

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANO SANTOS RAMOS

ANÁLISE DO POLIMORFISMO *CYP3A4*1B* EM PACIENTES
PORTADORES DE LMC TRATADOS COM MESILATO DE IMATINIBE

CURITIBA, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANO SANTOS RAMOS

ANÁLISE DO POLIMORFISMO *CYP3A4*1B* EM PACIENTES
PORTADORES DE LMC TRATADOS COM MESILATO DE IMATINIBE

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Genética como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora – Prof^a Dr^a Enilze Maria de Souza F. Ribeiro
Co-Orientador - Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

CURITIBA, 2010

Dedico este trabalho aos meus pais que muito fizeram pela minha felicidade e que, certamente, hoje esta felicidade é nossa. A estes, que não me deram somente a vida, mas também um lugar nas suas vidas dedico este trabalho como recompensa pelas ausências.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pelo privilégio concedido, e pelas bênçãos que Suas mãos derramam sobre nós todos os dias.
- Agradeço aos meus pais que lutaram comigo nos momentos mais difíceis, nunca me deixando desistir e sempre sendo o foco principal para superar todas as dificuldades. Que neste trabalho se reflita a dedicação, o respeito, o carinho e o amor que sempre os tive e sempre os terei. Por que deles são minhas vitórias.
- Agradeço aos meus amigos de Lapa, Leandro, Maurício, Júlio, Irene, os quais a vida nos deixou fisicamente distantes, mas a amizade sempre nos tornará unidos.
- Agradeço a Universidade Federal do Paraná que me propiciou a melhor fase da minha vida, desde o momento da aprovação no vestibular até o final desse curso. Sem esta instituição não poderia sair de onde saí, nem chegar, onde para muitos é o quintal de casa, para mim a poucos era só um sonho de infância.
- Agradeço aos companheiros desta viagem, os quais tornaram extremamente agradáveis os dias na faculdade. Especificando os verdadeiros amigos eis que agradeço à Carol (Ana) pelos momentos risonhos, pelos momentos de confiança, pelas companhias no almoço; à Maria Rosa pelas longas histórias de viagens, pela voz discreta, e por tentar me enganar tantas vezes (e tenho dito, todas em vão); agradeço ao Marcos, um dos caras que sem sombra de dúvidas foi e sempre será o melhor amigo que já tive, que me fez crescer como pessoa, e sempre esteve presente de uma forma que jamais esperei que a distância pudesse fazer. Como um todo agradeço a estes que fizeram parte desta etapa da minha vida e que sempre poderão contar comigo não importando para que, nem por que.
- Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, pelo dia agradável e pelo acolhimento. Agradeço ao Marcos e a Sarah pelo auxílio com as técnicas e as horas de conversa no laboratório.
- Agradeço a Prof^a Enilze por ter acreditado e me dado a oportunidade de desenvolver este projeto, mesmo sem me conhecer direito. Agradeço também ao Prof. Iglénir por toda a paciência com os cálculos e a disposição a ensinar que lhe é característica. Aos meus orientadores que me mostraram o verdadeiro prazer da ciência e por serem grandes exemplos de caráter e profissionalismo.
- E por fim, e não menos importante agradeço a uma grande amiga, que se fez a melhor companheira nesses quase dois anos de convivência. Agradeço a minha

namorada Fernanda que foi meu porto seguro e sempre me estendeu a mão nos momentos mais críticos, foi paciente em um nível absurdo para quem conviveu com uma pessoa como eu. Agradeço por ter permanecido ao meu lado e suportado minhas crises, e quando nada parecia dar certo sempre vinha me apoiar. Obrigado por todo o amor que me dedicou e que espero, e serei, muito mais do que recíproco.

“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando... Porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive, já morreu...”

Luiz Fernando Veríssimo

RESUMO

As leucemias são doenças malignas que acometem os glóbulos brancos (leucócitos) do sangue. Dentre os diversos tipos de leucemias, a leucemia mielóide crônica (LMC) é sem dúvida a mais estudada e bem conhecida, seja pela presença do cromossomo *Philadelphia* (*Ph+*) que a caracteriza e que revolucionou a oncogenética, seja pelos métodos terapêuticos inovadores desenvolvidos na busca de eliminar a proteína BCR-ABL codificada a partir do rearranjo *BCR-ABL*. O Mesilato de Imatinibe (MI) é, atualmente, o quimioterápico mais utilizado na eliminação do *Ph+*, e age competindo pelo receptor da BCR-ABL dependente de ATP inibindo a fosforilação da tirosina quinase. O MI é principalmente metabolizado pela enzima CYP3A4 e os polimorfismos encontrados nela podem prejudicar a eficácia do tratamento. Este trabalho foi desenvolvido para avaliar a possível relação do polimorfismo *CYP3A*1B* com a eficácia do tratamento em pacientes com LMC, através do acompanhamento da resposta citogenética. A amostra foi composta por 22 pacientes com LMC que estavam sendo tratados com MI e seus respectivos controles, pareados por sexo, etnia e faixa etária (± 10 anos). Foram utilizadas amostras de medula óssea de pacientes e sangue periférico de controles e o DNA foi extraído pelo método de *salting-out*. Os polimorfismos foram analisados através da técnica de PCR-RFLP. A média de idade entre os pacientes foi de $49,07 \pm 10,32$ e dos controles foi de $47,71 \pm 10,22$, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($t = 0,0048$; $P > 0,90$). O estudo da relação entre tempo de tratamento e frequência do biomarcador *Ph+* mostrou uma relação inversa entre as duas variáveis ($b = -0,79$; $t = 0,967$, $0,40 > P > 0,30$) confirmando o esperado para este tipo de tratamento. Não foram encontrados valores significativos para associação entre o genótipo de risco e a porcentagem de *Ph+* em função do tempo de tratamento para os períodos 1 a 12 meses ($t = 0,10$; $P > 0,90$) ou para período acima de 12 meses ($t = 1,26$; $P > 0,40$). Porém, a análise das médias mostrou um pior prognóstico para os indivíduos com genótipo homozigoto selvagem (GG). Os resultados da regressão mostram que os valores de *b*, mesmo sendo negativos, são diferentes apesar de não significativos, provavelmente devido ao baixo número amostral. Estes resultados mostram que pode haver uma associação entre polimorfismo de *CYP3A4* e deficiência na resposta ao tratamento com MI, porém sem uma confirmação estatística em função do tamanho da amostra estudada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22; t (9;22)(q34;q11)	05
Figura 2: Padrão de bandas do gene <i>CYP3A4</i> após reação de PCR.....	20
Figura 3: Padrão de bandas do gene <i>CYP3A4*1B</i> para PCR-RFLP.....	21

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: RNA iniciadores (<i>Primers</i>) utilizados para a reação de PCR-RFLP do gene <i>CYP3A4*1B</i>	19
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado da análise de OR entre os grupos controle e paciente.....	27
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: A –Relação entre a porcentagem de cromossomo <i>Ph</i> ⁺ e tempo de tratamento com MI em 22 pacientes com LMC. B - Duração do tratamento dividido em três categorias: 0 = pacientes com tempo zero de tratamento, 1 a 12 = pacientes com 1 a 12 meses de tratamento, e >12 = pacientes com mais de 12 meses de tratamento.....	24
Gráfico 2: Ausência ou presença do genótipo de risco para o gene <i>CYP3A4*1B</i> em pacientes e controles.....	25
Gráfico 3: Presença ou ausência de heterozigose, nos grupos de estudo e controle.....	26
Gráfico 4: Presença ou ausência de homozigose para o alelo mutante nos grupos controle e paciente.....	26
Gráfico 5: Efeito da interação genótipo e duração do tratamento, sobre o percentual de cromossomo <i>Ph</i> ⁺	28

Gráfico 6. Regressão linear dos genótipos selvagem ($b = -0,318$) e mutante ($b = -0,377$) mostrando uma diferença entre os genótipos no ângulo de inclinação das retas.....28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	02
2.1 GERAIS.....	02
2.2 ESPECÍFICOS.....	02
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
3.1 LEUCEMIAS.....	03
3.1.1 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA.....	04
3.1.2 FASES DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA.....	06
3.1.3 ETIOLOGIA.....	07
3.1.4 CROMOSSOMO <i>PHILADELPHIA</i> (<i>Ph</i> +).....	08
3.1.5 O GENE HÍBRIDO <i>BCR-ABL</i>	08
3.1.6 VIAS ATIVADAS PELA PROTEÍNA <i>BCR-ABL</i>	09
3.1.7 O TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA.....	11
3.1.8 MESILATO DE IMATINIBE.....	12
3.1.9 MECANISMO DE AÇÃO.....	13
3.1.10 EFEITOS COLATERAIS.....	14
3.1.11 RESISTÊNCIA AO MI.....	14
3.1.12 METABOLISMO DO MI.....	15
3.1.13 <i>CYP3A4*1B</i> ou <i>CYP3A4-V</i>	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 AMOSTRA.....	17
4.2 PROCEDIMENTOS.....	17
4.3 REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO E RESTRIÇÃO DO GENE <i>CYP3A4</i>	18
4.4 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.....	21
5. RESULTADOS.....	23
5.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	23
5.2 RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE TRATAMENTO E FREQUÊNCIA DO BIOMARCADOR CROMOSSOMO <i>PHILADELPHIA</i> (<i>Ph</i> +).....	24
5.3 ESTUDOS DE OR - <i>ODDS RATIO</i>	25
5.4 INTERAÇÃO TEMPO DE TRATAMENTO VS. GENÓTIPO VS. PERCENTUAL DE CROMOSSOMO <i>Ph</i> +.....	27

6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÕES.....	31
8. REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo que designa várias doenças que apresentam em comum o descontrole do ciclo celular levando ao crescimento desordenado das células e capacidade de invasão de tecidos adjacentes ou à distância (metástases). É uma doença evidentemente genética, de caráter multifatorial, com mutações em pontos específicos do DNA. Fatores ambientais, hábitos alimentares, exposição à carcinógenos e fatores intrínsecos ao genoma de cada indivíduo estão inter-relacionados ao surgimento de neoplasias.

Estudos que analisam os polimorfismos genéticos têm sido grandes instrumentos para aumentar o conhecimento sobre o câncer, permitindo a identificação de biomarcadores como, por exemplo, de subgrupos de populações que podem apresentar um genótipo de risco com maiores chances de desenvolver câncer (marcadores de suscetibilidade) ou diferentes padrões de resposta aos diversos tratamentos utilizados (marcadores de resposta).

As leucemias mielóides crônicas pertencem a um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por infiltração do sangue, da medula óssea e de outros tecidos por células neoplásicas do sistema hematopoiético. Caracterizada pelo seu biomarcador cromossomo *Philadelphia (Ph+)*, sendo o produto protéico deste rearranjo o principal alvo para os tratamentos quimioterápicos, tendo, atualmente, como fármaco principal o Mesilato de Imatinibe (MI).

O estudo da farmacocinética é um importante recurso para obtenção de conhecimento a fim de melhorar o prognóstico dos pacientes que passam por processos quimioterápicos, podendo até mesmo minimizar o tempo de exposição a tais terapias, que em sua maioria são extremamente agressivas, ou vincular técnicas mais apropriadas dependendo de cada paciente.

Neste trabalho será avaliada a resposta terapêutica ao MI em função da presença do polimorfismo *CYP3A4*1B* através de um estudo do tipo caso-controle e com a utilização da técnica de PCR-RFLP.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL:

- Analisar, em portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) tratados com Mesilato de Imatinibe, a associação entre a variante do gene *CYP3A4* e a resposta citogenética ao Mesilato de Imatinibe.

2.1.1 ESPECÍFICOS:

- Estimar as frequências gênicas e genotípicas do alelo *CYP3A4*1B* nos pacientes e controles.

- Avaliar a presença ou ausência de associação entre as variantes polimórficas e a resposta citogenética, em função do tempo de tratamento com Mesilato de Imatinibe.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEUCEMIAS

Leucemias são doenças mieloproliferativas onde a desordem de linhagens celulares medulares resulta em hiperplasia de células blásticas, granulócitos, eritrócitos ou trombócitos. O termo leucemia inclui as neoplasias de todas as linhagens celulares hematopoiéticas onde ocorre uma invasão massiva do sangue, medula óssea, baço, fígado e linfonodos, com gradual substituição das células hemolinfopoiéticas normais (BABA e CÂTOI, 2007). A intensa substituição das células normais do sangue por células anormais na medula óssea é a principal característica da leucemia.

A estimativa de novos casos de leucemias, para o ano de 2010, feita pelo INCA – Instituto Nacional do Câncer – é de 9580 casos para todo o Brasil. Segundo o mesmo órgão, para cada 100.000 homens ocorrerá uma taxa bruta de 6,56 novos casos, e 5,39 para o mesmo número de mulheres dentro do Estado do Paraná.

As leucemias são divididas em linfóide e mielóide as quais podem ser agudas ou crônicas. Os termos linfóide e mielóide referem-se ao tipo de linhagem celular envolvida, enquanto aguda ou crônica referem-se ao grau de diferenciação da célula. Desta forma temos: Leucemias Mielóides Agudas (LMA) e Crônicas (LMC) e Leucemias Linfóides Agudas (LLA) e Crônicas (LLC).

As linhagens leucêmicas com desenvolvimento agudo possuem uma manifestação e evolução rápida das células imaturas do sangue, e acometem crianças, jovens e adultos. O tratamento deve ser iniciado imediatamente após o seu diagnóstico devido à progressão e o acúmulo de células anormais que invadem a circulação sanguínea ocorrerem de forma extremamente rápida, podendo haver invasão de outros órgãos. Essas células são chamadas de “linfoblastos” e “mieloblastos” e não permitem a multiplicação de células normais da medula óssea. Por sua vez, leucemias crônicas possuem um aumento de células maduras, porém anormais. Diferentemente das agudas, é caracteristicamente insidiosa, tendo uma progressão lenta podendo durar de meses a anos, geralmente acometendo pessoas de faixas etárias mais elevadas.

3.1.1 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é caracterizada pela superprodução neoplásica clonal de células hematopoiéticas maduras ou bem-diferenciadas. A morfologia da medula óssea é caracterizada pela hiperplasia de granulócitos e megacariócitos. Ao contrário do que acontece em leucemia agudas, a maturação se dá de modo ordenado nas diferentes linhagens linfocíticas, sem qualquer restrição ou bloqueio da maturação celular (HEIM e MITELMAN, 1995).

É responsável por 15% a 20% de todas as leucemias, acometendo um a dois casos entre 100.000 habitantes por ano dentro da população ocidental (FADERL *et al.* 1999). A LMC é mais comum em pessoas entre 45 e 55 anos de idade, porém pode aparecer em todas as faixas etárias.

Casos de pacientes com sintomas semelhantes aos da LMC são descritos na literatura francesa desde 1825, porém as primeiras descrições científicas desta doença são creditadas a Donné em Paris (1844), Virchow na Alemanha (1845) e Craigie e Bennet em Edimburgo (1845) (CHOPRA e ELEFANTY, 1999; DEININGER, 2008). Em 1878, Neumann propôs que a medula óssea não era apenas o sítio de produção de células sanguíneas normais, mas também o sítio no qual a leucemia tinha sua origem e utilizou o termo *myelogene leukemia* (GEARY, 2000).

Embora a LMC já fosse considerada uma forma distinta de leucemia em meados do século XIX, avanços no entendimento desta malignidade só foram possíveis a partir de 1960 através da descoberta de Nowell e Hungerford, que descreveram pela primeira vez uma anormalidade cromossômica associada a uma neoplasia em humanos, quando verificaram uma pequena irregularidade em um cromossomo de células leucêmicas de pacientes com LMC (HEIM e MITELMAN, 1995). Eles observaram que estes pacientes possuíam uma aparente perda do braço longo do cromossomo 22. Esta anormalidade ficou conhecida como cromossomo *Philadelphia (Ph)*, em homenagem a cidade onde foi descoberta (NOWELL e HUNGERFORD, 1960), e pode ser encontrada na linhagem celular mielóide maligna de 95% dos pacientes com LMC (FADERL *et al.* 1999). Esta observação firmou-se como um marcador eficiente para o diagnóstico e a principal característica da Leucemia Mielóide Crônica.

Em 1967, Philip Fialkow, baseado em experimentos com polimorfismos da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD), estabeleceu a clonalidade da LMC

(TEFFERI, 2007). Posteriormente à descoberta de Nowell e Hungerford, os pesquisadores da época acreditavam que a perda ocorrida no braço longo do cromossomo 22 era em função de uma deleção. Rowley demonstrou que a origem do cromossomo *Ph* não era uma deleção, e sim uma translocação recíproca do material cromossômico do 22 para a parte terminal do braço longo do cromossomo 9 e vice-versa, ficando assim caracterizada como t(9;22) (ROWLEY, 1973). Logo, a anormalidade cromossômica característica da LMC é uma translocação recíproca entre a região q34 do cromossomo 9 e a região q11 do cromossomo 22 sendo descrita como t(9;22)(q34;q11) (Figura 1). No cromossomo 22, a quebra ocorre dentro do gene *BCR* e no cromossomo 9 ocorre dentro do gene *ABL*; resultando em dois cromossomos derivativos.

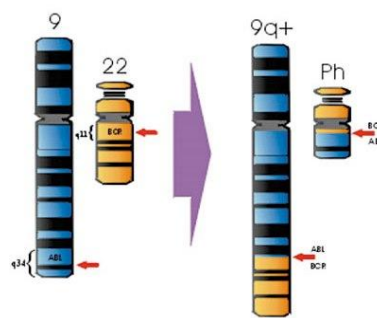


Figura 1 - Translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22; t (9;22) (q34;q11) (fonte: <http://www.unesp.br/prope/projtecn/Saude/saude48a.htm>).

Uma das consequências desta translocação é a formação do cromossomo 9q+, que contém a parte proximal do gene *ABL* justaposta à parte mais distal do gene *BCR*, formando o gene quimérico (*ABL-BCR*), cujo produto gênico é expresso em níveis muito baixos na metade ou em dois terços dos indivíduos com LMC. A outra é a formação do cromossomo *Philadelphia*, que apresenta o centrômero do 22 e a região proximal do gene *BCR* justaposta à região distal do gene *ABL*, formando o outro gene quimérico *BCR-ABL*. Este é regulado pela região promotora do gene *BCR*, já que seus dois componentes se encontram alinhados com uma sequência de leitura contínua, permitindo a formação de um transcrito (RNA mensageiro) que codifica para uma proteína de fusão com propriedades de tirosina-quinase, responsável pela transformação maligna (ROCHA *et al.*, 2006). Esta proteína híbrida de 210-kDa (diferente da normal que possui 145-kDa) com atividade tirosina-quinase aumentada, é necessária e suficiente para a atividade oncogênica da fase inicial da LMC (DALEY *et al.*, 1990; PASTERNAK *et al.*, 1998; FADERL *et al.*, 1999; GORDON *et al.*, 1999; GOLDMAN, 2004). A habilidade da proteína quimérica *BCR-ABL* em transformar células mielóides primárias

em leucêmicas foi evidenciada pela primeira vez por Daley em 1990, quando observou uma doença semelhante à LMC induzida pela atividade da proteína híbrida em camundongos (DALEY *et al.*, 1990).

Em 5% a 10% de todos os casos de LMC, o *Ph*, citogeneticamente, não ocorre através da t(9;22) regular, mas de translocações entre o 22 e outros cromossomos que não o 9. Na mesma faixa percentual, o cromossomo *Ph* não é encontrado em pacientes com LMC. Estudos moleculares, entretanto, mostraram haver a fusão *BCR-ABL* na grande maioria destes casos. Outra característica citogenética, é que entre 75% a 80 % dos pacientes desenvolvem aberrações cromossômicas adicionais quando ocorre a progressão da doença (HEIM e MITELMAN, 1995).

3.1.2 FASES DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

A LMC possui três fases bem distintas que se inicia com a fase crônica, que posteriormente evolui para a fase acelerada, tendo ao fim desta a última fase chamada de crise blástica. Cada fase tem características que estão descritas abaixo:

- **FASE CRÔNICA** – É a fase que principia a doença e onde ocorre o diagnóstico de até 80% dos casos (CORTES, 2004). Normalmente é uma fase assintomática ou o paciente apresenta fadiga leve, porém constante. Durante essa fase ocorre uma intensa expansão clonal de células mielóides, as quais ainda mantêm a capacidade de diferenciação e suas funções ainda serão normais. Clinicamente, apresenta leucocitose ($>100.000/\mu\text{l}$) com contínua transformação para mieloblastos, assim como esplenomegalia. A fase crônica normalmente responde bem aos tratamentos quimioterápicos. Porém, em torno de quatro a cinco anos desta fase os clones perdem a capacidade de células normais e evoluem para outra fase chamada de fase acelerada ou de aceleração. Sem o tratamento adequado a sobrevida do paciente é de 35 a 65 meses (HEHLMANN *et al.*, 1993).

- **FASE ACELERADA** – Caracteriza-se pelo surgimento de células mais imaturas no sangue periférico, sintomas constitucionais mais frequentes e uma resposta menos favorável a terapias (DEININGER e DRUKER, 2003). É uma transição gradual da fase acelerada para a crise blástica com uma duração de 3 a 18 meses. Cerca de 20% dos pacientes são diagnosticados nesta fase da LMC. A evolução clonal é um critério comum para a fase acelerada presente em 20% a 40% dos pacientes. As anormalidades

cromossômicas mais comuns em função dessa evolução são: trissomia do 8, um segundo cromossomo *Ph*, trissomia do 19, perda do cromossomo Y, trissomia do 21, e monossomia do 7 (JOHANSSON *et al.*, 2002). O hemograma desta fase demonstra um aumento considerável no número de mieloblastos, basófilos e eosinófilos. A sobrevida dos pacientes que se encontram em fase crônica é de um a dois anos (CORTES, 2004).

- **FASE DE CRISE BLÁSTICA** – É a fase final da LMC. Neste período a doença progride inexoravelmente para uma leucemia aguda, e torna-se incrivelmente resistente a quimioterápicos (CORTES, 2004). Apenas 20% a 30% dos pacientes com LMC em crise blástica respondem à indução de medicamentos. Esta fase é caracterizada pela presença superior a 30% de blastos na medula óssea ou no sangue periférico, e ainda a presença da doença blástica extramedular (FADERL *et al.* 1999). Este extravasamento é denominado de *cloroma* ou *sarcoma granulocítico*. Na fase blástica os pacientes apresentam uma sobrevida média de três a nove meses (CORTES, 2004).

3.1.3 ETIOLOGIA

Estudos mostram que populações que sofreram exposições a altas doses de radiações ionizantes possuem uma incidência de casos de LMC elevada em relação à esperada em populações sem tal exposição. Isto foi observado nos indivíduos pertencentes às cidades de Hiroshima e Nagasaki, no Japão, as quais sofreram exposição à radiação através de bombas atômicas durante a Segunda Guerra Mundial (GEARY, 2000).

Terapias feitas com agentes alquilantes em pessoas com câncer de colo uterino aumentam a incidência desta patologia, porém a LMC não é uma leucemia secundária frequente após o tratamento de outros cânceres com radiação e/ou agentes alquilantes.

Inibidores de DNA topoisomerase II têm demonstrado uma propensão para induzir leucemia t(9;22) – positivas (LICHTAMN *et al.*, 2006). Dois trabalhos sugeriram que a distância física nuclear entre os genes *BCR* e *ABL* em linfócitos humanos (KOZUBEK *et al.*, 1997) e em células *CD34+* (NEVES *et al.*, 1999) é menor do que se acreditava e tal proximidade poderia favorecer a fusão entre os genes. Porém, o fato de existir a translocação *BCR-ABL* em células hematopoiética não caracteriza que o paciente possua LMC, uma vez que esse tipo de translocação já foi

detectado em outros tipos de leucemias e também em pessoas saudáveis (BOSE *et al.*, 1998).

3.1.4 CROMOSSOMO PHILADELPHIA (*Ph*⁺)

O cromossomo que recebe o nome da cidade onde foi descoberto é credenciado aos pesquisadores Nowell e Hungerford (1960) que o encontraram em células cultivadas a partir de sangue periférico de sete pacientes com LMC (NOWELL e HUNGERFORD, 1960). Inicialmente, o cromossomo foi chamado de *Ph*¹ porque os pesquisadores da época acreditavam que este seria o primeiro de uma série de cromossomo anormais que seriam descobertos em outros tipos de leucemia. Entretanto, por mais de uma década, o *Philadelphia* foi o único cromossomo anormal relacionado a uma neoplasia específica (GEARY, 2000).

Depois que os trabalhos de Janet Rowley sugeriram que a imaginada deleção do cromossomo 22 era na verdade uma translocação recíproca entre 9 e 22 (ROWLEY, 1973), as evidências se confirmaram no ano de 1982 quando foi demonstrado que o cromossomo *Ph* representava, em nível gênico, a transposição do oncogene *c-ABL* de sua posição normal do cromossomo 9q34 para o cromossomo 22q11, em uma região de DNA, de 5 a 6 kb, chamada de *breakpoint cluster region (BCR)* (DE KLEIN *et al.*, 1982) que posteriormente deu nome ao gene. Posteriormente, técnicas de sincronização e bandeamento de alta resolução permitiram a identificação dos “pontos de quebra” cromossômicos com descrição correta de bandas e sub-bandas. Assim o cromossomo *Ph* ficou caracterizado como t(9;22)(q34.1;q11.21) (SAWYERS, 1999).

3.1.5 O GENE HÍBRIDO *BCR-ABL*

Este gene é oriundo da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, a qual também gera outro gene chamado de *ABL-BCR*. O gene normal *BCR*, encontrado no braço longo de cromossomo 22, codifica uma proteína de 160 kDa que é constitutivamente expressa em vários tipos celulares, mas é mais intensivamente expressa em células hematopoiéticas (RANDOLPH, 2005), e sua estrutura sugere seu envolvimento na transdução de sinal.

O outro gene constituinte, gene *ABL*, é o homólogo humano do oncogene *v-abl* Abelson da leucemia murina (*A-MuLV*) com 230 kb de comprimento e encontra-se no braço longo do cromossomo 9. Este gene codifica uma proteína nuclear de 145 kDa,

denominada p145, que possui atividade de tirosina quinase e está envolvida com a regulação do ciclo celular e apoptose, resposta a estresses genotóxicos e transmissão de informações sobre o ambiente celular. Este gene possui diferentes domínios como *SH1*, *SH2* e *SH3*, sendo o domínio *SH1* responsável pela atividade quinase da proteína que pode ser regulada pela porção amino-terminal do domínio *SH3* (VAN ETTEN, 1999). O gene *ABL* normal é também considerado um gene supressor de tumor em função da porção nuclear da proteína *ABL* ter um importante papel na inibição do ciclo celular (SAWYER *et al.*, 1994).

O gene híbrido *BCR-ABL* codifica uma proteína aberrante com atividade tirosina quinase aberrante de alto peso molecular, maior do que a codificada pelo gene *ABL* (BAIN, 2002). Esta enzima confere à célula leucêmica uma alta resistência à morte celular independentemente do agente indutor deste processo (HAMÚ *et al.*, 2007).

3.1.6 VIAS ATIVADAS PELA PROTEÍNA *BCR-ABL*

A atividade excessiva da tirosina quinase codificada pelo gene híbrido *BCR-ABL* é responsável por ativar várias vias de sinais transduccionais, tais como: ativação via RAS, via recrutamento de STAT, ativação de PI(3)K/AKT. A *BCR-ABL* também induz expressão de proteínas anti-apoptóticas mitocondriais, tipo BCLx (GOLDMAN E MELO, 2003; SATTLER E GRIFFIN, 2003).

1. **ATIVACÃO VIA RAS:** a expressão constitutiva de *BCR-ABL* resulta em um acúmulo da forma ativa de RAS, a RAS-GTP (CORTEZ *et al.*, 1995). Depois de induzidas, as proteínas RAS ativam a RAF serina/treonina quinase que então fosforila as quinases MAPK. Estas, enfim, ativam MAPKs que migram para o núcleo onde fosforilam e ativam fatores de transcrição nuclear. Esta cascata modula a proliferação celular regulando a atividade de várias proteínas reguladoras de ciclo celular e fatores de transcrição (RAVANDI *et al.*, 2003).
2. **ATIVACÃO VIA STAT:** proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STATs) que são ativadas por várias citocinas com ação sobre células hematopoiéticas e fatores de crescimento. Regulam o ciclo celular, apoptose e proliferação de diferentes células através da influência na transcrição de genes (BOWMAN *et al.*, 2000). Devido à

ativação constitutiva das STATs em algumas doenças onco-hematológicas, estas parecem desempenhar função importante na leucemogênese (BASKIEWICZ-MASIUK e MACHALINSKI, 2004). As principais STATs envolvidas na LMC são a STAT3 e STAT5 sendo que a ativação constitutiva da primeira inibe a diferenciação celular (COPPO *et al.*, 2006). A STAT5 parece ter uma função mais importante na proliferação celular, porém também está envolvida na apoptose de células blásticas (BASKIEWICZ-MASIUK e MACHALINSKI, 2004).

3. **ATIVACÃO VIA PI(3)K/AKT:** esta via é mediada pela proteína BCR-ABL e possui importante função no mecanismo anti-apoptótico. A BCR-ABL ativando a PI(3)K fará com que esta fosforile fosfoinositóis, o que gerará fosfolipídios. Estes fazem com que a AKT mude de posição, translocando-se do citoplasma para a parte interna da membrana plasmática. Devido a sua nova posição, a AKT ficará próxima de quinases regulatórias que irão ativá-la. Sua atividade regulará os mecanismos anti-apoptóticos fosforilando diretamente componentes que atuam na ativação/inibição da apoptose (DATTA *et al.*, 1999).

3.1.7 O TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Os primeiros relatos de tratamento da LMC mostram que estes eram meramente paliativos, e consistiam na administração de quinino e ferro ao paciente sem ser obtido qualquer resultado (GEARY, 2000). Uma resposta positiva do paciente foi observada somente em 1865 quando Lissauer, médico alemão, administrou a solução de Fowler (solução de trióxido de arsênico a 1%) em um paciente de LMC, pela primeira vez. O arsênico foi introduzido na medicina por Thomas Fowler em 1786, o qual era usado para febres, dores de cabeça, e também como tônico. A resposta encontrada por Lissauer foi uma redução do baço, bem como da anemia e da contagem de leucócitos. Devido o arsênico ser altamente absorvido pelo organismo, seu nível de toxicidade também se tornava alto.

Somente em 1903 com o advento da radioterapia por Nicholas Senn (EUA) é que o arsênico deixou de ser utilizado no tratamento da LMC. Esta nova técnica mostrou-se eficaz, pois a redução do baço e da contagem dos leucócitos era significativa e rápida, bem como o restabelecimento da saúde do paciente durando de semanas a anos. Porém, com estudos que faziam o acompanhamento do paciente por um período longo ficou evidenciado que o processo fundamental da doença não era afetado, nem mesmo a expectativa de vida dos pacientes era aumentada com o tratamento radioterápico (GEARY, 2000).

No ano de 1912, médicos alemães incorporaram o benzeno, conjuntamente com a radioterapia, ao tratamento de pacientes com LMC, porém não obtiveram um êxito maior. Somente no ano de 1947 é que a primeira droga citotóxica foi utilizada no tratamento da LMC, mostrando uma grande redução no número de leucócitos, mas sem uma significativa melhora na sobrevida dos pacientes (GEARY, 2000). A droga em questão era a mostarda nitrogenada, e havia sido produzida na época da Segunda Guerra Mundial.

A primeira droga eficaz no controle da LMC foi o Bussulfano (BU) em 1953, mostrando maior especificidade ao tecido hematopoiético e particularmente à série granulocítica. O BU possui certa toxicidade para o tecido germinativo e pode desencadear uma fibrose pulmonar, porém mostrou um controle relativamente melhor na LMC do que a radioterapia e só foi substituído na década de 70 por uma droga que

possui uma toxicidade menor, o alfa-interferon ou INF- α (OSAROGIAGBON e MC GLAVE, 1999).

Estudos mostraram que o interferon possui um importante controle na proliferação celular e na modulação do sistema imune. O mecanismo de ação do α -interferon não é totalmente esclarecido, mas parece promover o controle da proliferação de células malignas, modulação da apoptose, e em células hematopoiéticas precursoras pode inibir o crescimento clonal, como citado no trabalho de Faderl *et al.* (1999). O α -interferon recombinante foi produzido no ano de 1980, sendo pioneiramente utilizado em pacientes com LMC em fase crônica por Talpaz e colaboradores. A droga mostrou que era capaz de induzir a negatividade do cromossomo *Ph* e prolongar a sobrevivência da maioria dos pacientes com ela tratados (TEFFERI, 2007).

Até a década de 80, a LMC era uma doença que através de tratamento poderia ser controlada, mas sem cura e sendo invariavelmente fatal. O método que veio trazer uma expectativa de cura aos pacientes que eram diagnosticados como portadores da LMC, foi introduzido por Goldman no ano de 1986. O transplante de medula óssea alogênico é considerado até hoje o único método curativo para a LMC, porém nem todos os portadores dessa doença podem ser submetidos a tal procedimento. A necessidade de histocompatibilidade (compatibilidade entre antígenos sanguíneos) entre doador e receptor é pré-requisito fundamental para que o transplante tenha êxito total. Porém, devido à grande miscigenação encontrada no Brasil, estima-se que a probabilidade do encontro de um doador em bancos de medula seja de 1/300.000 doadores brasileiros, e esse número é muito inferior nos bancos de medula óssea internacionais. Essa probabilidade aumenta quando a relação é feita entre irmãos (mesmo pai e mesma mãe), mas não ultrapassa 30% dos casos de pacientes portadores da LMC. A idade avançada da maioria dos pacientes no momento do diagnóstico, em geral superior a 45 anos, está associada ao risco de morte aumentado devido à toxicidade do transplante de medula óssea (GRATWOHL *et al.*, 1993).

3.1.8 MESILATO DE IMATINIBE

Estudos demonstraram que o gene híbrido *BCR-ABL* atua como um oncogene leucêmico, e funciona como um codificador natural de tirosina quinase, sendo que a sua proteína quimérica tem uma atividade essencial para as transformações celulares. A

proteína oriunda do *BCR-ABL* cataliza a transferência de ATP (adenosina trinucleotídeo fosfato) para resíduos de tirosina de outras proteínas que quando fosforiladas induzem as mudanças fenotípicas características da LMC. Logo, se essa ligação entre ATP com a tirosina quinase for bloqueada, as mudanças que ocorreriam em decorrência deste processo não mais surgirão. A compreensão deste mecanismo foi essencial para o desenvolvimento de uma terapia efetiva e seletiva para a LMC (DRUKER, 2000; FADERL *et al.*, 2000).

No final da década de 80, cientistas da Ciba Geigy (hoje a Novartis), sob a direção de N. Lydon e A. Matter iniciaram pesquisas para identificar compostos que fossem capazes de bloquear a atividade de proteínas quinases. Foi em um destes testes que se descobriu o melhor composto capaz de matar células da LMC com alta especificidade (GOLDMAN, 2000). Este composto era o STI571 (Mesilato de Imatinibe) e basicamente funciona com um inibidor competitivo do ATP, ligando-se nos sítios de fosforilação da *BCR-ABL*, bloqueando a atividade tirosina quinase (SAVAGE e ANTMAN, 2002).

3.1.9 MECANISMO DE AÇÃO

O Mesilato de Imatinibe (MI) é um derivado da 2-fenil-amino-pirimidina e é inibidor seletivo da *BCR-ABL*-tirosina-quinase, incluindo as proteínas codificadas pelo oncogene *BCR-ABL*, *ABL*, *KIT* e receptores dos fatores de crescimento derivado das plaquetas. Esta nova droga age como um antagonista competitivo ligando-se ao receptor *BCR-ABL* dependente de ATP e inibe a fosforilação da tirosina. Inibindo esta fosforilação, o medicamento bloqueia a transdução de sinais que induziriam a proliferação celular e demais regulações do ciclo celular. Isso pode ser traduzido como uma inibição seletiva da proliferação e indução da apoptose em células *BCR-ABL* positivas (DRUKER *et al.* 2001).

O fato de alguns pacientes não responderem ao tratamento com INF- α , a inespecificidade dos tratamentos quimioterápicos e a seletividade aos que podem se submeter ao transplante de medula óssea levou o MI a ser um tratamento de primeira linha da fase crônica da LMC. Esta terapia também é indicada para todas as fases da doença depois de falhas de tratamento com o INF- α , para pacientes pediátricos com

LMC em fase crônica, depois de recaída pós-transplante, além de pacientes LLA *Ph+* e portadores de tumor gastro-intestinal metastático (PENG *et al.*, 2005).

Estudos realizados por O'Brien *et al.* (2003) no qual foram comparados pacientes tratados com Mesilato de Imatinibe com os tratados com INF- α mostrou que o MI apresentava uma melhor resposta em todos os aspectos. O MI mostrou uma maior resposta citogenética (87,1%) em relação ao INF- α (34,7%), ausência de progressão da doença (96,7% contra 91,5%), diminuição de transcritos *BCR-ABL* (57% contra 24%), bem como menor taxa de interrupção do tratamento devido a problemas de resposta do paciente (MI 12,3%; INF- α 31,6%). Com esses dados positivos quanto à melhor resposta e baixa toxicidade do MI, em 10 de março de 2001, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a terapia com Mesilato de Imatinibe em pacientes com LMC em todos os estágios (DEININGER, 2003).

3.1.10 EFEITOS COLATERAIS

Os efeitos adversos que podem ser encontrados em pacientes tratados com MI são vômito, edema, dor muscular e abdominal, náuseas, diarreia, erupções cutâneas, fadiga muscular. Esses sintomas são observados em aproximadamente 10 % do pacientes. Toxicidade hepática, renal e cardíaca devem ser consideradas, assim como as citopenias (anemia, neutropenia e trombocitopenias) (DEININGER e DRUKER, 2003).

3.1.11 RESISTÊNCIA AO MI

Embora estudos mostrem um prognóstico melhor dos pacientes com LMC em relação às demais terapias, em torno de 10% dos tratamentos feitos com a droga apresentam resistência ao tratamento ou doença refratária. Os casos de resistência ao MI foram inicialmente registrados no ano de 2000 e vem sendo extensivamente estudados. São classificados em independentes de *BCR-ABL* e dependentes de *BCR-ABL*. A primeira categoria está ligada aos mecanismos de efluxo de droga, e a segunda a mutações no gene *BCR-ABL*, que fazem com que proteína codificada não seja responsiva ao MI.

3.1.12 METABOLISMO DO MI

A família Citocromo P450 (*CYP450*) é uma superfamília de proteínas-heme que estão envolvidos no processo de metabolismo de vários xenobióticos. A *CYP450* compreende pelo menos cinco subfamílias, designadas de A a E pelo sistema de nomenclatura recomendada (NEBERT *et al.*, 1987), sendo que mais de 50 genes já foram descritos no genoma humano.

Dentro deste complexo enzimático encontra-se uma *CYP* que é a principal responsável pelo metabolismo do Mesilato de Imatinibe – CYP3A4. O gene que codifica esta enzima está localizado no *locus* cromossômico 7q21.1 (OMIM 124010) e é classificado como polipeptídeo 4 da subfamília IIIA da família *CYP450*. Juntamente com a CYP3A5, CYP3A4 é a mais abundante, cerca de 30% a 40% de todas as proteínas CYP450 presentes no fígado humano que é o local onde o MI é metabolizado. A enzima CYP3A4 foi inicialmente denominada Nifedipina Oxidase pela sua capacidade de metabolização do fármaco Nifedipina (KESHAHA, 2004). Esta enzima está envolvida em aproximadamente 50% do metabolismo das drogas terapêuticas (WESTLIND *et al.*, 1999; BOULTON *et al.*, 2001; HSIEH *et al.*, 2001; O'BRIEN *et al.*, 2003b; EAP *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2004; PENG *et al.*, 2005).

Quando o Mesilato de Imatinibe é administrado com drogas que podem inibir a atividade da CYP3A4 (cetonazol, eritromicina, claritromicina), o metabolismo de MI é diminuído. Logicamente, drogas que induzam a atividade da CYP (fenitoína, rifampicina, fenobarbital, carbamazapina) em questão tendem a aumentar a atividade da mesma. Contudo, inibição ou indução de CYP3A4 não ocorre somente através de drogas, mas também pode ocorrer através da alimentação. Por exemplo, pacientes com LMC que são tratados com MI são alertados a não consumir a toranja (*grapefruit* - um cítrico híbrido, resultante do cruzamento do pomelo (*Citrus maxima*) com a laranja (*Citrus x sinensis*)), porque este fruto contém a furanocoumarina, epoxibergamotina e os flavonóides, naringenina, todos os quais são substratos de CYP3A4 e podem inibir a atividade da proteína (WOLF e SMITH, 1999; VERONESE *et al.*, 2003; MONROE *et al.*, 2007).

3.1.13 *CYP3A4*1B* OU *CYP3A4-V*

Polimorfismos genéticos em *CYP3A4* eram desconhecidos até 1996 (KINIRONS *et al.*, 1996). Atualmente já são conhecidas 78 variações do gene, dos quais poucas estão relacionadas à produção de enzima com atividade catalítica alterada (DAI *et al.*, 2001; VAN SCHAİK *et al.*, 2001; SIM *et al.*, 2008). Os vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são frequentemente, detectados através de sequenciamento e avaliados através do uso de drogas para determinar se têm um impacto no padrão catalítico (DAI *et al.*, 2001). Em 1998, Rebbeck e colaboradores identificaram um novo SNP neste gene e designaram o alelo de *CYP3A4-V*. A variante alélica *CYP3A4-V*, ou *CYP3A4*1B*, consiste na substituição simples de A por G (A>G) (AGGGCAAGAG → AGGGCAGAG), na posição 290 da região promotora do gene *CYP3A4*, região conhecida como elemento de resposta à Nifedipina (REBBECK, 1998).

Um estudo feito por Lamba *et al.* (2002), determinou que esta é a variante mais comum de *CYP3A4*, e que pode influenciar na expressão do gene. Está presente em Caucasianos em uma frequência de 2,0 a 9,6% e em Afro-americanos até 40%, mas está ausente em Chineses e Japoneses. Já na África do Sul, a mesma variante alélica foi detectada em 81,3% dos Indianos, 42,9% dos Caucasianos e 16,4% dos Africanos (CHELULE *et al.*, 2003). Estes estudos mostram que há diferença na distribuição alélica de *CYP3A4* em diferentes populações.

A presença da variante *CYP3A4*1B* foi associada a formas mais agressivas de câncer da próstata (REBBECK, 1998; PARIS *et al.*, 1999; TAYEB *et al.*, 2002; PLUMMER *et al.*, 2003; ZEIGLER-JOHNSON *et al.*, 2004; LOUKOLA *et al.*, 2004; BANGSI *et al.*, 2006), a uma maior suscetibilidade para desenvolver câncer de pulmão de pequenas células (DALLY *et al.*, 2003), à ocorrência de menarca precoce, que se suspeita ser um fator de risco para o desenvolvimento de câncer da mama (KADLUBAR *et al.*, 2003) e a um menor risco de desenvolvimento de leucemias secundárias associadas à quimioterapia (FELIX *et al.*, 1998).

A presença de SNPs pode alterar a capacidade catalítica da enzima *CYP3A4* e com isso modificar seus padrões de metabolismo de drogas terapêuticas específicas. Isso pode levar à diminuição da eficácia do tratamento e alterações da dosagem ou mesmo do tipo de droga usada para garantir o sucesso do processo terapêutico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Este estudo foi realizado com a coleta de 22 amostras de medula óssea de pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica oriundas da Unidade de Citogenética do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas, UFPR, Curitiba, assim como 22 amostras de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis pertencentes ao banco de DNA do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, Departamento de Genética, UFPR.

4.2 PROCEDIMENTOS

a. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA

As amostras de medula óssea foram coletadas nas dependências do ambulatório de Hematologia do Hospital de Clínicas (HC), UFPR, Curitiba/PR. O médico responsável coletou as amostras através de punção na crista ilíaca posterior, com agulhas e seringas descartáveis estéreis e contendo heparina. Foram coletados de 3 a 5 ml de medula óssea de cada paciente que foram imediatamente encaminhadas ao laboratório, onde parte do material foi utilizado para análise citogenética. O restante, em torno de 3 ml, foi encaminhado para o Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR, onde foi realizada a separação das células mononucleares por centrifugação em Histopaque® (1ml da amostra era ressuspensa em 1ml de solução salina 0,9% e posteriormente centrifugada em 1ml de Histopaque® a 1800rpm durante 20 minutos; dessa centrifugação resulta um anel de células mononucleares (que deve ser retirado) e posteriormente feita a lise das células sanguíneas (através de sucessivas lavagens e centrifugações com RCLB 1 X a 13000rpm).

b. ANÁLISE CITOGENÉTICA

Para que fosse determinada a presença e porcentagem de células Ph^+ , em cada paciente diagnosticado como portador de LMC foi realizada análise citogenética após cultura de 24 horas e bandeamento GTG em

amostras da medula óssea. Posteriormente ao tratamento com MI, análises sequenciais foram realizadas para acompanhar a resposta citogenética. Este procedimento foi realizado pela equipe da Unidade de Citogenética do Hospital de Clínicas, UFPR.

c. OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração de DNA genômico procedeu-se com a utilização do método de *salting out*, segundo BIGON e FERNANDEZ-VIÑA (1997), com modificações, o qual permite a obtenção de DNA de alto peso molecular. O procedimento consiste no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, eliminação das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA por etanol. Seguidamente à extração do DNA, a amostra foi ressuspensa em 100 µl de água ultrapura e armazenada a -20°C. Por fim, as concentrações de DNA de cada amostra foram mensuradas através da leitura da densidade óptica (DO) realizada pelo espectrofotômetro *Nanodrop*, a fim de padronizar as concentrações das amostras a 10 ng/µl. Depois de reidratado e quantificado, o DNA foi armazenado a -20°C.

4.3 REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO E RESTRIÇÃO DO GENE *CYP3A4*

A análise do polimorfismo *CYP3A4*1B* foi realizada através da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), sendo que a digestão do produto de amplificação foi feita pela enzima PstI. Este polimorfismo leva à ausência do sítio de restrição PstI oriundo da substituição de A por G na posição 290 da região promotora do gene *CYP3A4* (REBBECK, 1998).

Para amplificação do gene foi utilizado o protocolo de CAMARGO *et al.* (2008) com alterações, e a PCR-RFLP se dava sob condições previamente padronizadas. Os iniciadores (*primers*) para o gene *CYP3A4* foram sintetizados de acordo com HASHIMOTO *et al.* (1993) e testados nos programas *Oligo Analyzer 3.1* e *Primer Blast*. Assim como os iniciadores, todos os demais reagentes utilizados em cada uma das

reações de PCR foram pipetados em um único microtubo de 1,5 ml a fim de garantir a homogeneidade das reações. Foram utilizadas as seguintes condições de reação:

- 12,80 µl de água ultra-pura estéril;
- 2,5 µl de tampão da enzima (20 mM de tris-HCl, pH 8,4; 50 mM de KCl);
- 0,75 µl de MgCl₂ (2 mM);
- 1,0 µl de cada iniciador (100 ng/ µl);
- 1,7 µl de dNTPs (2 mM) (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
- 0,25 µl de Taq DNA polimerase (1U).

Em cada microtubo de 0,5 ml, foram adicionados 5 µl do DNA genômico (10 ng/ µl) somados a 20 µl da mistura da reação, obtendo assim um volume final de 25 µl para cada amostra. Os iniciadores utilizados para a reação de PCR-RFLP são observados no quadro baixo:

<i>PRIMER</i>	SEQUÊNCIA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS
<i>FORWARD</i>	5'-GGA CAG CCA TAG AGA CAA CTG CA-3'
<i>REVERSE</i>	5'-CTT TCC TGC CCT GCA CAG-3'

Quadro 1: *Primers* utilizados para a reação de PCR-RFLP do gene *CYP3A4* (FONTE: HASHIMOTO *et al.*, 1993).

O produto da mistura de reação foi submetido ao programa preparado no termociclador (*Mastercycler Gradient* - Eppendorf) e está descrito abaixo:

- 7 minutos a 94°C;
- 30 ciclos: 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 57,7° C, 1 minuto a 72°C;
- 1 minuto a 72° C.

Finalizando o processo de amplificação do gene, procedeu-se a corrida do gel de agarose a 3% utilizando um volume de 15 µl do produto de PCR, a fim de observar a ocorrência e a qualidade da amplificação. Posteriormente, foi realizada a clivagem com a enzima de restrição, conforme se segue:

- 10 µl do produto de PCR;
- 5 U de enzima de restrição PstI;
- 2,0 µl de tampão da enzima (1x);
- 7,5 µl de água ultrapura estéril.

O produto do processo de restrição foi incubado no *Thermo Bath ALB 64*, por um período de 14 horas a uma temperatura de 37° C.

A amplificação do gene *CYP3A4* resulta em uma banda com 385 pb (Figura 2) e a sua digestão feita pela enzima de restrição PstI gera um fragmento de 220 pb para o genótipo selvagem. Já nos genótipos mutantes, onde sítio de restrição não está presente, encontra-se uma banda de 199 pb para o mutante homozigoto, e 220 pb e 199 pb para o heterozigoto (CAVALLI *et al.* 2001). As demais bandas geradas pela enzima de restrição (81, 33 e 21 pb) não podem ser registradas com essa classe de gel de agarose.

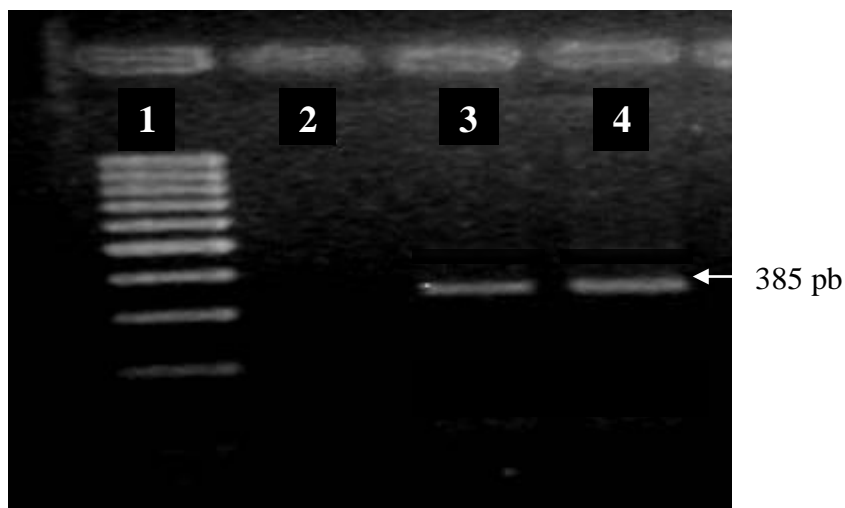


Figura 2: Padrão de bandas do gene *CYP3A4* após reação de PCR. FONTE: O autor, 2010.

Legenda:

1. Marcador de Massa Molecular 50pb;
2. Controle negativo de contaminação (branco);
- 3 e 4. Produto de amplificação sem digestão com 385pb.

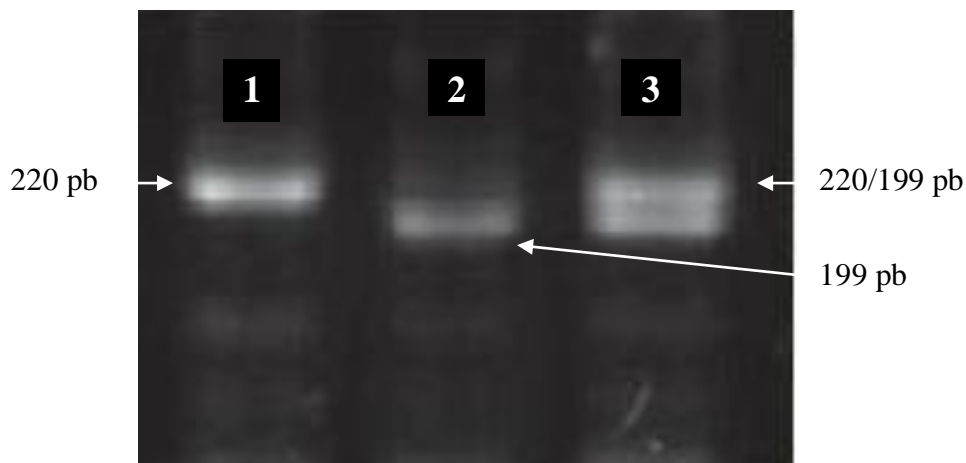


Figura 3: Padrão de bandas do gene *CYP3A4*1B* para PCR-RFLP. FONTE: O autor, 2010.

Legenda:

1. Indivíduo Selvagem (AA) – 220 pb;
2. Indivíduo Homozigoto Mutante (GG) – 199pb;
3. Indivíduo Heterozigoto (AG) – 220/199pb.

Os produtos da PCR-RFLP foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2,5%, analisados em transiluminador de luz ultravioleta e documentados em sistema de captação de imagens pelo *software* “Digi doc-it”.

4.4 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

O teste *t* de Student foi utilizado para comparação das médias de idade entre os grupos pacientes e controle, assim como para comparar as médias na relação tempo-genótipo e porcentagem de *Ph+*.

O teste de Qui-quadrado de homogeneidade para verificar se os genótipos observados se distribuíam igualmente em pacientes e controle. As frequências genotípicas observadas para o gene *CYP3A4*1B* foram ainda comparadas com as frequências esperadas de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg, conforme BEIGUELMAN, 1988.

Para analisar a variante polimórfica *CYP3A4*1B* e comparar as frequências de cada genótipo de risco entre pacientes e controles, foi utilizado o teste de risco relativo *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%.

Foi utilizado o coeficiente de regressão para a análise das variáveis genótipo, tempo de tratamento e porcentagem de cromossomo *Ph+*.

5 RESULTADOS

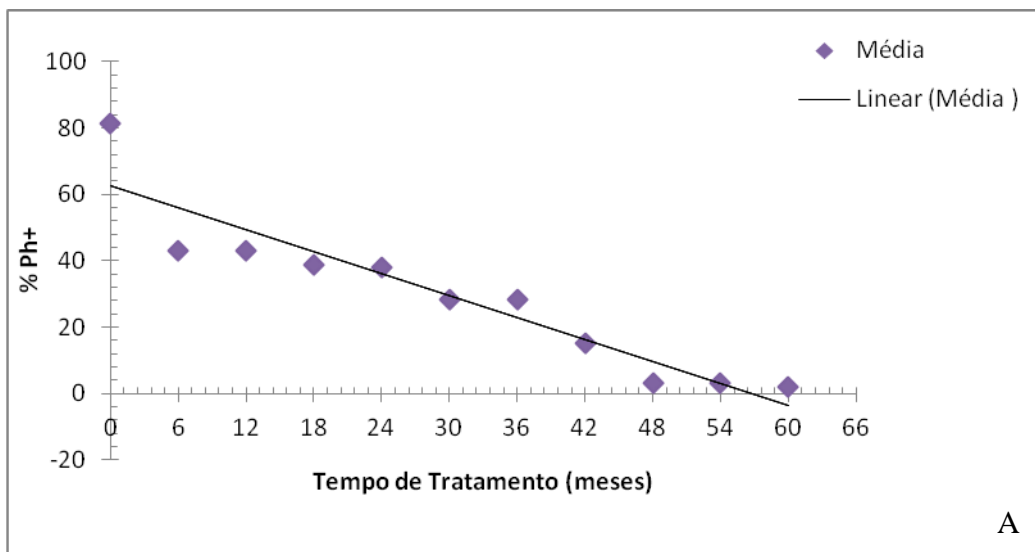
A média de idade entre os pacientes foi de $49,07 \pm 10,32$ e dos controles foi de $47,71 \pm 10,22$, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($t = 0,0048$; $P > 0,90$). Com relação ao sexo, 12 (54,60%) dos pares de paciente e controle eram do sexo feminino, e 10 (45,40%) dos pares eram do sexo masculino. Em relação à etnia 34 (77,27%) dos pacientes e controles eram euro-descendentes e 10 (22,72%) eram afro-descendentes.

5.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

Para o gene *CYP3A4*1B* foram observados 16 (73%) dos pacientes com genótipo homocigoto selvagem (AA), 2 (9%) com genótipo heterocigoto (AG), e 4 (18%) para o genótipo homocigoto mutante (GG). As frequências alélicas entre os pacientes foram de 0,775 para o alelo selvagem e 0,225 para o mutante. Entre os controles, 17 (77%) tinham o genótipo homocigoto selvagem, 1 (5%) apresentou o genótipo heterocigoto, e 4 (18%) eram homocigotos selvagem. Os indivíduos controle apresentam frequência alélica de 0,795 para o alelo selvagem, e 0,205 o alelo mutante. Não houve diferença estatisticamente significativa entre na distribuição das frequências genotípicas entre pacientes e controles ($\chi^2_1 = 0,35$; $p > 0,05$). As frequências genotípicas não estão de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg tanto nos pacientes ($\chi^2_1 = 12,46$; $G1 = 1$, $p > 0,001$) quanto nos controles ($\chi^2_1 = 22,0$; $G1 = 1$, $p > 0,001$).

5.2 RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE TRATAMENTO E FREQUÊNCIA DO BIOMARCADOR CROMOSSOMO *PHILADELPHIA* (Ph^+)

A técnica de bandeamento GTG permitiu a identificação do cromossomo Ph presente no momento do tratamento quando foi feita a retirada da amostra. Analisando a relação entre tempo de tratamento e porcentagem de Ph^+ , verificou-se a existência de uma relação inversa entre essas duas variáveis.



($b = -0.79$; $t = 0.967$, $0.40 > P > 0.30$)

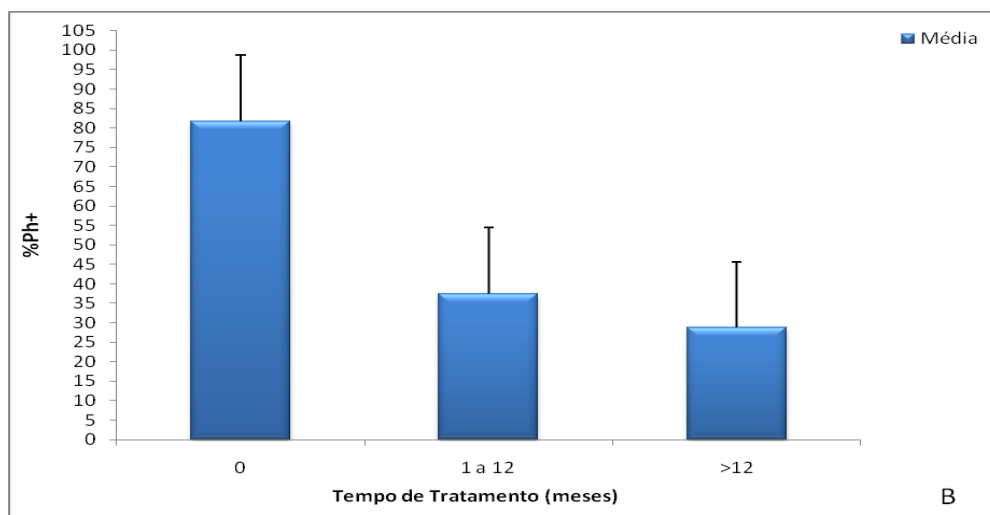


Gráfico 1: A –Relação entre a porcentagem de cromossomo Ph^+ e tempo de tratamento com MI em 22 pacientes com LMC. B - Duração do tratamento dividido em três categorias:

0 = pacientes com tempo zero de tratamento, 1 a 12 = pacientes com 1 a 12 meses de tratamento, e >12 = pacientes com mais de 12 meses de tratamento. FONTE: O autor, 2010.

5.3 ESTUDOS DE OR - *ODDS RATIO*

Foram considerados genótipos de risco aqueles que apresentavam o alelo mutante (AG - heterozigoto e/ou GG – homozigoto mutante). Entre os pacientes, 6 foram considerados com genótipo de risco, enquanto no grupo controle haviam 5 indivíduos.

Para o estudo da OR entre pacientes e controles quanto ao genótipo de risco, o grupo de estudo apresentou maior ocorrência do que o grupo controle (OR = 1,28 – IC 95% = 0,32-5,01).

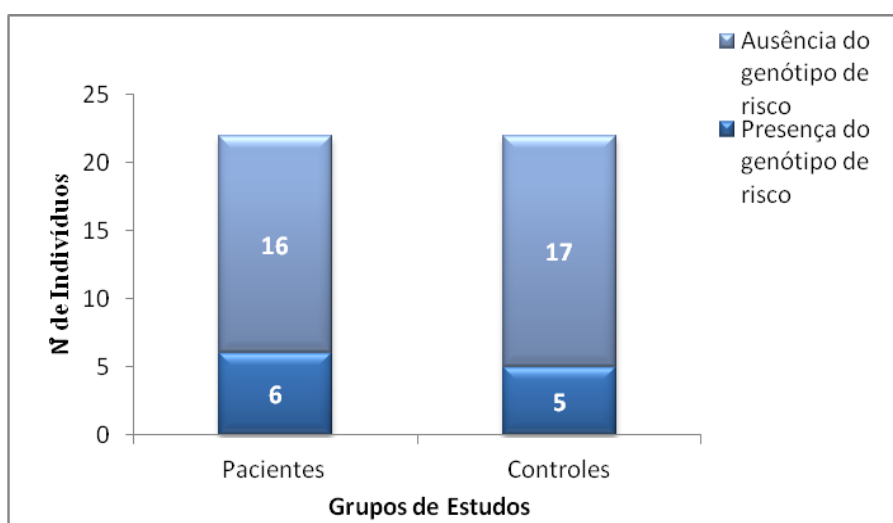


Gráfico 2: Ausência ou presença do genótipo de risco para o gene *CYP3A4*1B* em pacientes e controles. FONTE: O autor, 2010.

Quando avaliada a presença de heterozigose, o grupo controle apresentou menor ocorrência do alelo mutante do que o grupo de estudo (OR = 2,10 – IC 95% = 0,18-25,01).

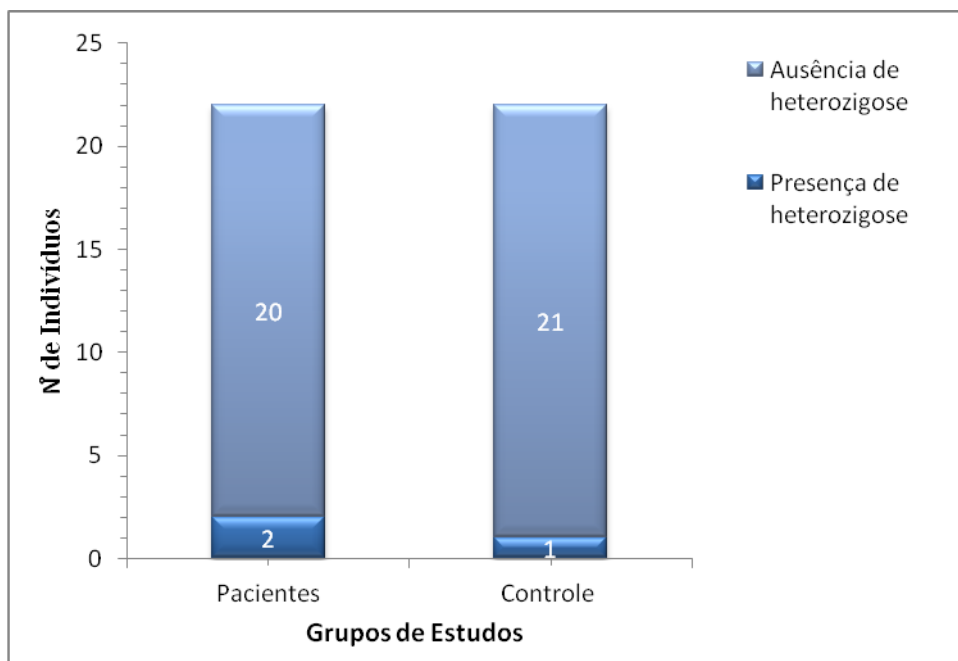


Gráfico 3: Presença ou ausência de heterozigose, nos grupos de estudo e controle. FONTE: O autor, 2010.

Quanto à presença do alelo mutante em homozigose, não houve variação entre os grupos controle e de estudo (OR = 1,00 – IC95% = 0,22-4,63).

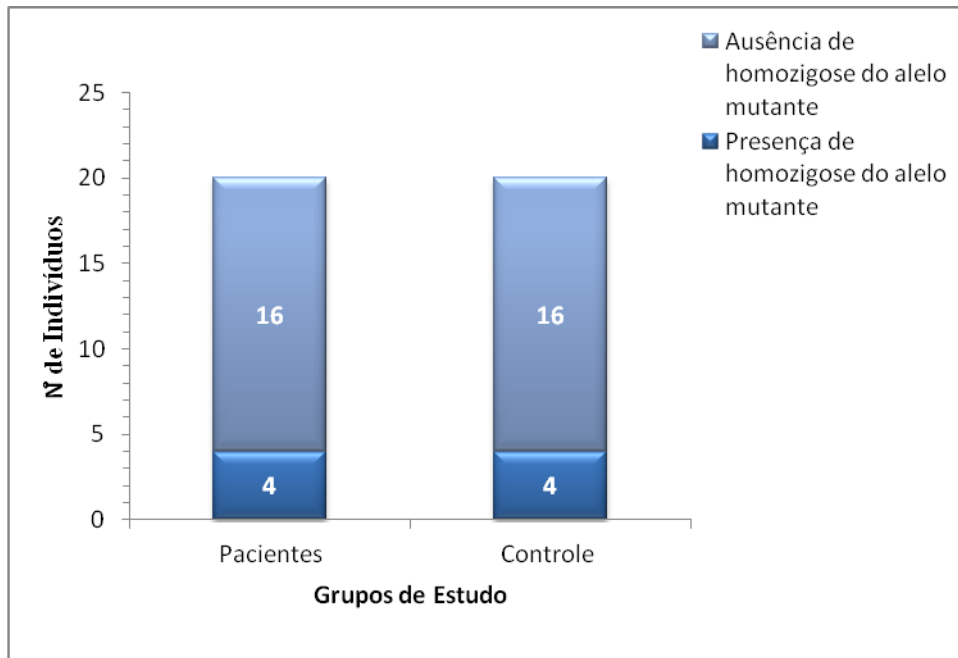


Gráfico 4: Presença ou ausência de homozigose para o alelo mutante nos grupos controle e paciente. FONTE: O autor, 2010

Em todos os casos, os valores de OR encontrados entre pacientes e controles não foram estatisticamente significativos.

A tabela abaixo sumariza os dados encontrados nas relações pacientes/controles:

Característica analisada	Paciente X Controle
Ausência ou Presença do genótipo de risco	OR = 1,28 – IC 95% = 0,32-5,01
Ausência ou Presença de Heterozigose	OR = 2,10 – IC 95% = 0,18-25,01
Ausência ou Presença de Homozigose do alelo mutante	OR = 1,00 – IC95% = 0,22-4,63

Tabela 1: Resultado da análise de OR entre os grupos controle e paciente. FONTE: O autor, 2010.

5.4 INTERAÇÃO TEMPO DE TRATAMENTO VS. GENÓTIPO VS. PERCENTUAL DE CROMOSSOMO *Ph+*

Para avaliar o efeito do tempo de tratamento em relação ao genótipo e percentual de cromossomo *Ph+* foi realizado o teste *t* de Student. Na análise inicial foi realizada uma comparação das médias das porcentagens de *Ph+* encontradas nos genótipos selvagem e homozigoto mutante em relação ao período de tratamento. Para obter uma amostra confiável foi retirado o genótipo heterozigoto da análise, visto que os indivíduos que apresentaram este genótipo não tinham acompanhamento suficiente para conferir dados passíveis de inclusão. O tempo de tratamento também foi dividido em duas categorias, até 12 meses e acima de 12 meses de acompanhamento, sendo os primeiros dados encontrados em seis meses após o início da terapia. Este último período compreende dados até 60 meses. Foi excluído, também, o tempo zero (diagnóstico) por não corresponder a tempo de tratamento.

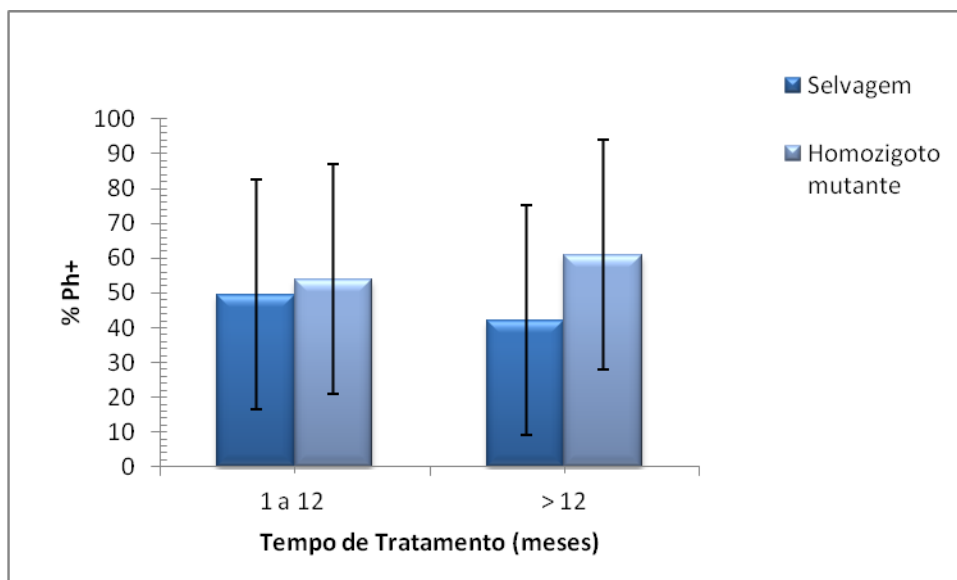


Gráfico 5: Efeito da interação genótipo e duração do tratamento, sobre o percentual de cromossomo *Ph+*.

O resultado do teste *t* não mostrou diferença significativa entre as variáveis acima citadas para o período 1 a 12 meses ($t = 0,10$; $P > 0,90$), nem para o período acima de 12 meses ($t = 1,26$; $P > 0,40$).

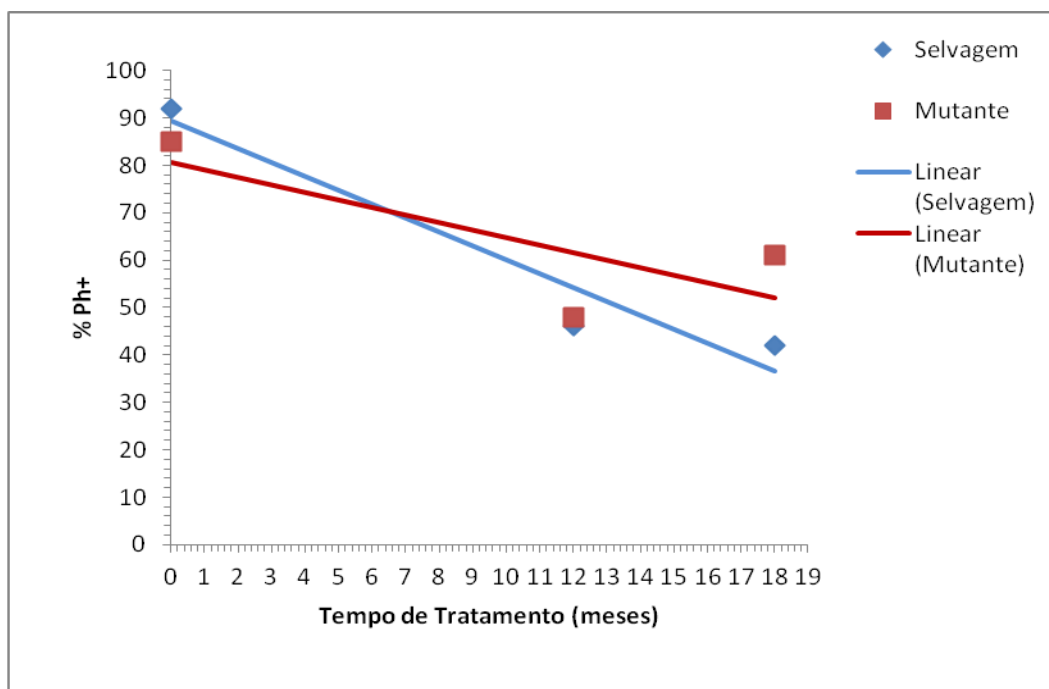


Gráfico 6. Regressão linear dos genótipos selvagem ($b = -0,318$) e mutante ($b = -0,377$) mostrando uma diferença entre os genótipos no ângulo de inclinação das retas.

O coeficiente de regressão indicou que não há dependência ($b = - 0,318$ para o genótipo selvagem e $b = - 0,377$ para o mutante) da frequência de células *Ph+* em função do tempo de tratamento, embora observe-se que as mesmas diminuem com o aumento do tempo de tratamento.

6 DISCUSSÃO

O Mesilato de Imatinibe é atualmente a terapia de ponta para pacientes portadores de LMC que não podem ser submetidos ao transplante de medula óssea. Porém, nos casos em que os pacientes não têm uma resposta eficiente ao tratamento há necessidade de aumento da dose do medicamento em até 100% em relação aos valores convencionais que estão em torno de 400mg/dia (KANTARJIAN *et al.*, 2003). O aumento das dosagens deste fármaco pode causar efeito tóxico ao paciente, o que pode comprometer o prognóstico terapêutico, sendo recomendado, portanto somente em casos de comprovada necessidade.

Atualmente, duas novas drogas de segunda geração estão sendo utilizadas também em pacientes portadores de LMC. Dasatinibe e nilotinibe também são inibidores tirosina BCR-ABL aprovados como tratamento de segunda linha, caso o tratamento com Mesilato de Imatinibe falhe ou não seja tolerado pelo paciente.

Para que se tenha êxito no tratamento quimioterápico, a população celular maligna deve ser erradicada o que está diretamente associado à cinética do medicamento. Neste trabalho avaliamos a resposta citogenética em relação ao genótipo *CYP3A4* e tempo de tratamento, visando avaliar a importância do polimorfismo *CYP3A4*1B* como marcador de resposta ao tratamento com MI.

Foram analisados 22 pacientes submetidos à terapia com Mesilato de Imatinibe e 22 indivíduos saudáveis os quais foram utilizados como controle. Os grupos foram pareados por sexo, idade e etnia.

Quando avaliados em relação às frequências genótípicas, pacientes e controles não mostraram diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_1 = 0,35$; $p > 0,05$). Porém, as frequências genótípicas dos pacientes ($\chi^2_1 = 12,46$; $Gl = 1$, $p > 0,001$) e controles ($\chi^2_1 = 22,0$; $Gl = 1$, $p > 0,001$) não se mostraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, provavelmente devido ao baixo número amostral. Quando os grupos de estudo foram avaliados pela presença ou ausência do genótipo de risco também não houve significância (OR = 1,28 – IC 95% = 0,32-5,01), o que era esperado desde que a

variante *CYP3A4*1B* não é considerada como um alelo de predisposição à LMC (CAMARGO *et al.*, 2008).

As análises feitas pelas ORs dos pacientes e controles quanto à presença do alelo mutante em homozigose (OR = 1,00 – IC95% = 0,22-4,63) ou em heterozigose (OR = 2,10 – IC 95% = 0,18-25,01) mostraram que as diferenças existentes não foram estatisticamente significativas, mesmo os pacientes apresentando mais eventos nas duas análises.

Através da análise citogenética com bandeamento GTG realizada pela equipe da Unidade de Citogenética do Laboratório de Imunogenética do HC (UFPR), foi possível estipular a porcentagem de células *Ph+* em amostras coletadas em diferentes períodos, assim como o tempo de tratamento com MI de cada paciente. O gráfico 1 mostra uma relação inversa ($b = -0.79$; $t = 0.967$, $0.40 > P > 0.30$) entre tempo de tratamento e porcentagem do cromossomo *Ph+*. A partir destes dados conclui-se que a amostra de pacientes analisados está de acordo com vários estudos realizados que demonstram resposta citogenética ao MI, onde à medida que aumenta o tempo de tratamento, a taxa percentual do biomarcador *Ph+* decresce (KANTARJIAN *et al.*, 2002; JAMUR, 2005). Os critérios de resposta citogenética ao tratamento com Mesilato de Imatinibe são consensuais entre vários pesquisadores (SPENCER *et al.*, 1995; ENRIGHT e MCGLAVE, 1999; KANTARJIAN *et al.*, 2002), onde melhor resposta citogenética são consideradas tanto a completa (0% de células *Ph+*) como a parcial (1% a 35%). Logo, estes resultados são comumente esperados em terapias bem sucedidas para LMC.

Para avaliação da significância das diferenças das médias da proporção de *Ph+* observada nos dois genótipos e nos diferentes períodos de tempo de tratamento realizou-se o teste *t* de Student. Os valores de *t* encontrados não apresentaram significância estatística entre as médias dos dois genótipos no período de 1 a 12 meses ($t = 0,10$; $P > 0,90$) e também no período acima de 12 meses ($t = 1,26$; $P > 0,40$). Ou seja, na amostra estudada não houve uma relação direta entre a presença do genótipo de risco com uma porcentagem maior de *Ph+* no decorrer do tratamento. Apesar da não significância observa-se que o valor de *t* obtido no período superior a 12 meses foi maior do que no período de 1 a 12 meses. CAMARGO *et al.* (2008) estudando 30 pacientes colombianos portadores de LMC também não demonstraram associação, porém deve-se destacar que o número amostral era pequeno e muito próximo ao deste estudo.

A análise de regressão mostrou que o ângulo de inclinação da reta entre o genótipo selvagem ($b = -0,318$) e o genótipo mutante ($b = -0,377$) são diferentes, tendo o genótipo mutante uma resposta pior ao tratamento, o que difere do esperado para pacientes portadores de LMC tratados com MI. O esperado foi reafirmado neste trabalho quando analisado sem discriminação de genótipos (gráfico 1). Para ambos os genótipos, os valores de b foram negativos e não significantes indicando que não há uma dependência da frequência de ocorrência do cromossomo $Ph+$ em função do tempo de tratamento. No entanto, como se observou na comparação entre as médias há uma tendência evidente do decréscimo da proporção de células $Ph+$ em função do tempo no genótipo selvagem quando comparado com os mutantes.

Os resultados encontrados no teste t e na análise de regressão não são significativos provavelmente devido ao tamanho amostral, e, portanto, a significância estatística pode ser alcançada pela análise de uma amostra de tamanho mais consistente.

7 CONCLUSÕES

Os dados encontrados mostram que as frequências genotípicas não variam significativamente entre pacientes e controles, assim como não foi encontrado nenhum desvio significativo entre frequência dos alelos entre pacientes e controles.

Não houve um resultado estatisticamente significativo que sustentasse a hipótese de que a variante $CYP3A4*1B$ possa ser considerada de risco para o tratamento com o MI. Porém, encontrou-se um desvio da normalidade para pacientes tratados com o fármaco acima citado quando a análise numérica é feita meramente em caráter observacional. Embora o dado tenha sido comprometido pelo número amostral, vale a ressalva de que indivíduos homozigotos mutantes podem responder negativamente ao tratamento, em períodos mais longos.

Mais estudos, com amostras maiores, devem ser realizados para que esta hipótese possa vir a ser confirmada ou não. Fazem-se relevantes estudos mais aprofundados sobre polimorfismos de enzimas que auxiliam nos processos de biometabolismo, pois são ferramentas extremamente importantes na determinação de um melhor prognóstico para pacientes portadores de neoplasias, doenças onde o tempo é a questão fundamental.

8 REFERÊNCIAS

- BABA e CĂTOI. **Comparative Oncology**. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy; 2007.
- BAIN. An overview of translocation-related oncogenesis in the chronic myeloid leukaemias. *Acta Haematologica* 2002; 107:57-63.
- BASKIEWICZ-MASIUK; MACHALINSKI. The role of STAT5 proteins in proliferation and apoptosis of CML and AML cells. *Eur J Haematol* 2004; 72: 420-29.
- BOULTON, ARNAUD e DEVANE, 2001. A single dose of methadone inhibits cytochrome P-4503A activity in healthy volunteers as assessed by the urinary cortisol ratio. *Clinical Pharmacology* 51: 350–354.
- BOSE; DEININGER; GORA-TYBOK; GOLDMAN; MELO. The presence of BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 1998; 92:3362-67.
- BOWMAN.; GARCIA; TURKSON; LOVE. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19:2474-88.
- CAMARGO, SOTO MARÍN, ZEA, SAAVEDRA. Tratamiento con imatinib y el farmacogenotipo CYP3A4 em relación com la expansión clonal Ph+ en leucemina mieloide crônica (LMC). 2008. *Colombia Médica*, ano/vol. 39, número 04.
- CAVALLI, S. A.; BERTOLAMI, M.C.; SALAZAR, L.A. Polimorfismo da região 5' promotora do gene da *CYP3A4* em indivíduos com hipercolesterolemia familiar heterozigótica. *Rev Bras Cienc Farmaceut* 2001; 37
- CHOPRA; PU; ELEFANTY. Biology of BCR-ABL. **Blood Reviews**, 13, 211-229, 1999.
- COPPO; FLAMANT; DE MAS; JARRIER.; GUILLIER; BONNET; LACOUT; GUILHOT; VAINCHENKER; TURHAN; BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in humans cells. *Br J Haematol*. 2006; 134: 171-79.
- CORTEZ; KADLEC; PENDERGAST. Structural and signaling requirements for BCR-ABL mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5531-41.
- DAI; TANG; ROSE; HODGSON; BIENSTOCK.; MOHRENWEISER; GOLDSTEIN. (2001). Identification of variants of *CYP3A4* and characterization of their abilities to metabolise testosterone and chlorpyrifos. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299(3): 825–831.
- DALEY; VAN ETTEN; BALTIMORE. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247: 824-30.

DATTA; BRUNET; GRENNBERG. Cellular survival: a play in three Akts. *Gene & Dev.* 1999; 13:3343-56.

DEININGER. Milestones and monitoring in patients with CML treated with imatinib. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, 419-26, 2008.

DEININGER. e DRUKER. Specific target therapy of chronic myelogenous leukemia with Imatinib. *Pharmacol Rev* 2003; 55:401-23.

DE KLEIN; VAN KESSEL; GROSVELD. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia. *Nature* 1982; 300:765-7.

EAP; BUCLIN; HUSTERT; BLEIBER; GOLAY; AUBERT; BAUMAN; TELENTI e KERB R. (2004). Pharmacokinetics of midazolam in CYP3A4- and CYP3A5-genotyped subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology* 60: 231–236.

ENRIGHT; MCGLAIVE. Chronic myelogenous leukemia. In: EDWARD; COHEN; FURIE; HOFFMAN; MCGLAIVE; SHATTIL; SILBERSTEIN; STRAUSS (Ed.). *Hematology: basic principles and practice*. Great Britain: Churchill Livingstone, 1999. p. 1155-1171.

FADERL; TALPAZ; ESTROV.; KANTARJIAN (1999). "Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy." *Annals of Internal Medicine* 131 (3): 207–219).

GEARY, CG. The story of chronic myeloid leukemia. *Br J Hematol* 2000; 20: 110 (1): 2-11).

GOLDMAN. Chronic myeloid leukemia-still a few question. *Experimental Hematology* 2004; 32: 2-10.

GOLDMAN e MELO. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. *New England Journal of Medicine* 2003; 349:15, 1451-64.

GORDON.; DAZZI.; MARLEY. Cell biology of CML cells. *Leukemia* 1999; 13 (sup 1): S65-S71.

GRATWOHL; HERMANS; NIEDERWIESER. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: long-term results. *Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplant*. 1993; 12:509-16.

HAMÚ; OLIVEIRA; SILVA; SILVA; CRUZ. Polimorfismo do gene tp53 no códon 72 em pacientes com suspeita de LMC. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007; 29(4):346-50.

HEIM; MITELMAN. *Cancer Cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells*. Second Edition, Chapter 4, 1995.

HEHLMANN; HEIMPEL; HASFORD. Randomized comparison of bussulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. *The German CML Study Group. Blood* 1993; 82: 398-407.

HSIEH; LIN; CHENG; LAI; LIN; SIEST e HUANG. (2001). Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metabolism and Disposition* 29(3): 268–273.

INCA. Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acesso em Outubro de 2010.

JAMUR. Estudo Citogenético de pacientes com leucemia mielóide crônica tratados com o Mesilato de Imatinibe. Universidade Federal do Paraná, 2005.

JOHANSSON; FIORETOS; MITELMAN. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Hemtol.* 2002; 346: 652-54.

KANTARJIAN, SAWYERS, HOCHHAUS, GUILHOT, SCHIFFER, GAMBACORTI-PARSSERINI, *et al.* International STI571 CML Study Group. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. 2002; 346: 645-52.

KANTARJIAN, TALPAZ, O`BRIEN, GILES, GARCIA-MANERO, FARDEL, *et al.* Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with LMC. *Blood.* 2003; 101: 473-5.

KOZUBEK; LUKASOVA; RYSNAR *et al.* Distribution of BCR and ABL genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes. *Blood* 1997; 89: 4537-45.

LICHTMAN; BEUTLER; KIPPS; SELIGSOHN; KAUSHANSKY; PRCHAL. Willians Hematology. 7° Edition. USA: McGraw-Hill Medical, 2006.

LOPES; PICCOLI; PAIXÃO; LATORRE; DE CAMARGO; SIMPSON e CABALLERO. (2004). Association of CYP3A4 genotype with detection of V γ /J β trans-rearrangements in the peripheral blood leukocytes of paediatric cancer patients undergoing chemotherapy for ALL. *Leukemia Research* 28: 1281–1286.

MONROE; MURPHY; KOLONEL e PIKE. (2007). Prospective study of grapefruit intake and risk of breast cancer in postmenopausal women: the Multiethnic cohort study. *British Journal of Cancer* 97: 440–445.

NEBERT; ADESNIK; COON; ESTABROOK; GONZALEZ; GEUNGERICH; GUNSAIUS; JOHNSON; KEMPER; LEVIN; PHILLIPS; SATO e WATERMAN. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 6: 1–11.

NEVES; RAMOS; DA SILVA; PARREIRA; PARREIRA; The nuclear topography of ABL, BCR, PML, RARA α genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 1999; 93: 1197-207.

NOWELL; HUNGERFORD. A minute chromossome in human granulocytic leukemia. *Science*, 132, 1497, 1960.

O'BRIEN; MEINHARDT; BOND; BECK; PENG; DUTREIX; MEHRING; MILOSAVLJEV ; HUBER; CAPDEVILLE e FISCHER. (2003b). Effects of Imatinib Mesylate (STI571, Glivec) on the pharmacokinetics of Simvastatin, a cytochrome P450 3A4 substrate, in patients with chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Cancer* 89: 1855–1859.

OSAROGIAGBON; MCGLAVE. Chronic myelogenous leukemia. *Current Opinion in Hematology* 1999; 6:241-46.

PASTERNAK; HOCHLAUS; SCHUTHEIS. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *Journal of Cancer Research and Clinic Oncology* 1998; 124:643-60.

PENG; LOYD e SCHRAN (2005). Clinical pharmacokinetics of Imatinib. *Clinical Pharmacokinetics* 44(9): 879–894.

RADICH. The Biology of CML blast crisis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 384-91, 2007.

RANDOLPH. Chronic Myelocytic Leukemia – Part I: History, Clinical Presentation and Molecular Biology. *Clin. Lab. Science* 2005; 18(1): 1-12, B.

RAVANDI; TALPAZ; ESTROV. Modulation of cellular signaling pathways: prospects for targeted therapy in hematological malignancies. *Clinical Cancer Research* 2003; 9:535-50.

ROCHA; FERREIRA. **Oncologia Molecular**, RJ: Atheneu, 2006

ROWLEY. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 1973; 243: 290 – 3.

SATTLER e GRIFFIN. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogenes. *Seminars in Hematology* 2003; 40: 4-10.

SAWYERS. Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 1999;340:1330-38.

SAWYERS; MC LAUGHLIN; GOGA; HAVLIK; WITTE. The nuclear tyrosine kinase c-ABL negatively regulates cell growth. *Cell* 1994; 77: 122-31.

SIM; SUNDBERG; NEBERT (2008). Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Available at: <http://www.cypalleles.ki.se>. Accessed May 21, 2008.

SPENCER; O'BRIEN; GOLDMAN. Options for therapy in chronic myeloid leukemia. *British Journal of Haematology*. v. 91, p 2-7, 1995.

TEFFERI. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia* 2007; 1-11.

VAN ETTEN. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-ABL. *Trends Cell Biol*, 1999; 9: 179-86.

VAN SCHAIK; DE WILDT; BROSENS; VAN FESSEM; VAN DEN ANKER e LINDEMANS . (2001). The CYP3A4*3 allele: is it really rare? *Clinical Chemistry* 47(6): 1104–1106.

VERONESE; GILLEN; BURKE; DORVAL; HAUCK; PEQUIGNOT; WALDMAN e GREENBERG. (2003). Exposure-dependent inhibition of intestinal and hepatic CYP3A4 *in vivo* by grapefruit juice. *The Journal of Clinical Pharmacology* 43: 831–839.

WESTLIND; LÖFBERG; TINDBERG; ANDERSSON e INGELMAN-SUNDBERG. (1999). Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: Relationship to genetic polymorphism in the 5'–upstream regulatory region. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259(1): 201–205.

WOLF e SMITH. (1999). Pharmacogenetics. *British Medical Bulletin* 55(2): 366–386.