



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

**VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *ABCA1* E *ABCG1* EM
AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO EM PACIENTES COM LEUCEMIA
MIELOIDE CRÔNICA**

RUTH MERIEN DE FREITAS VIEIRA

BELÉM

2015

RUTH MERIEN DE FREITAS VIEIRA

**VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *ABCA1* E *ABCG1* EM
AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO EM 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

BELÉM – PA

2015

RUTH MERIEN DE FREITAS VIEIRA

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

Banca examinadora: Prof^a Dr^a Rita de Cássia Mousinho
Instituto de Ciências Biológicas / UFPA

Prof. Dr. Ricardo Vieira
Instituto de Ciências Biológicas / UFPA

Prof^a Dr^a Caroline Moreira Nunes
Instituto de Ciências Biológicas / UFPA

Prof^a Dr^a Letícia Lamarão
Instituto de Ciências Biológicas / UFPA
(suplente)

Belém, Novembro de 2015

*“E em nenhum outro há salvação; porque debaixo do céu nenhum outro nome há,
dado entre os homens, em que devamos ser salvos”*

Atos dos Apóstolos 4.12

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe que nunca mediu esforços pela minha felicidade e ao meu amado Espírito Santo por ser minha fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que me concedeu, pelo dom da vida e por sua misericórdia sobre minha vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. José Alexandre por sua paciência e por sua disposição e tempo.

À Andreza Maia e Adriane Maria por sempre estarem dispostas a esclarecer dúvidas quando estas surgiam e por todo apoio que foi crucial para o andamento deste trabalho, assim como a todos os colegas do Hemopa por darem suas contribuições.

Agradeço ao meu amigo Edson Nascimento por ter me auxiliado quando necessitei de uma fonte para o Word...

À minha amiga Maria Renata por estar ao meu lado nesses 6 anos de amizade e por ser meu suporte nos momentos de “tensão pré-defesa”.

Agradeço de todo coração ao meu grande amigo César Raio Fôro que se disponibilizou a me emprestar seu netbook, pois sem este eu não teria conseguido finalizar este projeto.

Agradeço a todos os meu amigos, colegas e familiares que não foram citados mas que sempre torceram por mim e por minhas vitórias.

Agradeço à minha chefe Dr^a Flávia Carneiro por ter me compreendido todas as vezes que necessitei dedicar um tempo a este projeto facilitando meu horário no local de trabalho.

VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *ABCA1* E *ABCG1* EM AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

RUTH MERIEN DE FREITAS VIEIRA

R.M.F. VIEIRA^{*1}

*Autor Correspondente

e-mail: rmfv.vieira@gmail.com

ANDREZA LOPES MAIA^{*1,2}

A.L.MAIA

e-mail: andreza_maia@ymail.com

ADRIANE MARIA BEZERRA DA SILVA

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

e-mail: adrianedemaria@gmail.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

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

VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *ABCA1* E *ABCG1* EM AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

R.M.F. VIEIRA¹, A.L.MAIA^{1,2}, A.M.B. SILVA^{1,2}, I.B.RAMOS^{1,2}, C.S.SARMENTO¹, 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: Ruth Merien de Freitas Vieira, 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 Mieloide Crônica tem o mesilato de imatinibe como terapia de primeira linha. Os genes *ABCA1* e *ABCG1* apresentaram expressão diferenciada em estudo de sequenciamento massivo de transcriptoma, o que os tornou objeto de estudo a fim de validá-los como genes envolvidos na resposta ao imatinibe.

MÉTODOS: A análise da expressão gênica teve como base os valores do *cycle threshold* (CT) através de PCR em Tempo Real, onde foi realizada a comparação da expressão entre pacientes e controles, levando em consideração a definição de resposta dos pacientes de acordo com a redução de log. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa BIOESTAT 5.0, e índice de EUTOS foi calculado conforme descrito na literatura.

RESULTADOS: A expressão de ambos os genes apresentou maior média em pacientes de baixo risco segundo o índice de Eutos. *ABCA1* apresentou menor expressão em pacientes não responsivos e maior em reponsivos. *ABCG1* estava mais expresso em pacientes responsivos.

CONCLUSÃO: A ação de *ABCA1* e *ABCG1* como bombas de efluxo de drogas pode ser elucidado na divisão dos pacientes segundo Eutos. Levando em consideração a descoberta recente do HDL como supressor de células tronco hematopoiéticas, pode ser aplicada na estratificação de acordo com a redução de log. Em ambos os casos são necessários mais estudos para que futuramente eles possam se tornar bons marcadores no monitoramento de pacientes com leucemia mieloide crônica.

Palavras-Chave: Leucemia Mieloide Crônica, Imatinibe, *ABCA1*, *ABCG1*.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Chronic Myeloid Leukemia has imatinib mesylate as first-line therapy. The ABCA1 and ABCG1 genes showed differential expression in massive sequencing study of transcriptome, which became the object of study in order to validate them as genes involved in the response to imatinib.

METHODS: The gene expression analysis was based on the values of the cycle threshold (CT) by RT-PCR, which was carried out to compare the expression between patients and controls, taking into account the patients' response setting according to the log reduction. Statistical analyzes were performed using the program Bioestat 5.0 and EUTOS index was calculated as described in the literature.

RESULTS: The expression of both genes had a higher average in low-risk patients according to Eutos index. ABCA1 showed less expression do not respond and most patients reponsivos. ABCG1 was more expressed in responsive patients.

CONCLUSION: The ABCA1 and ABCG1 action as drug efflux pumps can be elucidated in the division of patients according Eutos. Taking into consideration the recent discovery of HDL as a hematopoietic stem cell suppressor, it can be applied to the laminate according to the log reduction. In both cases more studies are needed so that in the future they can become good markers for monitoring patients with chronic myeloid leukemia.

Keywords: Chronic Myeloid leukemia, Imatinib, *ABCA1*, *ABCG1*.

INTRODUÇÃO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma desordem hematopoiética cuja patogênese envolve uma anomalia genética característica: a translocação entre o gene *ABL* no cromossomo 9 e o gene *BCR* no cromossomo 22 t (9; 22) (q34; q11). O cromossomo 22 translocado chamado *Philadelphia* (Ph) é o responsável pelo desenvolvimento da doença ^[1], sendo o primeiro rearranjo cromossômico associado a um tumor maligno específico ^[2].

O gene de fusão *BCR-ABL* codifica uma proteína anormal com atividade tirosina quinase ^[3], sendo ela responsável pela ativação da sinalização mitogênica, alteração da adesão celular ao estroma da medula óssea e inibição da apoptose ^[4].

Quando presentes, os sintomas são inespecíficos, como: mal-estar geral, fadiga, sudorese, perda de peso. A esplenomegalia é bastante frequente, causando desconforto abdominal ^[5].

Dentre os achados laboratoriais observa-se contagem de leucócitos elevado com desvio à esquerda, com frequência basofilia, e um aumento do baço é sugestivo de LMC ^[6]. Seu curso clínico começa pela fase crônica, onde mais de 90% dos pacientes são diagnosticados, seguindo a fase acelerada e crise blástica ^[7]. O diagnóstico pode ser feito através de hibridização por fluorescência *in situ* ou por análise dos transcritos BCR-ABL através RQ-PCR. Esta técnica por sua vez é altamente sensível para a detecção de doença residual mínima ^[8].

A leucemia mieloide crônica passa por 3 estágios: fase crônica, acelerada e blástica. A primeira caracteriza-se por expansão mieloide massiva e retenção da capacidade de diferenciação das células ^[9]. A progressão da LMC para a fase acelerada está associada à instabilidade genômica, o que predispõe ao aparecimento de outras anormalidades moleculares ^[10].

De acordo com ^[11], a eficácia dos inibidores da tirosina quinase tende a reduzir o número de pacientes que evoluem da fase crônica para a fase acelerada, cuja qual se caracteriza por esplenomegalia e células fracamente diferenciadas no sangue periférico e na medula. Quando não tratada evolui para uma crise blástica em 6 meses ^[12].

Apesar do transplante alogênico de medula óssea ser considerado como único tratamento curativo para a LMC, há um risco elevado de mortalidade, o que fez com que esse método fosse ficando cada vez mais à margem desde o surgimento do mesilato de imatinibe ^[13], sendo este uma primeira

geração inibidor da tirosina quinase (TKI) que foi aprovado para terapia de primeira linha em pacientes com leucemia mielóide crônica pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2002 ^[1].

O mesilato de imatinibe ou simplesmente imatinibe (STI-571-Glivec®) inibe a atividade de tirosino-quinase da proteína BCR-ABL, pois imita a molécula de ATP (adenosina trifosfato), e assim liga-se ao sítio do ATP na proteína ^[14], impedindo que substratos envolvidos na regulação do ciclo celular sejam fosforilados ^[15].

Essa droga inibe a proliferação e induz apoptose em linhagens de células BCR-ABL positivas, entretanto, possui efeito sobre outros domínios tirosino-quinases. Apesar de sua eficácia no tratamento da LMC, a resistência surge em uma minoria dos pacientes após a administração regular do medicamento e pode ser de forma adquirida ou intrínseca, respectivamente, por falta de resposta hematológica e citogenética e pela presença de mutações na região que codifica o domínio de tirosino-quinase da proteína quimérica BCR-ABL ^{[16],[17]} que alteram o sítio de ligação da droga ou a conformação da proteína, impossibilitando a ação adequada da droga ^[18].

A partir da Escala Internacional (IS) é possível avaliar a resposta do paciente considerando-se o “baseline” como 100% de doença, ou seja, paciente livre de tratamento. Os valores de BCR-ABL na escala estão descritos no Quadro 1.

Nº de transcritos BCR-ABL	Escala Logarítmica (Log)
100%	0
10%	1
1%	2
0,1%	3
0,01%	4
0,001%	5

Quadro 1. Valores de BCR-ABL na Escala Internacional

O risco relativo de pacientes com leucemia mieloide crônica podem ser calculados de acordo com os scores descritos por Sokal ^[19] e Harsford ^[20] estratificando o risco de acordo com as características clínicas e laboratoriais para que haja o tratamento adequado em cada fase (Quadro 2).

Scores	Cálculo	Definição de risco
Sokal	$\text{Exp } 0.0116 (\text{idade} - 43,4) + 0.0345 (\text{baço} - 7,51) + 0.188 [(\text{plaquetas}/700)^2 - 0,563] + 0.0887 (\text{blastos} - 2,10)$	Baixo risco < 0,8 Risco intermediário 0,8- 1,2 Alto risco > 1,2
Eutos	Baço x 4 + basófilos x 7	Risco baixo: ≤ 87 Risco alto: > 87

Quadro 2. Scores de Eutos, descrito por Harsford ^[20], e Sokal ^[19]. *Idade = 0 se < 50 anos e = 1 se ≥ 50. Baço: cm abaixo do rebordo costal. Basófilos = 0 se < 3% e = 1 se ≥ 3%. Plaquetas = 0 se < 1500 x 10⁹ e = 1 se ≥ 1500 x 10⁹.

Epidemiologia

A LMC é uma doença com predominância masculina cuja idade no momento do diagnóstico varia entre 45 e 55 anos ^[21], compreendendo cerca de 0,6 a 2 casos por 100.000 habitantes. Graças aos inibidores de tirosina quinase, a taxa de prevalência da LMC têm aumentado ^[22]. Este tipo de leucemia é raro em crianças, sendo diagnosticados cerca de 4 casos ao ano nesse grupo ^[23].

A *American Cancer Society* ^[24] estimou que para o ano de 2015, serão diagnosticados cerca de 6.660 novos casos com LMC (3.530 em homens e 3.130 em mulheres), cerca de 1140 óbitos por LMC (590 homens e 550 mulheres) e pouco mais de 10% de todos os novos casos de leucemia serão de leucemia mieloide crônica.

A exposição à radiação ionizante e a exposição ocupacional ao benzeno se configuram como as causas para o desenvolvimento da LMC. Os bombardeios à Hiroshima e Nagasaki foram os primeiros indícios sobre o desenvolvimento de leucemia após radiação ionizante. A taxa de incidência para leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda e leucemia mieloide crônica sofreram aumento após o ocorrido [25].

Transportadores ABCA1 e ABCG1 e o papel no transporte reverso do colesterol

Os genes *ABCA1* e *ABCG1* são membros da subfamília de transportadores transmembranares ABCA e ABCG, respectivamente, sendo o primeiro localizado no cromossomo 9 e o último no cromossomo 21 [26]. Estes genes codificam proteínas transmembranares que atuam no efluxo do colesterol como pode ser observado na figura 1.

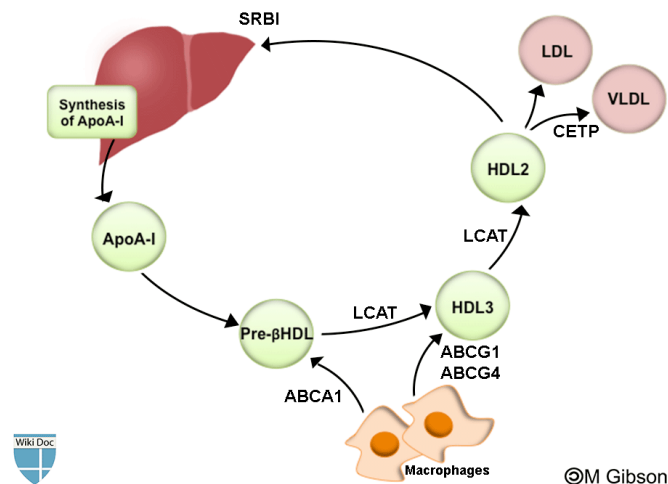


Figura 1. Formação da partícula de HDL a partir da atuação conjunta dos transportadores ABCA1 e ABCG1 [27].

Através da proteína ABCA1 existente na superfície do macrófago na parede arterial [28], a Apo A-1 adquire fosfolipídios e colesterol intracelular acumulado nas células do sistema retículoendotelial como monócitos e macrófagos [29]. A enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) esterifica o colesterol através da interação entre esta enzima e a Apo A-1 presente na HDL [30].

O colesterol adentra o núcleo da partícula de HDL, tornando esta mais madura . O colesterol transportado para o fígado pela HDL pode ser reaproveitado, participando de outras vias metabólicas, ou excretado na bile, com reabsorção de cerca de dois terços do mesmo ^[31].

Os genes ABCA1 e ABCG1 apresentaram expressão diferenciada em estudo de sequenciamento massivo de transcriptoma ^[32], o que os tornou objeto de estudo em virtude da necessidade de compreensão da atuação desses genes na leucemia mieloide crônica.

MATERIAL E MÉTODOS

POPULAÇÃO DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS

A população de estudo foi composta por 178 indivíduos de ambos os sexos, sendo 158 diagnosticados com LMC e atendidos no Hospital Ophir Loyola, fazendo uso do mesilato de imatinibe e que são monitorados por PCR em tempo real no laboratório de Biologia Celular e Molecular da Fundação Hemopa; e 20 indivíduos que fizeram parte do grupo controle.

COLETA DO MATERIAL

Através de punção venosa do sangue periférico, 5 mL de material foram coletados e acondicionados em tubos contendo anticoagulante EDTA e encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Fundação HEMOPA.

EXTRAÇÃO DE RNA E REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

A extração de RNA nessas amostras foi realizada pelo método trizol-clorofórmio (TRI-Reagent® Solution) conforme instrução do fabricante, obtendo-se no final 20 µl de RNA hidratado, seguindo com a reação de transcrição reversa (RT) através do termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)®* utilizando o kit *High Capacit cDNA Reverse Transcriptase®* que consiste no preparo de 20 µl dos reagentes do kit (10x RT Buffer, 25X dNTP Mix, 10x RT Random Primers e MultiScribe TM Reverse Transcriptase) e água pura, conforme instruções do fabricante, a serem misturados aos 20 µl de RNA hidratado, consistindo dessa forma, em 40 µl de material para a reação de transcrição reversa realizada em duas etapas: 37°C por 60 minutos e depois 85°C por 5 minutos, finalizando com resfriamento a 24°C, obtendo-se então o cDNA, a serem congelados em -20°C.

PCR QUANTITATIVA POR TEMPO REAL

Através do aparelho ABI Prism 7000 (*Applied Biosystems)®* utilizando o kit comercial *TaqMan Gene Expression Master Mix + Assay-by-Design®*, segundo instruções do fabricante foi realizada a

PCR quantitativa por tempo real utilizando 3 µl de cDNA para amplificação, respeitando a programação apropriada para a reação que passa por três estágios: o primeiro consiste em 1 ciclo de 2 minutos a 50°C, o segundo de 10 minutos a 95°C e o terceiro de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C tendo como volume final 50 µl. Os genes analisados foram o *ABL* (controle), os transcritos *B2A2* e *B3A2* e os genes *ABCA1* e *ABCG1*.

CÁLCULO DA EXPRESSÃO

A expressão dos genes foi analisada de acordo com Lemos *et al.* ^[33]:

$$\frac{2^{-Ct (alvo)}}{2^{-Ct (ABL)}}$$

Onde *ABL* é o controle endógeno e o cycle threshold (CT) é o número do ciclo no nível limiar de captação da fluorescência, ou seja, onde se inicia a amplificação.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, os dados foram analisados de duas formas distintas: primeiramente os pacientes ficaram divididos em dois grupos: o primeiro grupo composto por aqueles considerados responsivos (os que apresentaram redução em 2 logs ou mais) e o segundo grupo por pacientes não responsivos (aqueles que apresentaram não chegaram a reduzir pelo menos 2 logs, segundo a escala logarítmica); a expressão dos genes *ABCA1* e *ABCG1* foi comparada entre esse grupos e o grupo controle.

Em um segundo momento, os pacientes foram divididos de acordo com o score de Eutos: alto risco e baixo risco. A expressão gênica em cada um desses grupos foi comparada com a expressão no grupo controle.

Através do programa Bioestat 5.3, foi utilizado o teste de Man-Whitney para comparação das expressões gênicas entre pacientes e controles. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significante.

RESULTADOS

O grupo controle foi composto por 20 indivíduos de ambos os sexos, compreendidos na faixa etária de 2 a 74 anos de idade; o grupo dos pacientes, por sua vez, compreendeu 158 indivíduos de ambos os sexos com faixa etária no intervalo de 22 a 81 anos de idade.

Os dados foram organizados em duas classificações. Em um primeiro momento, eles foram separados em pacientes responsivos ao tratamento (aqueles que apresentaram redução em pelo menos 2 logs) e não responsivos (aqueles que não apresentaram redução de log satisfatória). Em um segundo momento, foram analisados 37 pacientes e a análise foi realizada baseada no score de Eutos, ou seja, pacientes em alto e baixo risco.

Na análise da expressão do gene *ABCA1* em comparação com o grupo controle, de acordo com o score de Eutos, pôde ser observado que houve expressão diferenciada significativa ($p= 0,03$) e que a expressão do gene no grupo controle foi maior que a expressão no grupo dos pacientes em baixo risco, conforme o gráfico 1. Quando comparada a expressão de *ABCA1* no grupo de alto risco e no grupo controle, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

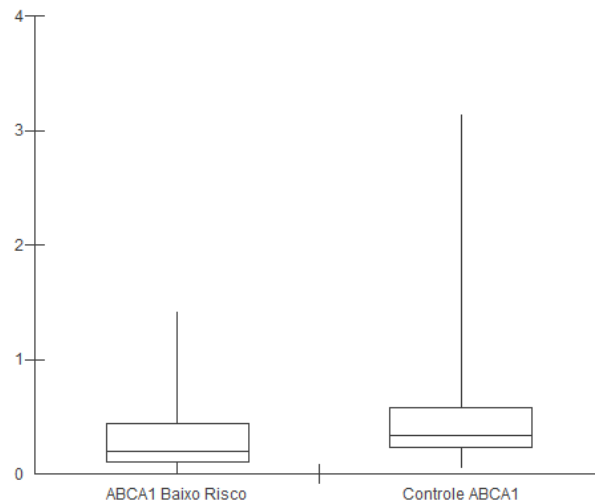


Gráfico 1. Expressão do gene *ABCA1* no grupo controle maior que em pacientes baseado no score de Eutos.

Na análise do gene *ABCG1*, o grupo de baixo risco também apresentou menor expressão do referido gene em comparação com o grupo controle ($p = 0,007$) conforme gráfico 2. O grupo considerado alto risco não obteve diferença estatística significativa ($p > 0,06$).

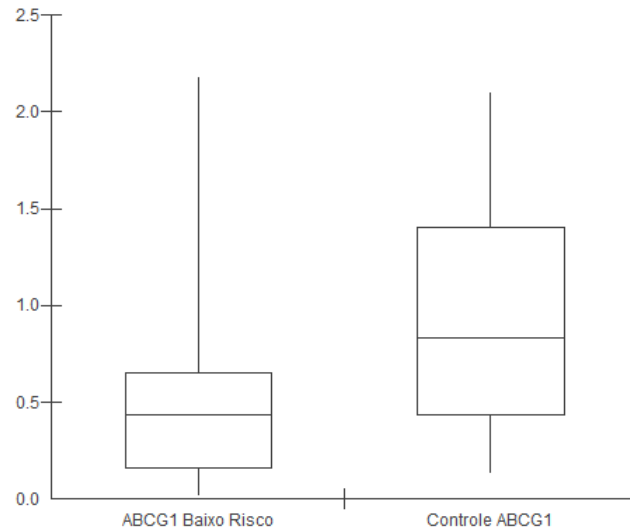


Gráfico 2. Expressão do gene *ABCG1* no grupo controle maior que em pacientes baseado no score de Eutos.

Ao analisar a expressão de *ABCA1* baseado na divisão entre responsivos e não responsivos, o grupo controle apresentou maior expressão em comparação com os pacientes não responsivos conforme gráfico 3. Quanto ao grupo dos responsivos, ocorreu o oposto: a expressão do gene neste grupo se deu maior quando comparado ao grupo controle conforme gráfico 4.

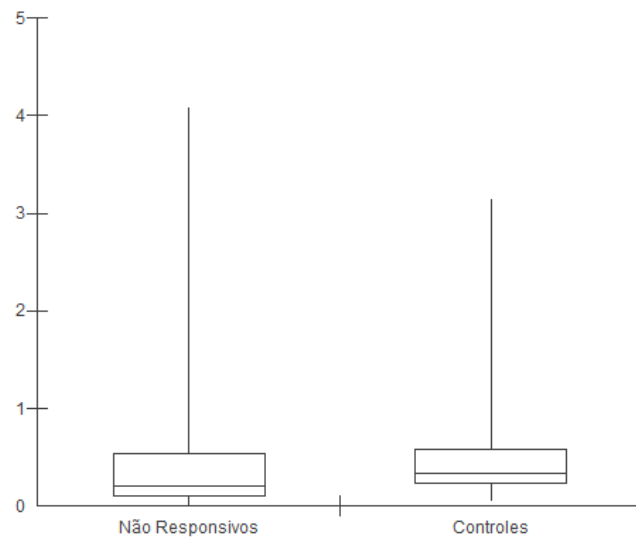


Gráfico 3. Expressão do gene *ABCA1* no grupo controle foi maior que em pacientes não responsivos.

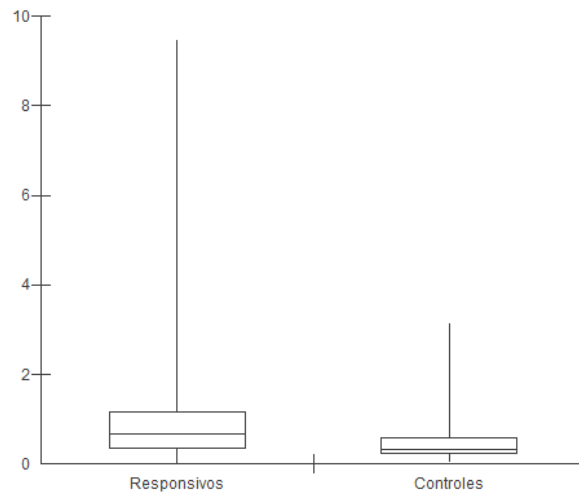


Gráfico 4. Expressão do gene *ABCA1* maior em pacientes responsivos que no grupo controle.

Na análise do gene *ABCG1*, não houve diferença estatística significativa na comparação entre não responsivos e grupo controle. No grupo dos pacientes responsivos, foi encontrado valor de $p = 0,00$ tendo este grupo maior expressão do gene *ABCG1* quando comparado com o grupo controle conforme gráfico 5.

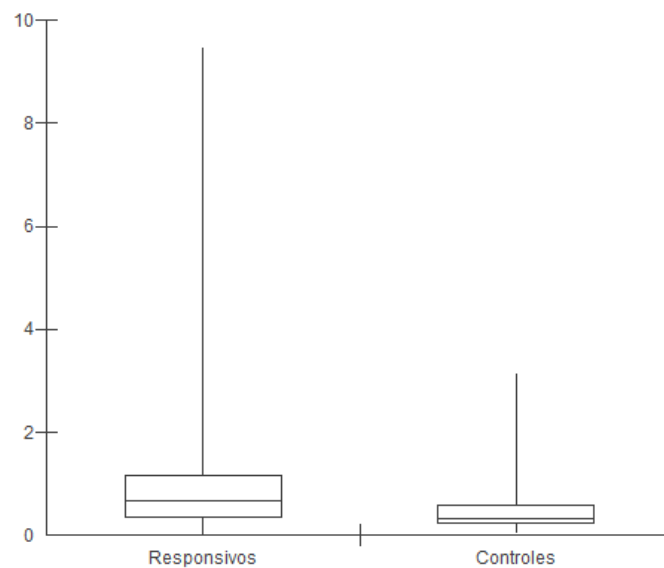


Gráfico 5. Expressão do gene *ABCG1* maior em pacientes responsivos que no grupo controle.

DISCUSSÃO

Não há na literatura nenhuma relação descrita entre *ABCA1* e/ou *ABCG1* e leucemia mieloide crônica. Sabe-se porém, que a família de transportadores ABC participa do processo de efluxo de drogas ^[34] e xenobióticos tais como drogas anti-neoplásicas. Este fenômeno de resistência é chamado de resistência a múltiplas drogas (MDR) ^[35].

Células cancerosas que possuem o fenótipo MDR podem tem resistência após ciclos de quimioterapia. O aumento ou diminuição de enzimas metabólicas, alterações da via apoptótica ou aumento da expressão de bombas de efluxo fazem parte dos vários mecanismos de resistência às drogas ^[36].

No presente estudo, *ABCA1* e *ABCG1* apresentaram menor expressão nos pacientes de baixo risco (aqueles que melhor responderam ao tratamento) em comparação com o grupo controle, o que poderia ser explicado pelo fato de que nesses pacientes a bomba de efluxo de drogas não estaria atuando ativamente e o tratamento nesse grupo tem sido eficaz, pois há resposta ao imatinibe.

Yvan-Charvet *et al.* ^[37] relataram uma nova função para o HDL em suprimir a proliferação de células progenitoras mieloides, porém essa teoria não se aplicaria nestes casos, pois a menor expressão dos genes implicaria em menor formação de partículas de HDL, logo, não haveria supressão de células progenitoras mieloides e os pacientes não estariam apresentando resposta ao tratamento.

Em contrapartida, ao dividir os pacientes em responsivos e não responsivos (baseados na redução de log), *ABCA1* apresentou menor expressão em pacientes não responsivos e maior expressão em responsivos, o que não poderia ser explicado pela atuação desses transportadores como bombas de efluxo e resistência a quimioterápicos, pois a menor expressão de *ABCA1* levaria a uma melhor resposta ao imatinibe (os pacientes seriam responsivos) assim como a maior expressão levaria à pior resposta (os pacientes seriam não responsivos).

Nesta situação, analisar a atuação do HDL como supressor de células progenitoras mieloides seria aplicável, pois aquele grupo com menor expressão está em pior resposta e o grupo com maior expressão está com melhor resposta. A maior e menor formação de partículas de HDL estaria intimamente relacionado nesses casos.

ABCG1 apresentou maior expressão naqueles pacientes que melhor respondem ao tratamento, o que também não poderia ser explicado pela atuação desses transportadores como bombas de efluxo, pois neste caso estariam adquirindo resistência ao imatinibe e a resposta ao tratamento seria falha. Ter o HDL como supressor das células progenitoras também seria aplicável nesta situação, uma vez que a maior expressão de *ABCG1* levaria à maior formação de HDL com conseqüente supressão mieloide e melhor resposta.

É importante salientar que o estudo foi realizado em amostras de sangue periférico, uma vez que as células jovens são encontradas em sangue periférico apenas nas fases mais avançadas da doença, o que está fora do perfil dos pacientes.

CONCLUSÕES

Os resultados podem ser analisados sob duas perspectivas. Uma se refere à ação de ABCA1 e ABCG1 como membros da família dos transportadores ABC's e seu papel no efluxo de drogas , o que pode ser aplicado na divisão dos pacientes segundo Eutos; e a outra perspectiva levando em consideração a descoberta recente do HDL como supressor de células tronco hematopoiéticas, aplicada na estratificação de acordo com a redução de log. Em ambos os casos, mas principalmente no segundo (devido ser uma descoberta recente), é passível de mais estudo pois em ambas as divisões houve grupos com resultados estatisticamente não significantes. Elucidar o papel desses genes na resposta ao tratamento com imatinibe é de extrema importância para que futuramente eles possam se tornar bons marcadores no monitoramento de pacientes com leucemia mieloide crônica.

REFERÊNCIAS

- ¹Bhamidipati PK, Kantarjian H, Cortes J, Cornelison AM, Jabbour E. Management of imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2013; **4** :103-117.
- ²Lee SJ. Chronic Myelogenous Leukaemia. *British Journal of Haematology* 2000; **1** : 993-1009.
- ³Vardiman JW. Leucemia mielóide crônica, BCR-ABL1 + . *Am J Clin Pathol* . 2009; **132** : 250-60.
- ⁴ Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. A biologia molecular da leucemia mielóide crônica. *Blood* 2000 ; **96** : 3343 – 3356.
- ⁵ Lucioni C, Iannazzo S, Mazzi S, Saporiti G, Chiroli S. Cost-effectiveness of ponatinib in chronic myeloid leukemia in Italy. *Global & Regional Health Technology Assessment* 2015; **2** : 1-16.
- ⁶ Cortes J, Kantarjian H. How I treat newly diagnosed chronic phase CML. *Blood* 2012; **120** : 1390-1397.
- ⁷ Baccarani M, Dreyling M. ESMO Guidelines Working Group Chronic myelogenous leukemia: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2009 ; **20** (Supl 4):105–107.
- ⁸ Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management. *American Journal of Hematology*. 2012 ; **87** : 1037-1045.
- ⁹ O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik G, Mori M, Balleisen S, Olson S, Magenis E, Capdeville R, Druker BJ. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. *Blood* 2002; **100** : 1628-1633.
- ¹⁰ Dulley, F.; Hamersschlack, N. Leucemia mielóide crônica. *Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (Abrale)* 2004, **25**:11-12.

- ¹¹ Bortolheiro TC, Chiattonne CS. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2008; **30** (supl.1): 3-7.
- ¹² Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Asserini CG, Guilhot F, Schiffer CA, Fischer T, Deininger MWN, Lennard AL, Hochhaus A, Ottmann OG, Gratwohl A, Baccarani M, Stone R, Tura S, Mahon FX, Reese SF, Gathmann I, Capdeville R, ; Kantarjian HM, Sawyers CL. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 2002; **99** : 1928-1937.
- ¹³ Jiang Q , Xu LP, Liu DH, Liu KY, Chen SS, Jiang B, Jiang H, Chen H, Chen YH, Han W, Zhang XH, Wang Y, Qin Y, Liu YR, Lai YY, Huang XJ. Imatinib mesylate versus allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients with chronic myelogenous leukemia in the accelerated phase. *Blood* 2011; **117** : 3032-3040.
- ¹⁴ Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ *et al.* Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2- phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 1996; **56** :100–104.
- ¹⁵ Pallotta R, Lima DF, Cal F, Almeida M, Conchon M. Tratamento da recidiva da leucemia mielóide crônica após transplante de medula óssea alogênico utilizando mesilato de imatinibe: relato de três casos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoterapia* 2006; **28** (suppl 2): 157-160.
- ¹⁶ Frazer R, Irvine AE, McMullin MF. Chronic myeloid leukaemia in the 21st Century. *Ulster Med. J.* 2007; **76** (supl1): 8-17.
- ¹⁷ O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen J, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ. Imatinib compared with interferon and low & dose cytarabine for newly diagnosed chronic & phase chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2003; **348** (supl 1): 994-1004.

- ¹⁸ Lopes NR, Abreu MTCL. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mieloide crônica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009, **31** : 1-4.
- ¹⁹ Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984; **63**: 789-799.
- ²⁰ Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood* 2011;**118** (supl3) : 686-692.
- ²¹ Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol* 2014; **89**: 547-556.
- ²² Rohrbacher, M. ; Hasford J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol* 2009; **22** : 295–302.
- ²³ Leukaemia Foundation. <http://www.leukaemia.org.au/blood-cancers/leukaemias/chronic-myeloid-leukaemia-cml>. Acesso em 01/05/2015 às 13:41 .
- ²⁴ American Cancer Society
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-041787.pdf>.
Acesso em 01/05/2015 às 14:35.
- ²⁵ INCA. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp> Acesso 01/05/2015 às 14:42.
- ²⁶ Dean M.; Hamon Y; Chimini GE. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Res.lipídicas* 2001 ; **42**: 1007-1017.
- ²⁷ Linsel-Nitschke P, Tall AR. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2005 ; **4** (3): 193-205.
- ²⁸ Forti M, Diament J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. *Arq. Bras. Cardiol.* 2006; **87** : 672-679.

- ²⁹ Macedo B, Fontes PR. Doença de tangier: a propósito de um caso clínico. *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna* 2010; **17**: 167-170.
- ³⁰ Dobiášová M, Frohlich J. Understanding the mechanism of LCAT reaction may help to explain high predictive value of LDL/HDL ratio. *Physiol. Res.* 1998; **47** : 387-397.
- ³¹ Leança CC, Passarelli M, Nakandakare ER, Quintão ECR. HDL: o yin-yang da doença cardiovascular. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2010; **54** : 777-784.
- ³² Moreira-Nunes CFA, Azevedo TCB, Francês LTVM, Sousa RGMA, Silva IT, Silva A, Silva Jr JR, Lemos JAR. Differentially expressed genes responsible for insensitivity of CD34+ cells to kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *BMC Proceedings* 2013 ; 7 (suppl 2) : O1.
- ³³ Lemos JAR, Oliveira CM, Scerne ACC, Bentes AQ, Beltrão AC, Bentes IRG, Azevedo TC, Pereira LMCM. Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Genetics and Molecular Research* 2005; **4** : 803-811.
- ³⁴ Jamie I. Fletcher, Michelle Haber, Michelle J. Henderson & Murray D. Norris. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer* 2010; **10**: 147-156.
- ³⁵ Sun YL, Patel A, Kumar P, Chen ZS. Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chin Cancer J.* 2012; **31** (2): 51-57.
- ³⁶ Shukla S, Ohnuma S, Ambudkar SV. Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Current Drug Targets.* 2011;**12**(5):621-630.
- ³⁷ Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, Welch, CL, Wang N, Randolph GJ, Snoeck, HW, Tall, AR. ATP binding Cassete Transporters and HDL Suppress Hematopoietic Stem Cell Proliferation. *Science* 2010; **25**:1689-1693.