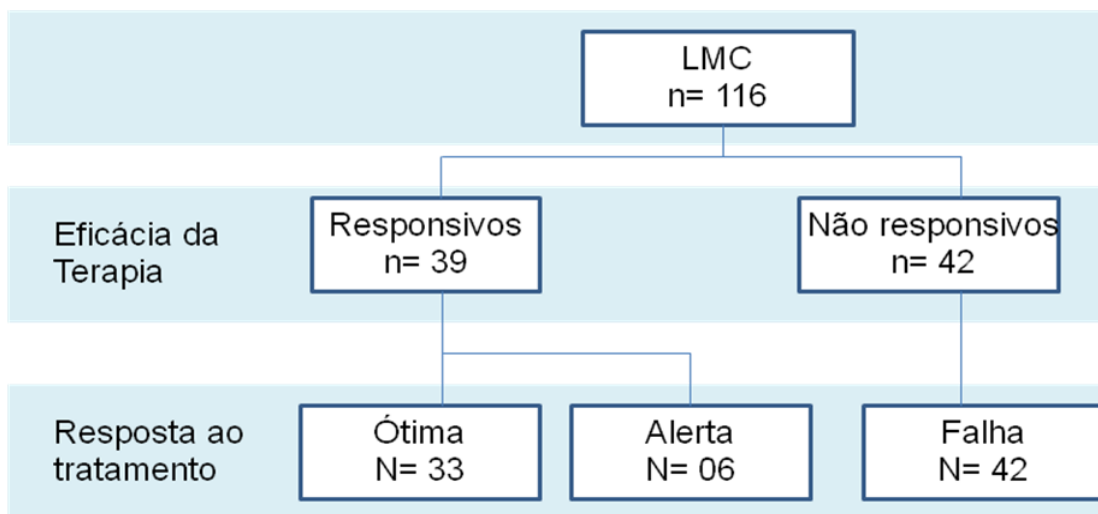


Figura 1. Fluxograma de estudo. Cento e dezesseis

pacientes foram incluídos neste estudo. Do total analisado, 39 apresentaram-se responsivos à terapia com o Imatinib e 42 não responsivos. Os pacientes responsivos foram classificados de acordo com a resposta: Ótima ou Alerta, onde foram encontrados 33 e seis pacientes respectivamente. A resposta Falha foi classificada no grupo dos pacientes não responsivos, onde foram observados 42 pacientes.

Analisando as médias da expressão gênica do *ABCA7* e *ABCC12* no grupo controle e nos pacientes de acordo com a eficácia da terapia observou-se que a expressão do *ABCA7*

encontra-se diminuída no grupo de pacientes em diagnóstico (1,1344), e a expressão do *ABCC12* encontra-se aumentada nesse mesmo grupo (5,1655) (Tabela 1).

Tabela 1 Média da expressão gênica dos genes *ABCA7* e *ABCC12* em células do sangue periférico.

	<i>ABCA7</i>	<i>ABCC12</i>
Controles	2,1361	0,0005
Responsivos	2,9925	0,0002
Não responsivos	2,3872	0,0003
Diagnóstico	1,1344	5,1655

Comparando a expressão gênica do *ABCA7* e *ABCC12* entre pacientes e controles, quanto a eficácia da terapia e em relação a resposta ao tratamento observou-se valores significativos nos seguintes casos: controle *ABCA7* e pacientes totais ($p=0,0312$); controle *ABCA7* e pacientes em diagnóstico ($p<0,001$); controle *ABCA7* e pacientes com resposta alerta ($p=0,0165$) (Tabela 2).

Tabela 2 Comparação da expressão gênica do *ABCA7* e *ABCC12* em relação ao controle.

	Controle <i>ABCA7</i>	Controle <i>ABCC12</i>
Pacientes totais	$p=0,0312$	$p=0,4410$

Responsivos	p=0,1830
Não responsivos	p=0,8660
Diagnóstico	p<0,001
Resposta Ótima	p=0,4766
Resposta Alerta	p=0,0165

A expressão gênica do gene *ABCC12* foi verificada em somente 19 pacientes e em quatro amostras controles. A comparação entre pacientes e controles não apresentou valores significativos $p=0,4410$ no teste de Mann-Whitney. Entre os pacientes que não apresentaram expressão gênica foi realizado o Teste de Fisher e observaram-se os seguintes valores nas comparações: controle e pacientes responsivos $p=0,2315$; controle e pacientes em diagnóstico $p=1,000$; e controle e pacientes totais $p=0,5974$.

Como indicador de monitoramento para o tratamento de pacientes na fase crônica foi analisado o escore EUTOS (7) em 63 pacientes que apresentaram dados completos em seus prontuários. Destes, 34 apresentaram risco baixo e 29 risco elevado. Foi realizado o teste de Regressão Logística simples para determinar se havia dependência entre os resultados do escore e a expressão gênica de *ABCA7*. Este teste apresentou $p=0,5230$ o que indica que não há dependência entre o escore diagnóstico e a expressão gênica de *ABCA7*.

DISCUSSÃO

No presente estudo, a mediana de idade no momento do diagnóstico foi de 43 anos, o qual corrobora com estudos nacionais (33) que mostram que a mediana é no mínimo dez anos mais baixa quando comparada com a literatura internacional que é em torno de 65 anos (3).

A monitorização contínua da LMC, usando técnicas quantitativas baseadas em RT-PCR no início e durante o tratamento medicamentoso contínuo, permite a avaliação da resposta inicial e pode alertar os médicos para possíveis recaídas, sendo de fundamental importância para o ajuste do tratamento e prognóstico. O escore EUTOS, instrumento válido para a predição dos efeitos terapêuticos(9) facilita o prognóstico devido sua simplicidade.

Conforme estudo de Moreira-Nunes e colaboradores 2013 (17) os genes *ABCA7* e *ABCC12* apresentaram expressão diferenciada, porém alguns resultados diferentes. A expressão do gene *ABCA7* corroborou com o presente estudo apresentando expressão diferenciada entre pacientes e controles ($p=0,0312$). O gene *ABCC12* não apresentou expressão diferenciada entre pacientes e controles, entretanto ao avaliar a média de expressão entre controle e pacientes em diagnóstico encontrou-se uma expressão aumentada, confirmando o que foi destacado no estudo Wang e colaboradores (2014) (16) ao dizer que a resistência às drogas é causada pela superexpressão dos transportadores ABC.

A média de expressão do gene *ABCC12* apresentou conformidade com os resultados de Moreira-Nunes e colaboradores (2013) (17) quando comparado a análise de expressão gênica na medula óssea à qual apresentou expressão apenas nos pacientes.

Conforme observado na Tabela 1 verifica-se que a expressão gênica do *ABCA7* encontra-se diminuída na fase mais precoce do câncer (diagnóstico), o que não corrobora com (Furuta e colaboradores (2010) (11) que afirma que genes envolvidos em vias metabólicas se encontram mais elevados nesta fase.

Observando todos os resultados da Tabela 1 referente à média de expressão do gene *ABCA7* percebe-se que há uma pequena diferença entre a expressão dos pacientes responsivos e não responsivos, e do controle. Entretanto, quando se compara estes com os pacientes em diagnóstico nota-se a diferença acentuada de expressão. Pode-se deduzir dessa forma que este gene se expressa de forma aproximada ao grupo controle quando o paciente faz uso do

medicamento, independente da resposta. Analisando a Tabela 2 pode-se confirmar esta hipótese, já que os pacientes em Resposta Alerta apresentaram uma diferença de expressão, o qual pode ser devido a ausência de medicação. Dessa forma, pode-se dizer que possivelmente o gene *ABCA7* está associado à adesão terapêutica.

Segundo Barbato e colaboradores (2014)(13) as proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, como os SREBPs, estão envolvidas na progressão do câncer. Os SREBPs são reguladores de transcrição do metabolismo lipídico e crescimento celular e sua sinalização, sendo sua perda de atividade inibidora de crescimento de células cancerosas (34). A transcrição da expressão do gene *ABCA7* regulada negativamente por colesterol celular é mediada pela proteína de ligação ao elemento de regulação de esterol-(SREBP)2 (21). Deduzimos dessa forma que esta proteína deve estar com atividade aumentada em pacientes com LMC, devido o gene *ABCA7* apresentar-se diminuído em pacientes de diagnóstico ($p < 0,001$).

Através dos estudos de Iwamoto & Abe-Dohmae e seus colaboradores (21)(25) referentes ao mecanismo de ação do colesterol celular na função do *ABCA7* e da ligação do (SREBP)2 nesse processo, propomos que para que a expressão deste gene se encontre com valores próximos do grupo controle a proteína SREBP2 tenha uma perda de sua atividade. Desta forma, a expressão do gene *ABCA7* iria se aproximar dos valores normais e a fagocitose iria se normalizar. A figura 1 resume a possível relação da proteína SREBP2 na expressão do gene *ABCA7* na LMC.

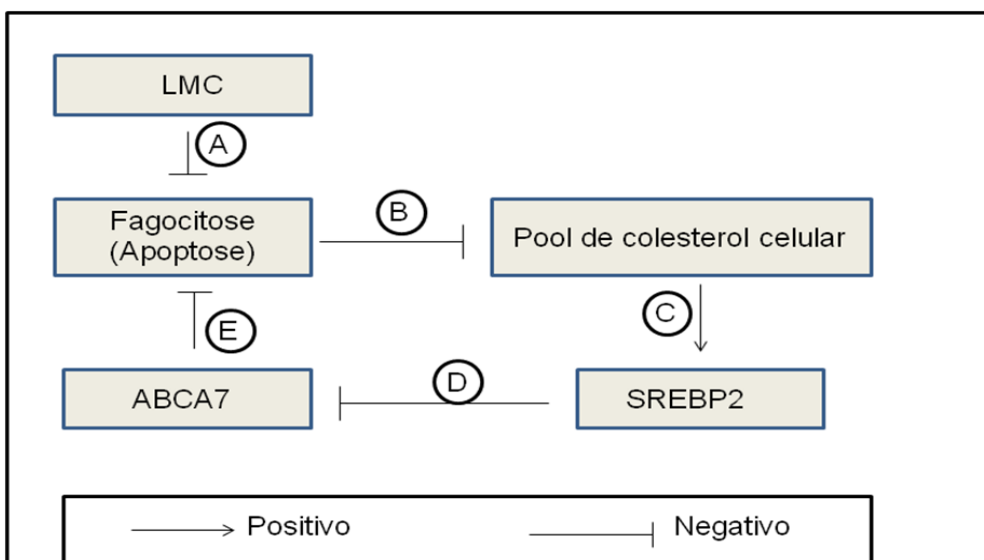


Figura 1. Associação da expressão do gene ABCA7 na Leucemia Mielóide Crônica.

Na LMC o processo de apoptose celular está inibido (A). A fagocitose de alvos ricos em colesterol (por exemplo, células em apoptose) inibe a SREBP2. Desta forma, como a apoptose está inibida o nível de colesterol celular irá diminuir (B) e a SREBP2 será ativada (C). (D) SREBP2 ativada irá regular de forma negativa a transcrição de ABCA7. Como o ABCA7 aumenta a atividade fagocitária celular *in vivo* e *in vitro*, e este se encontra diminuído o processo de fagocitose será inibido (E).

LMC: Leucemia Mielóide Crônica; SREBP2: Proteínas de ligação do elemento de regulação do esterol.

O resultado obtido na Análise de Regressão mostrou que não há relação entre o resultado de escore Eutos e a expressão do gene *ABCA7* nos pacientes, o que pode ser justificado pelo fato deste gene ser um indicador de adesão e não de resposta. A baixa adesão é o principal fator contributivo para a perda de resposta citogenética e falência do tratamento em pacientes com terapêutica de longo prazo (35). Em pacientes tratados com Imatinib durante anos a baixa adesão pode ser o motivo principal para não se obter respostas moleculares adequadas (36). Pode-se dessa forma concluir que possivelmente o gene *ABCA7* está associado à adesão terapêutica e pode contribuir para predizer se haverá respostas ao tratamento; e que o gene *ABCC12* não apresentou resposta clara de sua relação com a LMC.

REFERENCIAS

1. Druker BJ. Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell*. 2002;1(1):31–6.
2. Souza C a, Pagnano KB., Bendit I, Conchon M, Freitas CMMM, Moellmann, a; Funke V a. M, et al. Leucemia mieloide crônica Chronic myeloid leukemia. *Rev Assoc Médica Bras*. 2013;9(3):220–32.
3. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007;370:342–50.
4. Von Bubnoff N, Duyster J. Chronic Myelogenous Leukemia. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(7):114–21.

5. Druker BJ, Shu T, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann Z, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells. *Nat Med*. 1996;2(5).
6. Almeida A, Castro I, Coutinho J, Guerra L, Marques H, Pereira AM. Recomendações para o diagnóstico, tratamento e monitorização da Leucemia Mieloide Crônica. *Acta Med Port*. 2009;22:537–44.
7. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872–84.
8. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: Review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108(1):28–37.
9. Hoffmann VS, Baccarani M, Lindorfer D, Castagnetti F, Turkina a, Zaritsky a, et al. The EUTOS prognostic score: review and validation in 1288 patients with CML treated frontline with imatinib. *Leukemia* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;27(10):2016–22.
10. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: The EUTOS score. *Blood*. 2011;118(3):686–92.
11. Furuta E, Okuda H, Kobayashi A, Watabe K. Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1805(2):141–52.
12. Yvan-charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, et al. ATP-Binding Cassette Transporters and HDL Suppress Hematopoietic Stem Cell Proliferation. *Science* (80-). 2010;328(5986):1689–93.
13. Barbato DL, Rolando V, Desideri E, Ciriolo MR. Managing lipid metabolism in proliferating cells: New perspective for metformin usage in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1845(2):317–24.
14. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transported of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2003;55:3–29.
15. Milojkovic D, Apperley J. Mechanisms of resistance to imatinib and second-generation tyrosine inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009;15(24):7519–27.
16. Wang Y-J, Zhang Y-K, Kathawala R, Chen Z-S. Repositioning of Tyrosine Kinase Inhibitors as Antagonists of ATP-Binding Cassette Transporters in Anticancer Drug Resistance. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2014;6(4):1925–52.

17. Moreira-Nunes CF, Azevedo TC, Beltrão AC, Francês LT, Sousa RG, Silva IT, et al. Differentially expressed genes responsible for insensitivity of CD34+ cells to kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *BMC Proc* [Internet]. 2013;7(Suppl 2):O1.
18. Kaminski WE, Orsó E, Diederich W, Klucken J, Drobnik W, Schmitz G. Identification of a novel human sterol-sensitive ATP-binding cassette transporter (ABCA7). *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(2):532–8.
19. Cheng-ai W, Na W, Dan Hui Z. An evaluation of the mechanism of ABCA7 on cellular lipid release in ABCA7-HEC293 cell. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(2):306–10.
20. Abe-Dohmae S, Ikeda Y, Matsuo M, Hayashi M, Okuhira KI, Ueda K, et al. Human ABCA7 Supports Apolipoprotein-mediated Release of Cellular Cholesterol and Phospholipid to Generate High Density Lipoprotein. *J Biol Chem*. 2004;279(1):604–11.
21. Iwamoto N, Abe-Dohmae S, Sato R, Yokoyama S. ABCA7 expression is regulated by cellular cholesterol through the SREBP2 pathway and associated with phagocytosis. *J Lipid Res*. 2006;47(9):1915–27.
22. Meurs I, Calpe-Berdiel L, Habets KLL, Zhao Y, Korporaal SJ a, Mommaas a. M, et al. Effects of deletion of macrophage ABCA7 on lipid metabolism and the development of atherosclerosis in the presence and absence of ABCA1. *PLoS One*. 2012;7(3).
23. Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert C, Carrasquillo MM, et al. Common variants in ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2011;43(5):429–35.
24. Vasquez JB, Fardo DW, Estus S. ABCA7 expression is associated with Alzheimer's disease polymorphism and disease status. *Neurosci Lett*. 2013;27(6):556.
25. Abe-Dohmae S, Yokoyama S. ABCA7: a potential mediator between cholesterol homeostasis and the host defense system. *Clin Lipidol* [Internet]. 2012;7(6):677–87.
26. Mahadevan D, List AF. Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies. *Blood*. 2004;104(7):1940–51.
27. Bera TK, Iavarone C, Kumar V, Lee S, Lee B, Pastan I. MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *PNA*. 2002;99(10):6997–7002.
28. Yabuuchi H, Shimizu H, Takayanagi S, Ishikawa T. Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;288(4):933–9.
29. Chen Z-S, Tiwari AK. Multidrug Resistance Proteins (MRPs/ABCCs) in Cancer Chemotherapy and Genetic Diseases. *Febs J*. 2011;278(18):3226–45.

30. Yuan JS, Reed A, Chen F, Jr CNS. Statistical analysis of real-time PCR data. 2006;12:1–12.
31. De Lemos J a., de Oliveira CM, Scerni a. C, Bentes AQ, Beltrão AC, Bentes IR, et al. Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Genet Mol Res.* 2005;4(4):803–11.
32. AYRES M, AYRES MJR, AYRES DL, SANTOS AS. BIOESTAT: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Soc Civ Mamirauá. 2008;.
33. Bortolheiro TC, Chiattonne CS. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(Supl. 1):3–7.
34. Williams KJ, Argus JP, Zhu Y, Wilks MQ, Marbois BN, York AG, et al. An essential requirement for the SCAP/SREBP signaling axis to protect cancer cells from lipotoxicity. *Cancer Res.* 2013;73(9):2850–62.
35. Ibrahim AR, Eliasson L, Apperley JF, Milojkovic D, Bua M, Szydlo R, et al. Poor adherence is the main reason for loss of CCyR and imatinib failure for chronic myeloid leukemia patients on long-term therapy. *Blood.* 2011;117(14):3733–6.
36. Marin D, Bazeos A, Mahon FX, Eliasson L, Milojkovic D, Bua M, et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol.* 2010;28(14):2381–8.