

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Natália Moreira Vieira

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES TRANSPORTADORES DO
MESILATO DE IMATINIBE E A RESPOSTA AO TRATAMENTO EM PACIENTES
COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

**Porto Alegre
2016**

Natália Moreira Vieira

Associação de Polimorfismos de Genes de Transportadores do Mesilato de Imatinibe e a Resposta ao Tratamento em Pacientes com Leucemia Mieloide Crônica

Dissertação de Mestrado a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Vanessa Suñé Mattevi
Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Sandrine Comparsi Wagner

**Porto Alegre
2016**

Catálogo na Publicação

Vieira, Natália Moreira

Associação de polimorfismos de genes transportadores do mesilato de imatinibe e a resposta ao tratamento em pacientes com leucemia mieloide crônica / Natália Moreira Vieira. -- 2016.

66 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Orientador(a): Profa. Dra. Vanessa Suñé Mattevi ;
coorientador(a): Profa. Dra. Sandrine Comparsi Wagner.

1. Leucemia Mieloide Crônica. 2. Farmacogenética. 3. Mesilato de Imatinibe. 4. Transportadores de Efluxo. 5. Polimorfismos. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Aos meus queridos pais, Cristina Moreira e Miguel Vieira, pelo amor e apoio incondicional;

A toda minha família, em especial ao meu afilhado, João César Cabral, por me motivar a ser uma pessoa melhor e a seguir em frente;

A Augusto Correa, pela paciência, companheirismo e habilidade com sinônimos e gerúndios;

Às minhas orientadoras, minhas “mães científicas”, Vanessa Mattevi e Sandrine Wagner, por acreditarem no meu potencial e no do trabalho, por todas as pacientes horas de reuniões. Faltam-me palavras para descrever o quanto agradeço essa oportunidade;

Aos Grupos de Pesquisa e ao Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA, em especial Janaína Castilhos, pela ajuda com diversos *softwares*, e ao Dr. Tito Vanelli, pela participação primordial nas análises estatísticas;

À Grasiela Agnes e Marília Zandoná, pelo o apoio técnico-laboratorial desse trabalho, pela amizade, por todos os conselhos, cafezinhos e almoços;

À Fabíola Reginato, que além de iniciação científica foi também braço esquerdo, e muitas vezes o direito também, durante esses dois anos;

Aos pacientes voluntários desse estudo, que se sujeitaram a telefonemas, questionários, troca no horário da medicação, coletas de sangue e de cabelo. Essa pesquisa é *com vocês e para vocês*;

À Dra. Laura Fogliatto e ao Dr. Marcelo Capra, por serem muito mais do que médicos responsáveis pelos pacientes desse estudo, mas estarem sempre dispostos a ensinar e ajudar no que fosse necessário;

A Rafael Linden e ao Laboratório de Toxicologia da Universidade Feevale, pela colaboração nas análises de plasma e cabelo;

À Renata Leite, por ter iniciado os estudos na UFCSPA, abrindo muitos caminhos para que o grupo de pesquisa pudesse crescer cada vez mais;

Aos colegas biomédicos Marcos Bastiani e Carlos Alves, pelas habilidosas mãos para coleta de sangue;

Aos amigos que a UFCSPA me proporcionou desde a graduação até aqui (que não tenho coragem de agradecer nominalmente com receio de esquecer alguém). Todos foram especiais de alguma forma e em algum momento dessa trajetória;

Às amigas Mirela Gil, Rafaela Rocha, Marcela Rocha, Wladiana Lendenges, Amanda Stapenhorst, e amigos André Borba e Thiago Jarces, em especial, por me aguentarem todos esses anos falando tanta bobagem;

Aos amigos de fora da UFCSPA, Priscila Magalhães, Érika Arruda, Cyntia Bernardes, Joyle Moreira, Ariadne Oliveira, Gabriela Barreto, Josi Medeiros: por serem sempre o fresco da minha mente e da minha alma;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo fomento ao projeto de pesquisa do qual resultou a presente dissertação;

Ao programa de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio à pesquisa através da bolsa de estudos.

“Erros são os portais da descoberta.”

(James Joyce)

Lista de Abreviaturas

ABC: *ATP-binding cassette*

Ara-C: Citarabina

ATP: Adenosina Trifosfato

CB: Crise blástica

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ELN: European Leukemia Net

FA: Fase acelerada

FC: Fase crônica

HU: Hidroxiureia

IFN- α : Interferon alfa

kDA: Quilodaltons

LMC: Leucemia Mieloide Crônica

MI: Mesilato de Imatinibe

Ph: Cromossomo Filadélfia

SNPs: Polimorfismos de nucleotídeo único

TGI: Tumor Gastrointestinal

TKI: Inibidor de tirosina quinase

Sumário

1 Introdução.....	11
<i>1.1 Neoplasias Mieloproliferativas e a Leucemia Mieloide Crônica</i>	<i>11</i>
1.1.1 O Cromossomo Filadélfia	12
1.1.2 Evolução e Prognóstico da LMC	13
1.1.3 A Terapêutica da LMC e o Mesilato de Imatinibe.....	14
1.1.4 O Monitoramento da LMC.....	15
<i>1.2 A Farmacocinética do Mesilato de Imatinibe</i>	<i>16</i>
1.2.1 Proteínas de Efluxo da Superfamília ABC e a Influência da Farmacogenética na Terapia com MI.....	18
1.2.1.1 <i>ABCB1</i>	20
1.2.1.2 <i>ABCG2</i>	21
1.2.1.3 <i>ABCC4</i>	22
2 Objetivos	23
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	23
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	23
3 Referências Bibliográficas	24
4 Artigo Científico	32
5 Considerações Finais.....	59
Anexo 1	60
Anexo 2.....	63

Esclarecimento aos Avaliadores

Polimorfismos nas enzimas hepáticas responsáveis pela metabolização do mesilato de imatinibe, nominalmente CYP3A4 e CYP3A5, foram analisados pelo presente grupo de pesquisa em uma dissertação de mestrado nomeada “*Estudo Farmacogenômico da Resposta ao Tratamento com Mesilato de Imatinibe em Pacientes com Leucemia Mieloide Crônica*” (Renata Leite dos Santos, 2015). Seus resultados ainda não publicados foram incluídos no artigo científico a ser apresentado neste trabalho, a fim de torná-lo mais abrangente, já que o funcionamento dessas enzimas também pode ser uma chave importante para a resolução desse cenário.

Por não terem sido objeto de estudo da presente dissertação, a parte inicial não contempla essas enzimas e seus polimorfismos. Sendo assim, a apresentação dos mesmos fica limitada apenas ao artigo científico.

Resumo

Introdução: A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa que tem como causa primária a presença do cromossomo filadélfia (Ph). O mesilato de imatinibe (MI) foi a primeira terapia alvo da doença, representando um avanço na prática clínica. Entretanto, alguns pacientes apresentam resistência ou intolerância a este fármaco. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes codificantes de proteínas transportadoras de fármacos, como aquelas codificadas pelos genes da família *ATP-Binding Cassette ABCB1* (rs3213619, rs11228503, rs2032582, rs1045642), *ABCG2* (rs2231142) e *ABCC4* (rs9561765), podem influenciar a biodisponibilidade do fármaco e, conseqüentemente, a resposta ao tratamento.

Objetivos: Avaliar a associação de polimorfismos em genes de proteínas transportadoras do MI com marcadores de resposta ao tratamento com este fármaco em pacientes com LMC.

Material e Métodos: Em amostras de DNA de sangue periférico de 182 pacientes com LMC e tratados com MI em dois centros de referência do Rio Grande do Sul, foi investigado o impacto de seis SNPs em três genes da família ABC sobre os níveis do MI no plasma e no cabelo e com parâmetros de resposta citogenética e molecular ao tratamento. A genotipagem dos SNPs foi realizada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real. **Resultados:** Não foram encontradas associações significativas entre os polimorfismos analisados e os desfechos propostos. **Conclusão:** A farmacogenética pode vir a ser uma abordagem para a otimização da terapia com MI na LMC, porém muitos fatores ainda precisam ser esclarecidos para que ela possa ser introduzida na prática clínica.

Palavras-chave: Leucemia Mieloide Crônica, Mesilato de Imatinibe, Farmacogenética, Transportadores ABC

Abstract

Introduction: Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disease caused by the presence of the Philadelphia chromosome (Ph). Imatinib mesylate (IM) was the first targeted therapy for CML, representing a breakthrough in clinical practice. However, some patients present resistance or intolerance to IM. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes responsible for coding drug transporter proteins, such as the ATP-Binding Cassette family *ABCB1* (rs3213619, rs11228503, rs2032582, rs1045642), *ABCG2* (rs2231142) e *ABCC4* (rs9561765), can influence the bioavailability of the drug and thus treatment response. **Objective:** To assess the association of polymorphisms in transporter protein genes with markers of response to treatment with IM in patients with CML. **Material and Methods:** Peripheral blood DNA samples from 182 patients with CML and treated with IM were collected in two reference centers of Rio Grande do Sul. We investigated the impact of six SNPs in three genes of the ABC family. Genotyping was performed by real time polymerase chain reaction (qPCR). **Results:** There were no significant associations for the polymorphisms analyzed and the suggested outcomes. **Conclusion:** Pharmacogenetics may prove to be an approach to optimize therapy with IM in CML, but many factors need to be clarified so it can be used in clinical practice.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, Mesylate Imatinib, Pharmacogenetic, ABC transporter

1 Introdução

1.1 Neoplasias Mieloproliferativas e a Leucemia Mieloide Crônica

As neoplasias da hematopoese são proliferações clonais, originadas de células que sofreram mutações na sequência de bases do DNA, rearranjos cromossômicos com expressão inadequada de oncogenes e/ou inibição de mecanismos de controle proliferativo. Na maioria das vezes, a etiologia do evento de alteração crítica do genoma permanece desconhecida, podendo ser apenas um acidente randômico. Essas neoplasias podem ser classificadas de acordo com critérios morfológicos, imunohistoquímicos e moleculares em leucemias agudas, neoplasmas mieloproliferativos, neoplasmas mielodisplásicos, síndromes mielodisplásicas, neoplasmas de precursores linfoides, neoplasias linfoides de células maduras (células B, T ou NK) e gamopatias monoclonais (FADERL *et al.*, 1999; ZERBINI *et al.*, 2008; FAILACE *et al.*, 2011).

As células neoplásicas amadurecem de forma incompleta, mostrando-se inapropriadas às funções fisiológicas, e desenvolvem desvios funcionais deletérios ao microambiente, à proliferação das células normais remanescentes e à imunologia do organismo como um todo. Muitas dessas células têm sobrevida superior à normal, outras têm vantagens proliferativas e, paradoxalmente, há as que mostram um exagero apoptótico. Entretanto, em conjunto, essas proliferações resultam em um acúmulo de células neoplásicas que invadem a medula óssea, substituindo total ou parcialmente a mielopoese normal (FADERL *et al.*, 1999; FAILACE *et al.*, 2011; CHEREDA e MELO, 2015).

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa leucêmica onde há um número excessivo de leucócitos circulantes, geralmente neutrófilos e seus precursores, porém ocasionalmente eosinófilos ou basófilos (SAWYERS, 1999; LACKIE, 2010; COMERT *et al.*, 2013). Representa mundialmente de 15 a 20% dos novos casos de leucemias em adultos (COMERT *et al.*, 2013; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015), sendo mais comum em pacientes de meia-idade e idosos, porém todas as faixas etárias podem ser afetadas, inclusive crianças, apesar de representarem menos de 10% dos casos (BORTOLHEIRO e CHIATONE, 2008; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Os sintomas típicos são fadiga, anorexia, perda de peso, sensação de peso no abdômen, sangramento, púrpura, esplenomegalia, leucocitose, anemia e trombocitose. Entretanto, cerca

de 40% dos pacientes são assintomáticos, sendo o diagnóstico realizado em exames de rotina, como a anamnese e o hemograma (FADERL *et al.*, 1999; SAWYERS, 1999; INCA, 2003; D'ANTONIO, 2005).

Os homens apresentam uma incidência maior da doença, com uma proporção de 1,3-1,5 para 1 mulher. Já a idade ao diagnóstico varia conforme o continente. Por exemplo, na África e na América Latina, os pacientes são quase 15 anos mais jovens quando comparados com a Austrália (mediana de 55 anos ao diagnóstico), Europa e Estados Unidos (QUINTAS-CARDAMA e CORTES, 2006; MENDIZABAL *et al.*, 2013). Até o momento, o único fator de risco conhecido para LMC é a exposição a altas doses de radiação ionizante (CORSO *et al.*, 1995; CHEREDA e MELO, 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

1.1.1 O Cromossomo Filadélfia

A LMC é caracterizada por uma translocação recíproca entre parte do gene *bcr* (do inglês, *breakpoint cluster region*) da região q11 do cromossomo 22 e parte do gene *abl* (do inglês, *Abelson leukemia virus*) do cromossomo 9, localizado na região q34, formando o cromossomo filadélfia (Ph) (LACKIE, 2010; FERDINAND *et al.*, 2012; YEUNG e HUGHES, 2012; COMERT *et al.*, 2013), sendo a primeira alteração cromossômica associada a um tipo específico de neoplasia (NOWELL e HUNGERFORD, 1960). A formação desse oncogene quimérico codifica uma proteína tirosina quinase de 210-kDa desregulada, dando origem a uma ativação aberrante de vias de sinalização celular. Ainda, ela é correlacionada a mudanças na dependência de fatores de crescimento, na apoptose, na proliferação e adesão celular, afetando ainda o reparo do DNA (DALEY *et al.*, 1990; SAWYERS, 1999; FERDINAND *et al.*, 2012; CHEREDA e MELO, 2015). Portanto, configura a causa da transformação maligna na LMC ao direcionar sua patogênese e alterar quase todos os processos celulares (COMERT *et al.*, 2013; CHEREDA e MELO, 2015).

O cromossomo Ph está presente em 95% dos pacientes, sendo que os outros 5% apresentam translocações variadas e complexas, envolvendo outros cromossomos (HOCHHAUS *et al.*, 2000; SCHOCH *et al.*, 2002; BACCARANI *et al.*, 2009). Também se verifica a existência de pacientes com LMC cromossomo Ph negativo, classificados como LMC atípica, apresentando, contudo, translocações variantes complexas que resultam nesta mesma alteração (ATHENS, 1998). Pacientes com LMC Ph⁺ apresentam evolução clínica

melhor, sobrevida maior e prognóstico mais favorável quando comparados a pacientes LMC Ph- (MONTENEGRO *et al.*, 2008).

1.1.2 Evolução e Prognóstico da LMC

A LMC possui um curso clínico de três estágios evolutivos (Tabela 1). Sem intervenção terapêutica, a LMC progride de uma fase crônica (FC) para uma crise blástica (CB), geralmente após 3 a 5 anos, com frequência via uma fase acelerada. Cerca de 85% dos casos são diagnosticados na FC (CHEREDA e MELO, 2015).

A CB quase que invariavelmente leva o paciente ao óbito através de infecções, trombose ou anemia, como consequência da falência da medula óssea devido à falta de diferenciação celular e uma infiltração massiva de blastos (CHEREDA e MELO, 2015).

Tabela 1. Estágios evolutivos da LMC, adaptado de BACCARANI *et al.*, 2009

Fase da Doença	Definição
Fase Crônica (FC)	Geralmente assintomática; Leucocitose com desvio à esquerda, com predomínio de neutrófilos; Ausência de critérios para FA e CB
Fase Acelerada (FA)	Podem aparecer sintomas como febre, anorexia, com consequente perda de peso; Presença de 15 a 30% de blastos no sangue periférico e/ou na medula óssea; Basofilia acima de 20% no sangue periférico; Trombocitopenia ($\leq 100 \times 10^9/L$); Evolução clonal
Crise Blástica (CB)	Comportamento clínico de uma leucemia aguda; Mais de 30% de blastos no sangue periférico e/ou na medula óssea; Proliferação de blastos fora da medula óssea e baço.

O prognóstico da LMC está diretamente ligado a quão bem e quão rápido o paciente responderá ao tratamento escolhido. Alguns fatores de mau prognóstico são (BACCARANI *et al.*, 2013; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015):

- I. Diagnóstico em FA ou CB;
- II. Presença de esplenomegalia;
- III. Idade avançada;
- IV. Alterações cromossômicas adicionais ao Ph+;

1.1.3 A Terapêutica da LMC e o Mesilato de Imatinibe

Até o final da década de 90, a terapêutica para a LMC estava limitada à quimioterapia convencional com agentes como a hidroxiureia (HU), ao tratamento com interferon- α (IFN- α), combinado ou não à citarabina (Ara-C), e ao transplante alogênico de células precursoras hematopoiéticas. Todas essas opções, apesar de acarretarem uma melhora na sobrevida e na qualidade de vida dos pacientes, apresentam restrições com respeito à eficácia e tolerabilidade (MOREIRA e BOECHAT, 2009; MOSHFEGHI *et al.*, 2013). No auge do tratamento com IFN- α a mediana de sobrevida dobrou de 3 para 6 anos (KANTARJIAN *et al.*, 2012; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

O tratamento com inibidor de tirosina quinase (TKI) mesilato de imatinibe (MI ou STI571), aprovado em 2001 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) com o nome comercial Gleevec® (Novartis), foi a primeira terapia-alvo licenciada para doentes na FC da LMC, resistentes, refratários ou intolerantes ao IFN- α (TALPAZ, 2002; MOREIRA e BOECHAT, 2009). O MI é uma pequena molécula que inibe o ponto de quebra da região Abelson da proteína tirosinoquinase, seja *in vitro*, em nível celular ou *in vivo*. Como resultado, o composto inibe seletivamente a proliferação e induz a apoptose em linhagens celulares Bcr-Abl positivas bem como em células leucêmicas novas de pacientes com LMC Ph+ (SAÚDE, 2008). Esse mecanismo de ação é capaz de reduzir a frequência de progressão para CB e eliminar os sintomas da FC.

O uso de MI obteve melhores resultados na resposta e sobrevivência quando comparado com as terapias anteriores (Ara-C e IFN- α), chegando a 93% em 8 anos (WHITE *et al.*, 2007; KANTARJIAN *et al.*, 2009; FERDINAND *et al.*, 2012; YEUNG e HUGHES, 2012). Ainda assim, a resistência ao MI é observada em aproximadamente 25 a 35% dos casos, podendo culminar em uma troca de tratamento. Atualmente, o MI é o fármaco de

primeira linha para pacientes com diagnóstico de LMC e já existem TKIs de gerações mais novas para manejar casos que apresentem perda de resposta ou até mesmo uma baixa tolerabilidade (EADIE *et al.*, 2014; CHEREDA e MELO, 2015; POLILLO *et al.*, 2015).

1.1.4 O Monitoramento da LMC

O acompanhamento da LMC se dá através de *guidelines* estabelecidos pela *European Leukemia Net* (ELN), uma rede interdisciplinar de pesquisadores dedicada ao desenvolvimento da excelência na terapia de leucemias e suas curas. Os critérios são definidos a partir de quão bem e em que espaço de tempo o fármaco é capaz de controlar a doença e, através de ensaios clínicos, os pontos de corte são definidos. Quanto ao controle da doença, a resposta do paciente pode ser monitorada em três grandes níveis (BACCARANI *et al.*, 2009; BACCARANI *et al.*, 2013):

- I. **Hematológico**, onde se espera um hemograma com plaquetas abaixo de $450 \times 10^9/L$, diferencial sem granulócitos imaturos e com menos de 5% de basófilos, além de baço não palpável, classificado então como “resposta hematológica completa”. Esse hemograma deve ser realizado a cada duas semanas até essa resposta ser atingida e confirmada, e depois a cada três meses ou conforme a necessidade;
- II. **Citogenético**, onde, através de um cariótipo a partir de células da medula óssea do paciente, são analisadas as metáfases Ph⁺ em relação ao número de metáfases normais, e pelo menos 20 metáfases devem ser contabilizadas para viabilizar o resultado. O esperado é zerar o percentual de células Ph⁺, estado definido como “Resposta Citogenética Completa” (RCC). Essa análise deve ser realizada a cada seis meses até a resposta ser atingida e confirmada, e depois uma vez por ano;
- III. **Molecular**, onde os transcritos *BCR-ABL1* de sangue periférico são amplificados através de *Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*” (qRT-PCR). Quando são encontrados 0,1% ou menos de transcritos, o paciente encontra-se no estado definido como “Resposta Molecular Maior” (RMM ou RM^{3.0}) – pois representa a redução de 3 logs na escala logarítmica). Já quando nenhum transcrito é detectado, o paciente encontra-se num estágio de “Leucemia Molecularmente Não-Detectável” (anteriormente chamada de “Resposta Molecular Completa”). O exame é realizado a cada três meses, e é importante avaliar a capacidade do

laboratório escolhido em atingir a sensibilidade necessária para a detecção dos transcritos de *BCR-ABL1* e em medir os números absolutos de cópias do gene controle.

A partir desses parâmetros, é necessário acompanhar o paciente de forma que ele atinja essas respostas no período adequado, de forma a obter o melhor prognóstico possível. Um resumo da versão de 2013 pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2. Definições de respostas ao MI em pacientes com LMC avaliadas aos três, seis, doze e dezoito meses de tratamento, segundo o *European Leukemia Net*, adaptado de BACCARANI *et al.*, 2013

	Resposta Ótima	Sinais de Alerta	Falha no tratamento
3 meses	$BCR-ABL1 \leq 10\%$ e/ou $Ph+ \leq 35\%$	$BCR-ABL1 > 10\%$ e/ou 36–95% $Ph+$	Sem resposta hematológica e/ou $Ph+ > 35\%$
6 meses	$BCR-ABL1 \leq 1\%$ e/ou $Ph+ = 0$	1–10% $BCR-ABL1$ e/ou 1 – 35% $Ph+$	$BCR-ABL1 > 10\%$ e/ou 36 – 95% $Ph+$
12 meses	$BCR-ABL1 \leq 0,1\%$	0,1–1% $BCR-ABL1$	$BCR-ABL1 > 1\%$ e/ou $Ph+ > 0$
Em diante	$BCR-ABL1 \leq 0,1\%$	Aberrações cromossômicas com $Ph-$ (ex: deleção do cromossomo 7)	Perda de resposta hematológica; Perda de resposta citogenética; Perda confirmada de RMM; Aberrações cromossômicas com $Ph+$

Ph: Cromossomo filadélfia; RMM: Resposta molecular maior

1.2 A Farmacocinética do Mesilato de Imatinibe

Após sua absorção, o metabolismo do MI é realizado pelo fígado, através das enzimas do citocromo P-450 em suas isoformas 3A4 e 3A5, ambas de natureza polimórfica, e com potencial de serem inibidas ou induzidas por outras substâncias (COHEN *et al.*, 2002). Elas

são as principais responsáveis por converter o MI em seu metabólito ativo, o CGP 74588. Em concentrações compatíveis com a prática clínica, o MI se liga a proteínas plasmáticas, como a albumina e a α -glicoproteína (PENG *et al.*, 2004). Sua excreção ocorre principalmente nas fezes, e de uma forma menor por via urinária (EECHOUTE *et al.*, 2011). A Figura 1 esquematiza de maneira simples a ação farmacocinética e farmacodinâmica do MI.

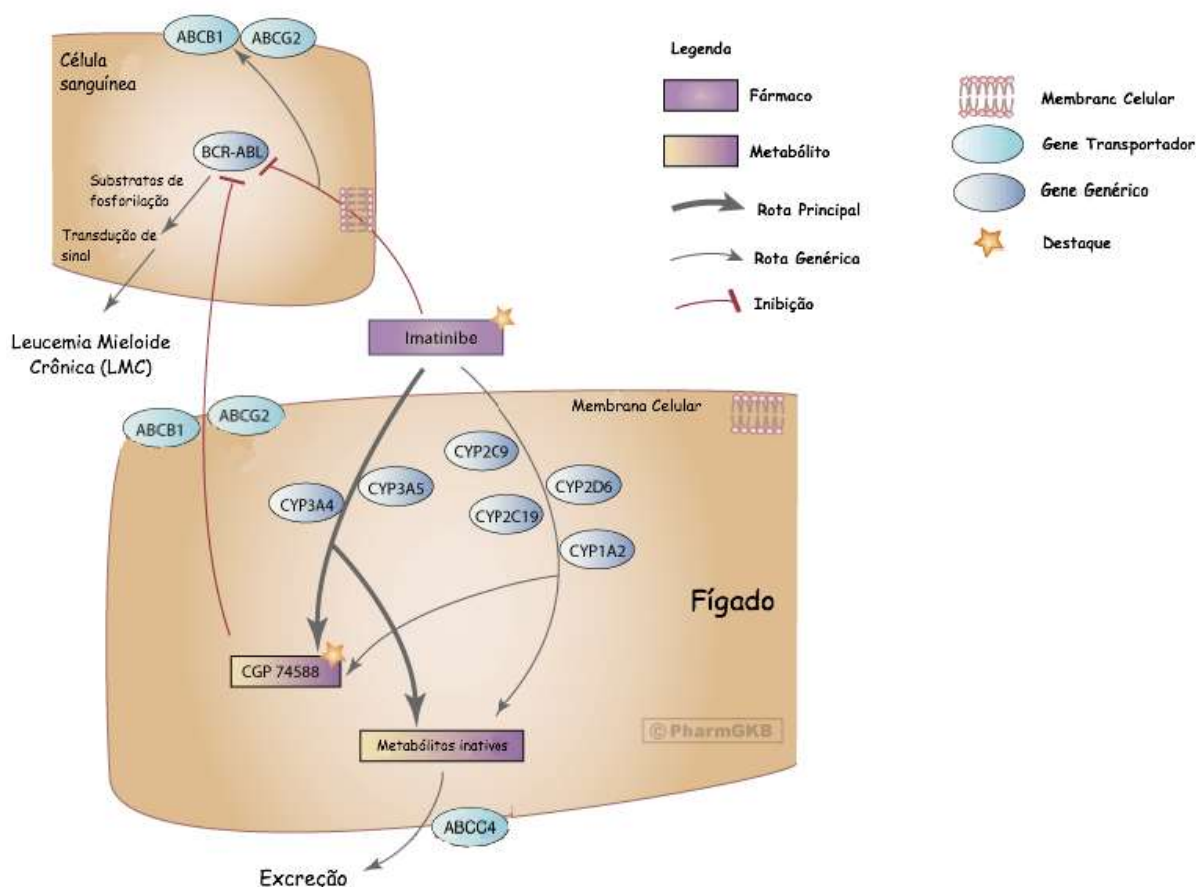


Figura 1. Simplificação esquemática da ação farmacocinética e farmacodinâmica do MI na LMC. Adaptado de: PHARMGKB

Estudos realizados nos últimos anos sugerem a relevância clínica da manutenção da concentração plasmática do MI dentro de um intervalo terapêutico. Observou-se que um baixo índice de resposta, ou um menor intervalo de tempo para progressão, poderiam ocorrer caso a concentração plasmática do fármaco ficasse abaixo de 1.000 ng/mL, aproximadamente (DEMETRI *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2009; TAKAHASHI, WAKITA, *et al.*, 2010). Concentrações estáveis acima desse valor são relativamente fáceis de se conseguir com o tratamento padrão (400mg/dia). Entretanto, em um grupo menor de pacientes, não é possível atingir essa concentração com essa dose (EECHOUTE *et al.*, 2011). Possíveis causas

responsáveis por essa variação podem vir a ter importância clínica e, portanto, devem ser investigadas (DULUCQ e KRAJINOVIC, 2010; RUMJANEK *et al.*, 2013; POLILLO *et al.*, 2015).

Outras matrizes biológicas estão sendo estudadas para melhor avaliar a concentração plasmática de MI nos pacientes com LMC, como o sangue capilar seco em papel filtro e o cabelo, ambas metodologias validadas pelo presente grupo de pesquisa (ANTUNES *et al.*, 2015; CAPRON *et al.*, 2016). Essa poderia ser uma estratégia útil para esse monitoramento, pois ambas possuem a vantagem de serem mais fáceis e baratas de coletar e transportar do que o plasma, tornando essa informação mais acessível para a clínica. Em especial no cabelo, ainda existe a vantagem de ser um marcador que reflete uma maior janela de exposição ao fármaco; enquanto o plasma representa os últimos dias de exposição (NETTLES *et al.*, 2006), o cabelo possui uma janela de semanas a meses (BEUMER *et al.*, 2001); tornando-o um marcador mais útil para questionar aderência ao tratamento.

A resistência aos fármacos constitui um desafio no tratamento do câncer. Para superá-la é essencial compreender os mecanismos (genéticos e ambientais) por trás desse fenômeno, obtendo estratégias para prolongar a eficácia da terapia com MI. Dentre os fatores que podem ser relevantes nas diferenças observadas na farmacocinética do tratamento com MI, podemos destacar a variabilidade de expressão e diferenças na atividade das proteínas transportadoras de fármacos (DULUCQ e KRAJINOVIC, 2010; EECHOUTE *et al.*, 2011; POLILLO *et al.*, 2015).

1.2.1 Proteínas de Efluxo da Superfamília ABC e a Influência da Farmacogenética na Terapia com MI

Em humanos, os transportadores ABC (do inglês, “*ATP-binding cassette*”) são uma grande família de complexos proteicos dependentes de ATP. Estão localizados na membrana celular e são classificados em sete sub-famílias de acordo com as similaridades em suas sequências genéticas (WEEN *et al.*, 2015). Seus representantes incluídos neste estudo estão resumidos na Tabela 3. São expressos na maioria das barreiras celulares, contribuindo para a homeostasia do organismo através da regulação do movimento de metabólitos endógenos e do controle da permeabilidade de fármacos e toxinas, sendo também um mecanismo de defesa da célula (BRUHN e CASCORBI, 2014; CHEN *et al.*, 2015; NIGAM, 2015). Esses transportadores utilizam a hidrólise do ATP e subsequente fosforilação do transportador como

uma fonte de energia, possibilitando um transporte ativo de substratos através da membrana celular (EECHOUTE *et al.*, 2011; NIGAM, 2015).

No cenário do câncer, esses transportadores estão expressos em grandes quantidades, dando para a célula tumoral uma capacidade reforçada de efluxo contra quimioterápicos, e outros agentes citotóxicos – tanto endógenos como exógenos (DULUCQ e KRAJINOVIC, 2010; CHEN *et al.*, 2015). Mecanismos como esse têm sido sugeridos como fortes implicações tanto de resistência primária como secundária ao tratamento, prejudicando sua eficácia (EADIE *et al.*, 2014). Na LMC, as diferenças no nível de atividade desses transportadores entre leucócitos normais e os que expressam o *BCR-ABL1* ainda não são claras, porém é possível que sejam diferentes. Ainda, a proporção desses dois tipos celulares no sangue periférico de cada paciente é distinta (NAMBU *et al.*, 2011).

Em farmacogenética atribui-se uma parte das diferenças interindividuais na eficácia de terapias medicamentosas a variações no genoma dos indivíduos em tratamento, as quais são representadas, em sua maioria, pelos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), onde alterações de uma única base no DNA poderiam alterar o fenótipo do paciente. A presença de SNPs nos genes de transportadores em pacientes com LMC poderia modular os níveis de metabólitos de importância fisiopatológica, e essas interações poderiam ajudar a explicar a variabilidade na apresentação clínica e no prognóstico da doença (NIGAM, 2015; POLILLO *et al.*, 2015).

Tabela 3. Apresentação dos genes estudados no presente trabalho.

Gene	Sinonímia ^a	Localização Cromossômica ^a	Expressão ^b
<i>ABCB1</i>	ATP-Binding Cassette, Sub-Family B (MDR/TAP), Member 1; Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1); P-Glycoprotein 1.	7q21.12	Fígado; Rins; Barreira hematoencefálica; Linfócitos; Células tronco hematopoéticas.

<i>ABCG2</i>	ATP-Binding Cassette, Sub-Family G, Member 2; Breast Cancer Resistance Protein (BCRP).	4q22	Fígado; Intestino delgado; Rins; Placenta; Barreira hematoencefálica; Tecido mamário; Células mieloides imaturas; Células tronco leucêmicas.
<i>ABCC4</i>	ATP-Binding Cassette, Sub-Family C, Member 4; Multidrug resistance- associated protein 4 (MRP4); Multi-Specific Organic Anion Transporter B.	13q32	Fígado

^a Fonte: ENTREZGENE

^b Conforme revisado em BRUHN e CASCORBI, 2014; HU *et al.*, 2008; MALIEPAARD *et al.*, 2001; DOHSE *et al.*, 2010 e COORAY *et al.*, 2002

1.2.1.1 *ABCB1*

Pela sua relevância na esfera da resistência a quimioterápicos, o *ABCB1* é um dos transportadores mais estudados na classe dos mamíferos, desde seu nível atômico até sua influência na clínica. Nos primeiros estudos de farmacogenética e farmacocinética já se mostrou evidente que a proteína produzida por esse gene, conhecida como MDR1 (proteína de resistência a múltiplas drogas -1) ou PGP (glicoproteína P), estava envolvida na extrusão do MI para fora das células Ph positivas (NIGAM, 2015; POLILLO *et al.*, 2015).

ANGELINI, SOVERINI, *et al.* (ANGELINI, SOVERINI, *et al.*, 2013) avaliaram, em uma amostra de 189 pacientes recém diagnosticados com LMC de maioria caucasiana (82,5%), a associação de SNPs nesse gene e a resposta ao tratamento. Houve uma associação negativa entre os pacientes com o genótipo T/T para o polimorfismo *ABCB1* 3435C>T (rs1045642) e o alcance de RMC nos pacientes caucasianos. Nesse mesmo estudo não foram

encontradas associações entre o SNP *ABCB1* -129 T>C (rs3213619), embora os autores relatem como relevante a associação entre o genótipo T/T e RMC, porém sem significância estatística ($p=0,07$).

Em um estudo de caso e controle com 140 pacientes iranianos realizado por (SALIMIZAND *et al.*, 2015), indivíduos portadores do genótipo 3435 T/T apresentaram risco aumentado do próprio desenvolvimento da LMC quando comparados aos controles, sendo o alelo T considerado então um alelo de risco para a doença. Outros trabalhos não conseguiram demonstrar associação alguma para esse polimorfismo (SEONG *et al.*, 2013; SHINOHARA *et al.*, 2013; AU *et al.*, 2014), destacando que estes estudos foram conduzidos em amostras de pacientes asiáticos.

Um estudo francês com 90 pacientes realizado por Duluc *et al.* (DULUCQ *et al.*, 2008), sobre polimorfismos do gene *ABCB1*, associou o genótipo T/T do SNP *ABCB1* 1236 C>T (rs1128503) a uma melhor taxa de RMM. Alguns anos depois, Au *et al.* (AU *et al.*, 2014), em uma amostra de 215 pacientes oriundos da Malásia, demonstraram uma associação entre o genótipo 1236CC e a resistência ao tratamento com MI em pacientes com LMC, complementando o resultado do estudo anteriormente citado.

Em uma meta-análise compreendendo a combinação de 12 estudos realizada por Zheng *et al.* (ZHENG *et al.*, 2015), o alelo G do SNP *ABCB1* 2677 G>T/A (rs2032582) foi considerado preditor de uma pior resposta para pacientes com LMC tratados com MI. Corroborando os resultados expostos anteriormente, essa meta-análise confirmou a associação do alelo 3435T com pior resposta ao tratamento. Para pacientes oriundos de regiões asiáticas, o genótipo 1236C/C foi associado com melhor resposta.

1.2.1.2 *ABCG2*

Também de notável importância para os estudos de resistência a xenobióticos, o gene *ABCG2* foi primeiramente descrito em 1998 como um grande mediador de resistência à doxorubicina na linhagem celular MCF-7, de câncer de mama humano, sendo então nomeado como “Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)” (DOYLE *et al.*, 1998). Em 2004, Houghton *et al.* (HOUGHTON *et al.*, 2004) sugeriram pela primeira vez que o MI inibe a atividade deste transportador, utilizando modelo *in vitro*. Em um outro estudo pré-clínico, Burger e Nooter (BURGER e NOOTER, 2004) sugeriram que variações em sua atividade poderiam influenciar nas concentrações plasmáticas do MI e, logo, a sua eficácia.

Em um estudo de Takahashi *et al.* (TAKAHASHI, MIURA, *et al.*, 2010) com 67 pacientes asiáticos, o genótipo C/C do polimorfismo *ABCG2* 421 C>A (rs2232142) foi associado com menores concentrações de MI no plasma ajustadas pela dose. Reforçando esse achado, Au *et al.* (AU *et al.*, 2014) e Seong *et al.* (SEONG *et al.*, 2013), ambos estudos asiáticos (embora o primeiro da Malásia e o segundo da Coreia do Sul), associaram este mesmo genótipo com resistência ao tratamento e menores taxas de resposta molecular, respectivamente. Esse conjunto de evidências sugere que o polimorfismo *ABCG2* 421 C>A pode ser um candidato em potencial para o futuro da medicina personalizada, ainda que apenas nos pacientes asiáticos.

1.2.1.3 *ABCC4*

Até o momento, poucos estudos foram conduzidos relacionando o tratamento com o MI e o gene *ABCC4*, e todos direcionados para a terapêutica de tumores gastrointestinais (TGI), outra condição que utiliza o mesmo fármaco. Esse transportador é expresso na membrana basolateral dos hepatócitos, bombeando o MI do fígado para a circulação sistêmica. Inclusive, já foi demonstrado *in vitro* de que o MI seria um substrato desse transportador (HU *et al.*, 2008).

Angelini *et al.* (ANGELINI, PANTALEO, *et al.*, 2013) ao investigarem um painel de polimorfismos em um grupo de 54 pacientes caucasianos com um tipo específico de TGI e tratados com MI (400mg/dia, assim como na LMC), encontraram uma associação entre o genótipo A/G do SNP *ABCC4* 3870+3616 G>A (rs9561765) e um menor tempo de progressão da doença. É importante ressaltar que o genótipo GG não foi encontrado na população desse estudo e os próprios autores reforçam que o tempo para progressão pode ser influenciado por outros fatores clínicos e genéticos.

Ressaltamos que as diferenças interindividuais de resposta ao tratamento são determinadas por um conjunto de fatores que ainda não são conhecidos ou compreendidos em sua totalidade. Frente ao exposto, foram definidos os objetivos deste estudo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação de polimorfismos em genes de proteínas transportadoras do mesilato de imatinibe com marcadores de resposta ao tratamento com este fármaco em pacientes com leucemia mieloide crônica.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe dos pacientes através de dados citogenéticos e moleculares;
- Verificar a existência de associação entre os polimorfismos *ABCB1* 3435 C>T (rs1045642), *ABCB1* 1236 C>T (rs1128503), *ABCB1* 2677 G>T/A (rs2032582), *ABCB1* -129 T>C (rs3213619), *ABCG2* 421 C>A (rs2232142), e *ABCC4* 3870+3616 G>A (rs9561765) com resposta ao tratamento;
- Investigar a associação entre os referidos polimorfismos e os níveis plasmáticos e capilar de imatinibe.

3 Referências Bibliográficas

AMERICAN CANCER SOCIETY. What are the key statistics about chronic myeloid leukemia? <<http://www.cancer.org/cancer/leukemiachronicmyeloidcml/detailedguide/leukemia-chronic-myeloid-myelogenous-key-statistics>> Acesso em: 25/10/2015.

ANGELINI, S. et al. Polymorphisms in OCTN1 and OCTN2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy. **Pharmacol Res**, v. 68, n. 1, p. 1-6, Feb 2013. ISSN 1096-1186 (Electronic) 1043-6618 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23127916>>.

ANGELINI, S. et al. Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. **Haematologica**, v. 98, n. 2, p. 193-200, Feb 2013. ISSN 1592-8721 (Electronic) 0390-6078 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22875622>>.

ANTUNES, M. V. et al. DBS sampling in imatinib therapeutic drug monitoring: from method development to clinical application. **Bioanalysis**, v. 7, n. 16, p. 2105-17, 2015. ISSN 1757-6199 (Electronic) 1757-6180 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26327189>>.

ATHENS, J. W. Leucemia Mieloide Crônica. In: (Ed.). **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, v.2, 1998. cap. 75, p.2169-2197.

AU, A. et al. Association of genotypes and haplotypes of multi-drug transporter genes ABCB1 and ABCG2 with clinical response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. **Biomed Pharmacother**, v. 68, n. 3, p. 343-9, Apr 2014. ISSN 1950-6007 (Electronic) 0753-3322 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581936>>.

BACCARANI, M. et al. Response definitions and European Leukemianet Management recommendations. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 22, n. 3, p. 331-41, Sep 2009. ISSN 1532-1924 (Electronic) 1521-6926 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19959084>.

BACCARANI, M. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 872-84, Aug 8 2013. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23803709>.

BEUMER, J. H.; BOSMAN, I. J.; MAES, R. A. Hair as a biological specimen for therapeutic drug monitoring. **Int J Clin Pract**, v. 55, n. 6, p. 353-7, Jul-Aug 2001. ISSN 1368-5031 (Print) 1368-5031 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11501221> >.

BORTOLHEIRO, T. C.; CHIATONE, C. S. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 30, n. 1, p. 3-7, 2008.

BRUHN, O.; CASCORBI, I. Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 10, n. 10, p. 1337-54, Oct 2014. ISSN 1744-7607 (Electronic) 1742-5255 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25162314> >.

BURGER, H.; NOOTER, K. Pharmacokinetic resistance to imatinib mesylate: role of the ABC drug pumps ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) in the oral bioavailability of imatinib. **Cell Cycle**, v. 3, n. 12, p. 1502-5, Dec 2004. ISSN 1551-4005 (Electronic) 1551-4005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611623> >.

CAPRON, A. et al. First report of imatinib measurement in hair: Method development and preliminary evaluation of the relation between hair and plasma concentrations with therapeutic response in chronic myeloid leukemia. **Clin Chim Acta**, v. 453, p. 42-47, Dec 3 2015. ISSN 1873-3492 (Electronic) 0009-8981 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26657979> >.

CHEN, Z. et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade. **Cancer Lett**, Oct 20 2015. ISSN 1872-7980 (Electronic) 0304-3835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26499806> >.

CHEREDA, B.; MELO, J. V. Natural course and biology of CML. **Ann Hematol**, v. 94, n. Suppl 2, p. S107-S121, 2015.

COHEN, M. H. et al. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 5, p. 935-42, May 2002. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12006504 >.

COMERT, M.; BARAN, Y.; SAYDAM, G. Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor era. **Am J Blood Res**, v. 3, n. 3, p. 191-200, 2013. ISSN 2160-1992 (Electronic) 2160-1992 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23997982 >.

COORAY, H. C. et al. Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. **Neuroreport**, v. 13, n. 16, p. 2059-63, Nov 15 2002. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438926> >.

CORSO, A. et al. Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients. **Ann Hematol**, v. 70, n. 2, p. 79-82, Feb 1995. ISSN 0939-5555 (Print) 0939-5555 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7880928> >.

D'ANTONIO, J. Chronic myelogenous leukemia. **Clin J Oncol Nurs**, v. 9, n. 5, p. 535-8, Oct 2005. ISSN 1092-1095 (Print) 1092-1095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16235580 >.

DALEY, G. Q.; VAN ETTEN, R. A.; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. **Science**, v. 247, n. 4944, p. 824-30, Feb 16 1990. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2406902> >.

DEMETRI, G. D. et al. Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 19, p. 3141-7, Jul 1 2009. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19451435> >.

DOHSE, M. et al. Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. **Drug Metab Dispos**, v. 38, n. 8, p. 1371-80, Aug 2010. ISSN 1521-009X (Electronic) 0090-9556 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20423956> >.

DOYLE, L. A. et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 26, p. 15665-70, Dec 22 1998. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861027> >.

DULUCQ, S. et al. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 2024-7, Sep 1 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524988> >.

DULUCQ, S.; KRAJINOVIC, M. The pharmacogenetics of imatinib. **Genome Med**, v. 2, n. 11, p. 85, 2010. ISSN 1756-994X (Electronic) 1756-994X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122163> >.

EADIE, L. N.; HUGHES, T. P.; WHITE, D. L. Interaction of the efflux transporters ABCB1 and ABCG2 with imatinib, nilotinib, and dasatinib. **Clin Pharmacol Ther**, v. 95, n. 3, p. 294-306, Mar 2014. ISSN 0009-9236.

EECHOUTE, K. et al. Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 3, p. 406-15, Feb 1 2011. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163869> >.

ENTREZGENE. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> >. Acesso em: 03 de outubro de 2015.

FADERL, S. et al. The biology of chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 341, n. 3, p. 164-72, Jul 15 1999. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403855> >.

FAILACE, R.; FERNANDES, F. B.; FAILACE, R. **Hemograma - manual de interpretação**. Porto Alegre: Artmed 2011.

FERDINAND, R. et al. Treatments for chronic myeloid leukemia: a qualitative systematic review. **J Blood Med**, v. 3, p. 51-76, 2012. ISSN 1179-2736 (Electronic) 1179-2736 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22915985 >.

HOCHHAUS, A. et al. Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. **Leukemia**, v. 14, n. 6, p. 998-1005, Jun 2000. ISSN 0887-6924 (Print) 0887-6924 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10865964 >.

HOUGHTON, P. J. et al. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. **Cancer Res**, v. 64, n. 7, p. 2333-7, Apr 1 2004. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15059881> >.

HU, S. et al. Interaction of imatinib with human organic ion carriers. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 10, p. 3141-8, May 15 2008. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483382> >.

INCA. Leucemia Mielóide Crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 1, p. 5-8, 2003.

KANTARJIAN, H. et al. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. **Blood**, v. 119, n. 9, p. 1981-7, Mar 1 2012. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228624> >.

KANTARJIAN, H. M. et al. Efficacy of imatinib dose escalation in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. **Cancer**, v. 115, n. 3, p. 551-60, Feb 1 2009. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19117345 >.

LACKIE, J. **Dictionary of Biomedicine**. Dictionary of Biomedicine. New York Oxford University Press Inc. 2010.

MALIEPAARD, M. et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. **Cancer Res**, v. 61, n. 8, p. 3458-64, Apr 15 2001. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309308> >.

MENDIZABAL, A. M.; GARCIA-GONZALEZ, P.; LEVINE, P. H. Regional variations in age at diagnosis and overall survival among patients with chronic myeloid leukemia from low and middle income countries. **Cancer Epidemiol**, v. 37, n. 3, p. 247-54, Jun 2013. ISSN 1877-783X (Electronic) 1877-7821 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411044> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA Nº 649, DE 11 DE NOVEMBRO DE 2008**. Ministério da Saúde 2008.

MONTENEGRO, V. S.; DOS SANTOS, V. M. V. O.; VEITH, M. Análise citogenética na leucemia mielóide crônica. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 10, n. 3, p. 5-12, 2008.

MOREIRA, R. B.; BOECHAT, L. Proposta de Acompanhamento Farmacoterapêutico em Leucemia Mieloide Crônica: Modelo de Abordagem Metodológica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 4, p. 375-8, 2009.

MOSHFEGHI, K. et al. Comparison of effectiveness and safety of Iranian-made vs. Indian-made imatinib in treatment of chronic myeloid leukemia. **Adv Biomed Res**, v. 2, p. 17, 2013. ISSN 2277-9175 (Electronic) 2277-9175 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23930262 >.

NAMBU, T. et al. Association of SLC01B3 polymorphism with intracellular accumulation of imatinib in leukocytes in patients with chronic myeloid leukemia. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 1, p. 114-9, 2011. ISSN 1347-5215 (Electronic) 0918-6158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212528> >.

NETTLES, R. E. et al. Marked intraindividual variability in antiretroviral concentrations may limit the utility of therapeutic drug monitoring. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 8, p. 1189-96, Apr 15 2006. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16575741> >.

NIGAM, S. K. What do drug transporters really do? **Nat Rev Drug Discov**, v. 14, n. 1, p. 29-44, Jan 2015. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25475361> >.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, v. 132, p. 1497-1501, 1960.

PENG, B. et al. Absolute bioavailability of imatinib (Glivec) orally versus intravenous infusion. **J Clin Pharmacol**, v. 44, n. 2, p. 158-62, Feb 2004. ISSN 0091-2700 (Print) 0091-2700 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14747424> >.

PHARMGKB. Disponível em: < <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA164713427> >. Acesso em: 16 de fevereiro de 2016.

POLILLO, M. et al. Pharmacogenetics of BCR/ABL Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 9, p. 22811-29, 2015. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26402671> >.

QUINTAS-CARDAMA, A.; CORTES, J. E. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. **Mayo Clin Proc**, v. 81, n. 7, p. 973-88, Jul 2006. ISSN 0025-6196 (Print) 0025-6196 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16835977> >.

RUMJANEK, V. M.; VIDAL, R. S.; MAIA, R. C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukemia: How much can we learn from MDR - CML cell lines? **Biosci Rep**, Sep 26 2013. ISSN 1573-4935 (Electronic) 0144-8463 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24070327 >.

SALIMIZAND, H. et al. Concurrent effects of ABCB1 C3435T, ABCG2 C421A, and XRCC1 Arg194Trp genetic polymorphisms with risk of cancer, clinical output, and response to treatment with imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. **Tumour Biol**,

Aug 7 2015. ISSN 1423-0380 (Electronic) 1010-4283 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26250462> >.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 340, n. 17, p. 1330-40, Apr 29 1999. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10219069 >

SCHOCH, C. et al. Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. **Leukemia**, v. 16, n. 1, p. 53-9, Jan 2002. ISSN 0887-6924 (Print) 0887-6924 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11840263 >.

SEONG, S. J. et al. Influence of enzyme and transporter polymorphisms on trough imatinib concentration and clinical response in chronic myeloid leukemia patients. **Ann Oncol**, v. 24, n. 3, p. 756-60, Mar 2013. ISSN 1569-8041 (Electronic) 0923-7534 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23117072> >.

SHINOHARA, Y. et al. A multicenter clinical study evaluating the confirmed complete molecular response rate in imatinib-treated patients with chronic phase chronic myeloid leukemia by using the international scale of real-time quantitative polymerase chain reaction. **Haematologica**, v. 98, n. 9, p. 1407-13, Sep 2013. ISSN 1592-8721 (Electronic) 0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23716542> >.

SINGH, N. et al. Drug monitoring of imatinib levels in patients undergoing therapy for chronic myeloid leukaemia: comparing plasma levels of responders and non-responders. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 65, n. 6, p. 545-9, Jun 2009. ISSN 1432-1041 (Electronic) 0031-6970 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19214491> >.

TAKAHASHI, N. et al. Influence of CYP3A5 and drug transporter polymorphisms on imatinib trough concentration and clinical response among patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. **J Hum Genet**, v. 55, n. 11, p. 731-7, Nov 2010. ISSN 1435-232X (Electronic) 1434-5161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720558> >.

TAKAHASHI, N. et al. Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia. **Clin Pharmacol Ther**, v. 88, n. 6, p. 809-13, Dec 2010. ISSN 1532-6535 (Electronic) 0009-9236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980997> >.

TALPAZ, M. Treatment of CML: thoughts after ASCO 2002. **MedGenMed**, v. 4, n. 4, p. 11, Sep 25 2002. ISSN 1531-0132 (Electronic) 1531-0132 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12817207 >.

WEEN, M. P. et al. The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 96, n. 2, p. 220-56, Nov 2015. ISSN 1879-0461 (Electronic) 1040-8428 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100653> >.

WHITE, D. L. et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 4064-72, Dec 1 2007. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17761829 >.

YEUNG, D. T.; HUGHES, T. P. Therapeutic targeting of BCR-ABL: prognostic markers of response and resistance mechanism in chronic myeloid leukaemia. **Crit Rev Oncog**, v. 17, n. 1, p. 17-30, 2012. ISSN 0893-9675 (Print) 0893-9675 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22471662 >.

ZERBINI, M. C. N. et al. World Health Organization Classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues, 4th edition, 2008 – major changes from the 3rd edition, 2001. **Rev Assoc Med Bras**, v. 57, n. 1, p. 66-73, 2011.

ZHENG, Q. et al. ABCB1 polymorphisms predict imatinib response in chronic myeloid leukemia patients: a systematic review and meta-analysis. **Pharmacogenomics J**, v. 15, n. 2, p. 127-34, Apr 2015. ISSN 1473-1150 (Electronic) 1470-269X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25245580> >.

**Pharmacogenetic markers of response to treatment with imatinib
mesylate in chronic myeloid leukemia Brazilian patients.**

Natália Moreira Vieira¹, Renata Leite^{1, 3}, Fabíola Reginato¹, Marília Zandoná¹, Tito Vaneli², Laura Fogliatto², Marcelo Capra³, Rafael Linden⁴, Marina Venzon Antunes⁴, Arnaud Capron⁵, Pierre Wallemacq⁵, Sandrine Wagner¹, Vanessa Suñé Mattevi¹

Affiliations

¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre – RS, Brazil; ² Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre – RS, Brazil; ³ Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre – RS, Brazil; ⁴ Universidade Feevale, Novo Hamburgo – RS, Brazil; ⁵ Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

Corresponding Author

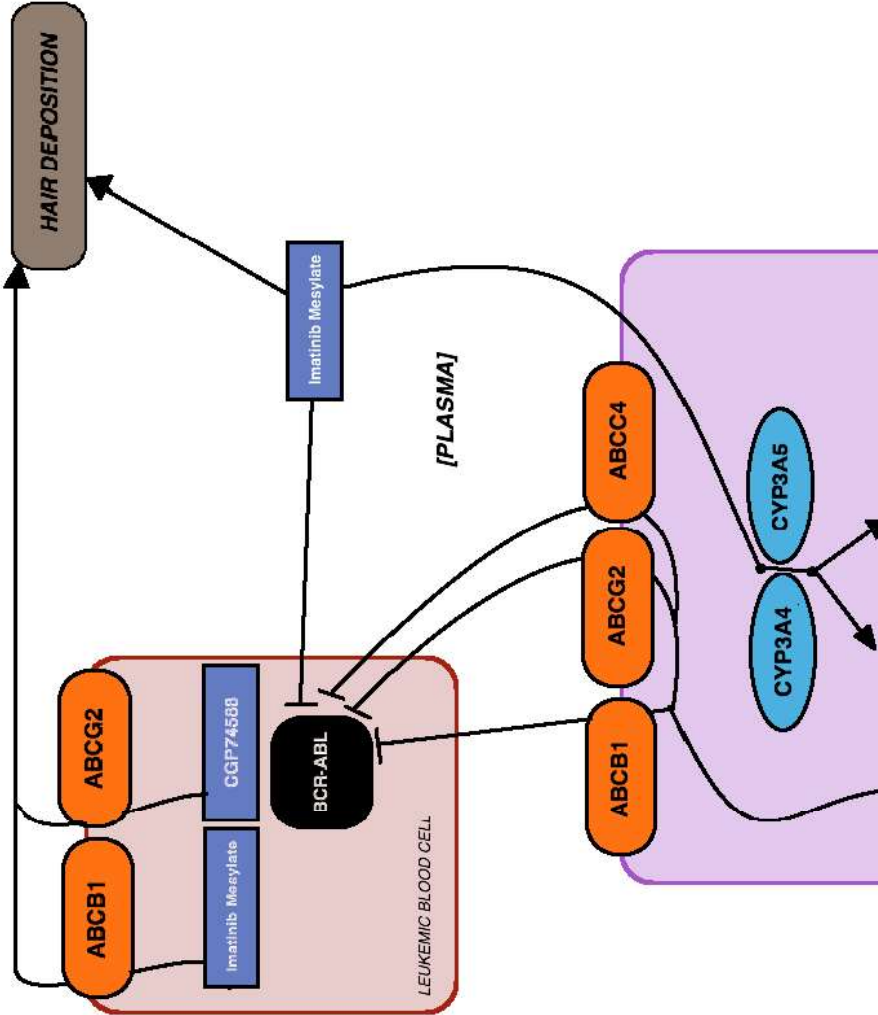
Prof. Vanessa Suñé Mattevi, PhD
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Rua Sarmento Leite, 245, sala 309
CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil
Phone: +55-51-33038763, Fax: +55-51-33038718
E-mail: vmattevi@ufcspa.edu.br

Abstract

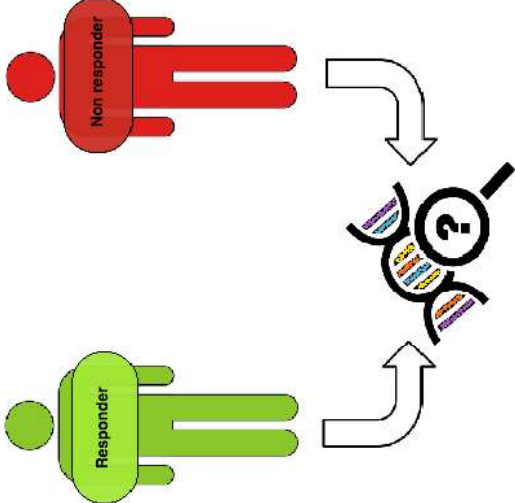
The treatment of chronic myeloid leukemia (CML) was revolutionized by the introduction of imatinib mesylate (IM). However, approximately 20% of patients are non-responsive and interpatient variability in response to IM is still a phenomenon lacking explanation. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in genes encoding proteins involved in IM pharmacokinetics are potentially involved in the causes of this variation. In this study, we investigated the association of SNPs in the genes encoding IM metabolizing enzymes *CYP3A4* (rs35599367 and rs2740574) and *CYP3A5* (rs776746) and efflux transporter proteins *ABCB1* (rs3213619, rs1128503, rs2032582 and rs1045642), *ABCG2* (rs2231142) and *ABCC4* (rs9561765) with response to treatment and with IM plasma trough levels and hair concentrations. The analyzed sample consisted of 182 CML patients on IM. DNA samples were genotyped for the nine SNPs using real-time polymerase chain reaction. Hair and plasma trough IM levels were measured through liquid chromatography coupled to mass spectrometry methods. Clinical response was defined according to the European Leukemia Net guidelines. The number of responders to standard IM therapy was 104. A trend to a higher frequency of *CYP3A4**22 (rs35599367) allele carriers was observed among responders to IM (12.5 vs. 3.4% of non-responders, $P = 0.087$), although no significant differences in plasma levels or hair concentrations between genotypes were found. Pharmacogenetics may become a valuable approach to optimize therapy with IM in CML, but many factors still need to be clarified to make possible its application in clinical practice.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, Pharmacogenetics, Imatinib Mesylate, CYP3A, ABC transporters.

Graphical Abstract



Chronic Myeloid Leukemia patients treated with Imatinib Mesylate



1 Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) today accounts for 15 to 20% of new cases of leukemia in adults worldwide [1]. It is a clonal neoplastic disorder of stem cells caused by expression of the chimeric *BCR-ABL* (breakpoint cluster Abelson oncogene) tyrosine kinase oncogene, the product of the translocation of chromosomes 9 and 22, also known as Philadelphia chromosome [2].

The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (IM) has revolutionized the treatment of CML in the beginning of the 21st century: a rationally designed, potent inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase protein [3]. In preclinical studies, it showed specific antileukemic activity both *in vitro* and *in vivo* against *BCR-ABL* including eradication of leukemia induced by injection of cell lines derived from blast-crisis CML [4]. However, regardless of its outstanding efficacy, nearly 10% of patients are nonresponsive to IM therapy or still present disease progression. In some patients may develop unbearable side effects or acquire drug resistance over time.

Despite of the primary recommendation of a standard dosage of 400 mg/day, several studies have identified a relationship between plasma IM levels and efficacy. Larson *et al.* reported that patients with complete cytogenetic response had mean IM plasma trough levels of $1,009 \pm 544$ ng/mL, while those who did not respond presented mean levels of 812 ± 409 ng/mL [6]. Other studies had confirmed the relationship between IM trough plasma levels and therapeutic response, with a lower plasma concentration threshold of 1,002 ng/mL [7-9]. Recently, our group developed a method to measure IM concentrations in hair [10]. This methodology could be used as a measure of cumulative exposure to IM rather than the evaluation of plasma levels, as hair concentrations may reflect more reliably the exposure in long-term conditions.

Pharmacogenomics studies the effect of the variability in the human genome on the modulation of therapeutic response or side effects of a given drug. Small genetic variations such as single nucleotide polymorphisms (SNPs), in both the molecular targets and the encoding key proteins for IM pharmacokinetics may be crucial for its effectiveness and toxicity [3]. This drug is mostly metabolized by the hepatic cytochrome P450 system, mainly CYP3A4 and CYP3A5 isoforms, which are highly polymorphic. It is also a substrate of ATP-binding cassette (ABC) transporters, such as ABCB1 and ABCC4. These are expressed in most epithelial barriers and mediate IM systemic clearance and excretion process [12-14].

Interpatient variations to IM treatment are still a puzzle to be entirely understood but they can be crucial for the achievement of a good prognosis. Therefore, the aim of the present study was to investigate the association between polymorphisms in *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *ABCG2* and *ABCC4* genes and IM plasma levels and hair concentrations and response to treatment in patients with CML.

2 Material and Methods

2.1 Study population

A total of 182 CML patients being treated with IM in two public hospitals from Porto Alegre, RS, Brazil, were enrolled in this retrospective study after providing written informed consent. The study protocol was approved by ethics committees of all participant institutions.

2.2 Response criteria

Clinical response was defined according to the European Leukemia Net guidelines [15]. In brief, a complete cytogenetic response (CCyR) was defined as no Philadelphia-positive metaphases in 20 or more examined cells of a patients' bone marrow assessment. A major molecular response (MMR) was defined as a threefold log reduction in transcripts as determined by real-time quantitative polymerase chain reaction on the international scale ($BCR-ABL^{IS} \leq 0.1\%$). The samples used for this evaluation were obtained on the same day as the samples used for plasma trough levels and hair analyses.

For analysis involving responders and non-responders to IM standard treatment, a patient was only classified as a responder to standard treatment if his IM intake was 400mg/day and had optimal response according to European Leukemia Net (at 3 months of treatment: $BCR-ABL1 \leq 10\%$ and/or $Ph+ \leq 35\%$; at 6 months: $BCR-ABL1 \leq 1\%$ and/or $Ph+ = 0$; at 12 months and so on: $BCR-ABL1 \leq 0.1\%$). Every other patient who have not match these criteria was classified as a non-responder. Patients lacking any data, such as inconclusive genotypes or withheld information for ELN status, were excluded from this analysis.

2.3 Genotyping analysis

DNA from peripheral blood samples was extracted by a standard salting-out method. The following SNPs were analyzed: *CYP3A4**1B (-392 A>G, rs2740574), *CYP3A4**22 (c.522-191 C>T, intron 6, rs35599367), *CYP3A5**3 (6986 T>C; rs776746), *ABCB1* -129 T>C (rs3213619), *ABCB1* 1236 C>T (rs1128503), *ABCB1* 2677 G>T/A (rs2032582), *ABCB1* 3435 C>T (rs1045642), *ABCG2* 421 C>A (rs2232142), and *ABCC4* 3870+3616 G>A (rs9561765). Real-time polymerase chain reaction (qPCR) with detection using hydrolysis probes (TaqMan, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was performed for detection of genotypes. Duplicate samples and negative controls were included to ensure accuracy of the results. The SNPs were selected through a literature review and those with significant previous reports of association with outcomes of imatinib therapy in CML patients and/or potentially functional were chosen.

2.4 Plasma levels and hair concentrations

Peripheral blood sampling for plasma trough levels analyses was carried out by venipuncture between 22 and 26 hours after the last daily oral intake of IM. The EDTA-containing tubes were centrifuged and the resulting plasma was stored at -20°C until further measuring. The samples were prepared and analyzed with ultra-high pressure liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (UHPLC-MS-MS, Micromass UK, Ltd. Manchester, UK), as previously described [16].

Hair samples were cut as close as possible to the scalp in the occipital region, washed, weighed, processed and then analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometric methodology (LC-MSMS, Micromass, UK, Ltd., Manchester, UK) [10].

2.5 Statistical analysis

All genotype frequencies – overall and by ethnicity - were tested for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) with chi-squared test. Genotype and allele frequencies were compared among responders and non-responders to standard IM therapy using the chi-squared test. Haplotype frequencies were estimated using the expectation-maximization algorithm through the Multiple Locus Haplotype Analysis software, version 2.0 [17].

Mean IM plasma levels and hair concentrations adjusted for IM dose were compared between genotypes of each SNP using ANOVA or T-tests for independent variables. Due to its asymmetric distribution, hair IM concentration was transformed in its natural logarithm for analyses. For those genotypes with fewer than 20 individuals, individuals bearing the rare genotype were combined with heterozygotes for statistical analyses.

All statistical tests were two-sided, with statistical significance defined as P -values ≤ 0.05 . Statistical analyses were carried out using SPSS statistical package software, version 21.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

3 Results

This retrospective study of 182 patients comprised 54.9% of men, with mean age of 53.9 years (Table 1). Most patients were diagnosed at chronic phase of the disease (78.6%) and did not present other cytogenetic abnormalities (60.4%). By the time of the study, the majority of patients (78.8%) were taking the IM standard treatment dose of 400mg/day.

Eighty-seven percent of patients were self-declared as white, while the remaining 11% were self-classified as brown or black. This classification through skin color was performed according to the official demographic censuses of the country [18]. In the latest Brazilian census, the country's southernmost state, Rio Grande do Sul, where the present study was performed, had 83.2% of its 11 million inhabitants self-declared as white. For this reason, association analyses were performed in the whole sample but we also carried out analyses limited to whites, our most representative sample set.

3.1 Genotype distribution

Allele frequencies of the nine SNPs analyzed are presented in Table 2. The *CYP3A4**1B and *CYP3A5**3 genotype frequencies were not in accordance with those expected under HWE. No other significant deviations from HWE were observed. In Table 2 we can also observe that allele frequencies for most SNPs are different between ethnic groups. In general, the frequencies in our sample are closer to those found in the Euro-derived population.

The four SNPs at *ABCB1* were found to be in linkage disequilibrium and thus were analyzed as haplotypes, as well as individually, for all the treatment outcomes. From the 24

possible haplotypes resulting from the combination among them, 12 were found. The haplotype -129T_1236C_2677G_3435C was the most frequent, found in 43.1% of chromosomes. The second most frequent was -129T_1236T_2677T_3435T, with a frequency of 36.5%. Together these two haplotypes accounted for 79.6% of the total number of observed haplotypes, and the 10 remaining haplotypes were all found in frequencies lower than 5% each.

3.2 Plasma trough levels and hair concentrations according to genotypes

Mean dose-adjusted plasma trough levels and hair IM concentrations were compared between genotypes for all patients and are presented in Table 3. No significant differences were found in plasma levels and hair IM concentrations between the genotypes for the nine SNPs investigated in the whole sample (Table 3) and in white patients only (Supplementary Table 1). No differences in hair IM concentrations and plasma IM levels were verified among homozygotes and heterozygotes for the two most frequent *ABCB1* haplotypes also (Supplementary Tables 2 and 3).

3.3 Response to IM therapy according to genotypes

One-hundred and five patients were classified as responders to standard IM treatment (400 mg/day). Genotype frequencies for all SNPs were, in general, very similar between responders and non-responders to standard IM treatment (Table 4). The closest to significance difference between these groups was observed in *CYP3A4**22 frequencies, with a trend for a higher frequency of *22 in the responders group (12.5% responders versus 3.4% non-responders, $P = 0.087$).

Mean dose-adjusted IM levels in plasma and hair were also compared between responders and non-responders to therapy. Responders presented higher dose-adjusted plasma IM levels (3.0 ± 1.4 ng/mL.mg *versus* 2.3 ± 1.3 ng/mL.mg; independent samples T-test P -value = 0.003). Responders to IM presented also higher dose-adjusted hair IM concentrations (5.0 ± 1.7 pg/mg² *versus* 4.1 ± 1.4 pg/mg²; independent samples T-test P -value = 0.016).

4 Discussion

The focus of personalized medicine is to develop tests that may predict patient prognosis and direct treatment choice. The finding of pharmacogenetic markers predictive of response to treatments could bring benefits for patients affected by all kinds of diseases, especially in CML, where time to response is a vital prognostic factor. However, a high interpatient variability in the response to IM treatment has been observed. In this scenario, pharmacokinetic targets, such as genes encoding metabolizing enzymes and transporters, are very promising biomarkers. In the present study we aimed to investigate the association of SNPs in genes encoding main metabolizing enzymes (*CYP3A4* and *CYP3A5*) and transmembrane efflux transporters (*ABCB1*, *ABCG2* and *ABCC4*) with response to treatment with IM and with IM plasma and hair levels.

After an oral administration, IM is metabolized in the liver mainly by CYP3A4 and CYP3A5 isoenzymes, and its main metabolite is also active. It was demonstrated that the concomitant intake of CYP3A inducers causes a significant decrease in the systemic exposure to IM, whereas the co-administration of inhibitors of liver enzymes increases the exposure [12]. The *CYP3A4* *1B SNP (rs2740574) causes a change from an A to a G in the promoter region of the gene and is located in a nifedipine-specific response element. This nucleotide change has been shown to lead to increased transcription *in vitro* [19]. However, these results were not replicated thereafter, and the functionality of this nucleotide change remains controversial [20]. Indeed, some authors have suggested that some of the effects originally attributed to *CYP3A4**1B are actually due to the *CYP3A5**1 allele, which is in linkage disequilibrium with *CYP3A4**1B, as demonstrated by several studies [21-24]. These two genes are located very close to each other, in chromosome 7q (24). It is known that the 6986 A>G substitution in the *CYP3A5* gene (rs776746), which characterizes the *3 allele, results in an improperly spliced mRNA and a nonfunctional protein truncated at aminoacid 102. Through this rationale, we expected that individuals carrying the higher expressed *CYP3A4**1B and *CYP3A5**1 alleles to have lower IM levels in blood and to be more prone to have treatment failure, which was not confirmed by our data.

The *CYP3A4**22 allele, more recently described by Wang *et al.* (2011) [20], was shown to confer lower *CYP3A4* mRNA levels and enzyme activity in human liver. Following this rationale, we would expect carriers of allele *22 to display higher IM plasma levels and to have a better response to the treatment. Even though we have not found differences in IM plasma levels between genotypes for this SNP, we observed a trend to a higher frequency of

carriers of *22 allele among responders to IM (12.5 vs. 3.4%, $P = 0.087$). To this date, we were not able to find any study trying to correlate this SNP to IM response or CML. Meanwhile, there are some interesting findings with other drugs such as simvastatin, tamoxifen and tacrolimus. Elens *et al.* [25] found that kidney transplant recipients carriers of the *22 allele needed a 33% smaller dose of tacrolimus to achieve therapeutic concentrations. Similarly, Kitzmiller *et al.* [22] found that carriers of *22 had increased plasma simvastatin concentrations, independently of the patients' *CYP3A5* status, but with differences among Caucasians and African-americans. Although the *22 allele has a low frequency in the overall population, this scenario suggests that this variant could be somehow involved in the response to the treatment with IM in CML patients due to its proven influence on *CYP3A4* functionality *in vivo* [26] and warrant further investigations.

Our analyses in the three transmembrane transporter genes (*ABCB1*, *ABCG2* and *ABCC4*) showed no significant associations with the proposed outcomes. However, the *ABCB1* gene is highly polymorphic and more than 1,200 SNPs have been identified within this gene [27]. Four of them have been investigated herein, but only 2677G>T/A results in an amino acid change (Ala893Ser/Thr). It has been previously demonstrated that homozygote genotypes for the wild-type alleles for *ABCB1* haplotype with 1236C>T, 3435C>T and 2677G>T/A polymorphisms markedly affect the secondary structure of *ABCB1* mRNA and present higher transporter activity than those carrying at least one mutated allele [27]. The higher activity haplotype (1236C_3435C_2677C) was hypothesized to cause a reduction in IM bioavailability, due to a decrease in drug absorption and an increase in its excretion. At the cellular level, it may result in a lower cytoplasmic accumulation of the drug, reducing its BCR-ABL1 inhibition capability [12]. On the other hand, a meta-analysis performed by Zheng *et al.* [28], which included a total of 12 studies, showed that the T-allele of *ABCB1* 1236C>T was a predictor of a worse response to IM treatment only in Asian individuals. The same meta-analysis suggested the 2677 T allele to be a predictor of a better response and the 3435 T to predict a worse response in patients from all populations, but these associations were heterogeneous regarding to treatment and response criteria. This way, the current knowledge about *ABCB1* polymorphisms and response to IM remains very controversial and further clinical and functional studies are necessary to draw conclusive considerations.

Although we were not able to detect associations of the investigated SNPs with plasma and hair IM levels, we would like to point out that these associations might be masked by compensatory effects due to gene-gene interactions. That is, some individuals may have protective alleles for a SNP, but a risk allele in other, with net compensatory effects.

Evidently, a much larger sample would be necessary to detect such associations. The complexity of this process and of the human body as a whole should always be kept in mind, and only when the results starts to align we will possibly be able to develop a full rationale of this pharmacogenetic puzzle.

There were some limitations to our study that merit discussion. *CYP3A4* and *CYP3A5* genotypes were not distributed according to the Hardy-Weinberg expectations, but this finding was observed in other studies with these variants, probably due to the high difference in allele frequencies between Euro and Afro-descendants [26-28]. In order to minimize such differences, we performed analyses separately in white individuals, which is the ethnic group more represented in our population. Of course, we cannot rule out the presence of Afro-derived individuals among those phenotypically classified as “white”. Brazil is a well-known country due its admixed population and this can represent a problem for genetic association studies. However, one must take into account that the admixture process occurred in different ways in different geographic regions of the country. For our study, all patients recruited are from of Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil, and one study already showed that individuals from southern Brazil classified phenotypically as euro-derived present an almost exclusively European ancestry when ancestry-informative markers were used [29].

Undoubtedly, a great part of the discordance among results regarding pharmacogenetic markers and response to IM therapy may be attributable to population heterogeneity. Another important reason is the lack of concordance in response criteria adopted in different studies [12]. Furthermore, although cytogenetic monitoring of CML is less sensitive than molecular monitoring, the molecular testing process by real-time PCR is prone to several intra-assay factors that may lead to highly variability in results [30]. This technical limitation may impair the comparison of molecular endpoints among studies. All of these questions should be addressed in order to improve the level of consistency among studies.

4.1 Conclusions

Fully comprehending the role of SNPs in the response to imatinib treatment will ensure hereafter better therapeutic efficacy, as clinicians will be able to tailor treatments to suit the genetic constitution of their patients. The existence of second-generation tyrosine kinase inhibitors (TKIs) with different pharmacokinetic properties makes the finding of biological predictors of response to IM treatment even more relevant. The possibility of

previous identification of patients who are more likely to benefit from second- or third-generation TKIs, such as nilotinib, dasatinib, bosutinib or ponatinib [12], would bring extensive advantages for patients and for the health systems, reducing the time and resources spent in the empirical determination of response to treatment. For these reasons, further studies about the pharmacogenetics of IM in distinct populations are needed, as well as research regarding the response to other TKIs.

5 Acknowledgements

This work was a recipient of a FAPERGS/PPSUS grant. Novartis also supported it through the provision of reference imatinib samples for UHPLC-MS-MS analysis. However, both institutions had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

6 Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

7 References

1. M. Comert, Y. Baran, G. Saydam, Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor era, *Am J Blood Res* 3(3) (2013) 191-200
2. B. Chereda, J.V. Melo, Natural course and biology of CML, *Ann Hematol* 94 Suppl 2 (2015) DOI: S107-21.10.1007/s00277-015-2325-z
3. K. Eechoute, A. Sparreboom, H. Burger, R.M. Franke, G. Schiavon, J. Verweij, W.J. Loos, E.A. Wiemer, R.H. Mathijssen, Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice, *Clin Cancer Res* 17(3) (2011) DOI: 406-15.10.1158/1078-0432.CCR-10-2250
4. D. Leveque, F. Maloisel, Clinical pharmacokinetics of imatinib mesylate, *In Vivo* 19(1) (2005) 77-84
5. M. Baccarani, J. Cortes, F. Pane, D. Niederwieser, G. Saglio, J. Apperley, F. Cervantes, M. Deininger, A. Gratwohl, F. Guilhot, A. Hochhaus, M. Horowitz, T. Hughes, H. Kantarjian, R. Larson, J. Radich, B. Simonsson, R.T. Silver, J. Goldman, R. Hehlmann, L. European, Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet, *J Clin Oncol* 27(35) (2009) DOI: 6041-51.10.1200/JCO.2009.25.0779
6. R.A. Larson, B.J. Druker, F. Guilhot, S.G. O'Brien, G.J. Riviere, T. Krahnke, I. Gathmann, Y. Wang, I.S. Group, Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study, *Blood* 111(8) (2008) DOI: 4022-8.10.1182/blood-2007-10-116475
7. S. Bouchet, K. Titier, N. Moore, R. Lassalle, B. Ambrosino, S. Poulette, P. Schuld, C. Belanger, F.X. Mahon, M. Molimard, Therapeutic drug monitoring of imatinib in chronic myeloid leukemia: experience from 1216 patients at a centralized laboratory, *Fundam Clin Pharmacol* 27(6) (2013) DOI: 690-7.10.1111/fcp.12007
8. N. Takahashi, H. Wakita, M. Miura, S.A. Scott, K. Nishii, M. Masuko, M. Sakai, Y. Maeda, K. Ishige, M. Kashimura, K. Fujikawa, M. Fukazawa, T. Katayama, F. Monma, M. Narita, F. Urase, T. Furukawa, Y. Miyazaki, N. Katayama, K. Sawada, Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia, *Clinical pharmacology and therapeutics* 88(6) DOI: (2010) 809-13.10.1038/clpt.2010.186
9. S. Picard, K. Titier, G. Etienne, E. Teilhet, D. Ducint, M.A. Bernard, R. Lassalle, G. Marit, J. Reiffers, B. Begaud, N. Moore, M. Molimard, F.X. Mahon, Trough imatinib

- plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia, *Blood* 109(8) (2007) 3496-9.blood-2006-07-036012 [pii] DOI: 10.1182/blood-2006-07-036012
10. A. Capron, M.V. Antunes, S.C. Wagner, V.S. Mattevi, N. Vieira, R. Leite, F. Reginato, M. Capra, L. Fogliatto, P. Wallemacq, R. Linden, First report of imatinib measurement in hair: Method development and preliminary evaluation of the relation between hair and plasma concentrations with therapeutic response in chronic myeloid leukemia, *Clin Chim Acta* 453 (2016) DOI: 42-47.10.1016/j.cca.2015.11.032
 11. A.Y. Liu, Q. Yang, Y. Huang, P. Bacchetti, P.L. Anderson, C. Jin, K. Goggin, K. Stojanovski, R. Grant, S.P. Buchbinder, R.M. Greenblatt, M. Gandhi, Strong relationship between oral dose and tenofovir hair levels in a randomized trial: hair as a potential adherence measure for pre-exposure prophylaxis (PrEP), *PLoS One* 9(1) (2014) DOI: e83736.10.1371/journal.pone.0083736
 12. M. Polillo, S. Galimberti, C. Barate, M. Petrini, R. Danesi, A. Di Paolo, Pharmacogenetics of BCR/ABL Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia, *Int J Mol Sci* 16(9) (2015) DOI: 22811-29.10.3390/ijms160922811
 13. D.H. Kim, L. Sriharsha, W. Xu, S. Kamel-Reid, X. Liu, K. Siminovitch, H.A. Messner, J.H. Lipton, Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia, *Clin Cancer Res* 15(14) (2009) DOI: 4750-8.10.1158/1078-0432.CCR-09-0145
 14. S.K. Nigam, What do drug transporters really do?, *Nat Rev Drug Discov* 14(1) (2015) DOI: 29-44.10.1038/nrd4461
 15. M. Baccarani, M.W. Deininger, G. Rosti, A. Hochhaus, S. Soverini, J.F. Apperley, F. Cervantes, R.E. Clark, J.E. Cortes, F. Guilhot, H. Hjorth-Hansen, T.P. Hughes, H.M. Kantarjian, D.W. Kim, R.A. Larson, J.H. Lipton, F.X. Mahon, G. Martinelli, J. Mayer, M.C. Muller, D. Niederwieser, F. Pane, J.P. Radich, P. Rousselot, G. Saglio, S. Saussele, C. Schiffer, R. Silver, B. Simonsson, J.L. Steegmann, J.M. Goldman, R. Hehlmann, European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013, *Blood* 122(6) (2013) DOI: 872-84.blood-2013-05-501569 [pii] 10.1182/blood-2013-05-501569
 16. M.V. Antunes, S. Raymundo, S.C. Wagner, V.S. Mattevi, N. Vieira, R. Leite, F. Reginato, M.Z. Capra, L. Fogliatto, R. Linden, DBS sampling in imatinib therapeutic

- drug monitoring: from method development to clinical application, *Bioanalysis* 7(16) (2015) DOI: 2105-17.10.4155/bio.15.101
17. J.C. Long, R.C. Williams, M. Urbanek, An E-M algorithm and testing strategy for multiple locus haplotypes., *Am J Hum Genet* 56 (1995) 799-810
 18. IBGE, <http://www.ibge.gov.br>. (accessed 14th of april.2016).
 19. B. Amirimani, B. Ning, A.C. Deitz, B.L. Weber, F.F. Kadlubar, T.R. Rebbeck, Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant, *Environ Mol Mutagen* 42(4) (2003) DOI: 299-305.10.1002/em.10199
 20. D. Wang, Y. Guo, S.A. Wrighton, G.E. Cooke, W. Sadee, Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs, *Pharmacogenomics J* 11(4) (2011) DOI: 274-86.10.1038/tpj.2010.28
 21. W.L. Shi, H.L. Tang, S.D. Zhai, Effects of the CYP3A4*1B Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients: A Meta-Analysis, *PLoS One* 10(6) (2015) DOI: e0127995.10.1371/journal.pone.0127995
 22. J.P. Kitzmiller, J.A. Luzum, D. Baldassarre, R.M. Krauss, M.W. Medina, CYP3A4*22 and CYP3A5*3 are associated with increased levels of plasma simvastatin concentrations in the cholesterol and pharmacogenetics study cohort, *Pharmacogenet Genomics* 24(10) (2014) DOI: 486-91.10.1097/FPC.0000000000000079
 23. S. Angelini, S. Soverini, G. Ravegnini, M. Barnett, E. Turrini, M. Thornquist, F. Pane, T.P. Hughes, D.L. White, J. Radich, D.W. Kim, G. Saglio, D. Cilloni, I. Iacobucci, G. Perini, R. Woodman, G. Cantelli-Forti, M. Baccarani, P. Hrelia, G. Martinelli, Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy, *Haematologica* 98(2) (2013) DOI: 193-200.10.3324/haematol.2012.066480
 24. S.J. Seong, M. Lim, S.K. Sohn, J.H. Moon, S.J. Oh, B.S. Kim, H.M. Ryoo, J.S. Chung, Y.D. Joo, S.M. Bang, C.W. Jung, D.H. Kim, S.Y. Park, S.S. Yoon, I. Kim, H.G. Lee, J.H. Won, Y.H. Min, J.W. Cheong, J.S. Park, K.S. Eom, M.S. Hyun, M.K. Kim, H. Kim, M.R. Park, J. Park, C.S. Kim, H.J. Kim, Y.K. Kim, E.K. Park, D.Y. Zang, D.Y. Jo, H.W. Lee, Y.R. Yoon, Influence of enzyme and transporter polymorphisms on trough imatinib concentration and clinical response in chronic myeloid leukemia patients, *Ann Oncol* 24(3) (2013) 756-60.10.1093/annonc/mds532
 25. L. Elens, R. Bouamar, D.A. Hesselink, V. Haufroid, I.P. van der Heiden, T. van Gelder, R.H. van Schaik, A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism

- significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients, *Clin Chem* 57(11) (2011) DOI: 1574-83.10.1373/clinchem.2011.165613
26. L. Elens, A. Nieuweboer, S.J. Clarke, K.A. Charles, A.J. de Graan, V. Haufroid, R.H. Mathijssen, R.H. van Schaik, CYP3A4 intron 6 C>T SNP (CYP3A4*22) encodes lower CYP3A4 activity in cancer patients, as measured with probes midazolam and erythromycin, *Pharmacogenomics* 14(2) (2013) DOI: 137-49.10.2217/pgs.12.202
 27. D. Vivona, L.T. Lima, A.C. Rodrigues, C.T. Bueno, G.K. Alcantara, L.S. Barros, D.E.M.H. VT, C.S. Chiattonne, D.E.L.L.F.C. M, E.M. Guerra-Shinohara, ABCB1 haplotypes are associated with P-gp activity and affect a major molecular response in chronic myeloid leukemia patients treated with a standard dose of imatinib, *Oncol Lett* 7(4) (2014) DOI: 1313-1319.10.3892/ol.2014.1857
 28. Q. Zheng, H. Wu, Q. Yu, D.H. Kim, J.H. Lipton, S. Angelini, S. Soverini, D. Vivona, N. Takahashi, J. Cao, ABCB1 polymorphisms predict imatinib response in chronic myeloid leukemia patients: a systematic review and meta-analysis, *Pharmacogenomics J* 15(2) (2015) DOI: 127-34.10.1038/tpj.2014.54
 29. J.N. Roy, J. Lajoie, L.S. Zijenah, A. Barama, C. Poirier, B.J. Ward, M. Roger, CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations, *Drug Metab Dispos* 33(7) (2005) DOI: 884-7.10.1124/dmd.105.003822
 30. S.U. Yasuda, L. Zhang, S.M. Huang, The role of ethnicity in variability in response to drugs: focus on clinical pharmacology studies, *Clinical pharmacology and therapeutics* 84(3) (2008) DOI: 417-23.10.1038/clpt.2008.141
 31. N.P. Santos, E.M. Ribeiro-Rodrigues, A.K. Ribeiro-Dos-Santos, R. Pereira, L. Gusmao, A. Amorim, J.F. Guerreiro, M.A. Zago, C. Matte, M.H. Hutz, S.E. Santos, Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel, *Hum Mutat* 31(2) (2010) DOI: 184-90.10.1002/humu.21159
 32. L. Foroni, G. Wilson, G. Gerrard, J. Mason, D. Grimwade, H.E. White, D.G. de Castro, S. Austin, A. Awan, E. Burt, T. Clench, J. Farruggia, J. Hancock, A.E. Irvine, A. Kizilors, S. Langabeer, B.J. Milner, G. Nickless, A. Schuh, A. Sproul, L. Wang, C. Wickham, N.C. Cross, Guidelines for the measurement of BCR-ABL1 transcripts in chronic myeloid leukaemia, *Br J Haematol* 153(2) (2011) DOI: 179-90.10.1111/j.1365-2141.2011.08603.x

Table 1. Characteristics of the study population (n=182)

	Proportions or means $\pm$ SD and range
Gender	
Male	100 (54.9%)
Female	82 (45.1%)
Ethnicity	
White	159 (87.4%)
Black	13 (7.1%)
Brown	8 (4.4%)
Non Declared	2 (1.1%)
Age (years)	53.9 $\pm$ 16.7 (7.6 - 98.5)
Disease duration (years)	6.3 $\pm$ 4.4 (0.3 – 24.6)
Disease stage at diagnosis	
Chronic Phase	143 (78.6%)
Accelerated Phase	18 (9.9%)
Blast Crisis	5 (2.7%)
Unknown	16 (8.8%)
Cytogenetics at diagnosis	
t(9;22) only	110 (60.4%)
Other	12 (6.6%)
Unknown	60 (33%)
IM time intake (years)	5.63 $\pm$ 3.41 (0.24 – 13.11)
IM Dose (mg/day)	
100	1 (0.5%)
300	2 (1.1%)
400	143 (78.8%)
500	1 (0.5%)
600	21 (11.5%)
800	1 (0.5%)
Unknown	13 (7.1%)

S.D.: standard deviation

Table 2. Minor allele frequencies for the polymorphisms analyzed

Gene	SNP, rs number	MA	Hapmap CEU ^a	Hapmap YRI ^b	Hapmap JPT ^c	Porto Alegre Overall	Porto Alegre Caucasians
<i>CYP3A4</i>	-392 A>G (*1B)	G	0.02 ^d	0.71 ^d	0 ^e	0.14	0.12
<i>CYP3A4</i>	522-191 C>T (*22)	T	0.05 ^f	0.008 ^f	0.006 ^f	0.05	0.04
<i>CYP3A5</i>	6986 T>C (*3)	T	0.04	0.85	0.27	0.16	0.13
<i>ABCB1</i>	-129 T>C	C	0.03	0.07	0.05	0.04	0.03
<i>ABCB1</i>	1236 C>T	T	0.45	0.12	0.59	0.46	0.47
<i>ABCB1</i>	2677 G>T/A	T	0.47	0 ^g	0.55	0.40	0.41
<i>ABCB1</i>		A	0	0 ^g	0	0.01	0.01
<i>ABCB1</i>	3435 C>T	T	0.57	0.11	0.46	0.48	0.47
<i>ABCG2</i>	421 C>A	A	0.11	0.004	0.31	0.08	0.09
<i>ABCC4</i>	3870+3616 G>A	A	0.05	0.07	0.38	0.05	0.05

Chr, chromosome; MA, minor allele.

^a European population; ^b Sub-Saharan African population; ^c Japanese population; ^d Low coverage panel; ^e JPT+CHB low coverage panel; ^f 1000 Genomes Project; ^g Another YRI population (other than HapMap).

Table 3. Comparisons of dose-adjusted imatinib trough concentrations in plasma and hair between genotypes

Gene	SNP, rs number	Genotype	n	Dose-adjusted plasma concentration (ng/mL.mg)	p	n	Dose-adjusted hair concentration (ng/mg ²)	p	
CYP3A4	*1B (-392 A>G)	rs2740574	*1/*1B+*1B/*1B	35	2.72±1.19	0.707 ^a	24	0.0051±0.002	0.443 ^a
			*1/*1	122	2.82±1.52		75	0.0047±0.002	
	*22 (522-191 C>T)	rs35599367	*1/*1	145	2.82±1.48	0.608 ^a	89	0.0047±0.002	0.197 ^a
			*1/*22	11	2.58±1.01		10	0.0055±0.002	
CYP3A5	*3 (6986 T>C)	rs776746	*1/*1+*1/*3	42	2.69±1.35	0.578 ^a	28	0.0052±0.002	0.256 ^a
ABCB1	-129 T>C		*3/*3	114	2.84±1.49		70	0.0047±0.002	
		rs3213619	C/T	10	2.87±1.57	0.879 ^a	4	0.0057±0.003	0.297 ^a
		T/T	147	2.80±1.44		95	0.0048±0.002		
	1236 C>T		C/C	48	2.75±1.51	0.198 ^b	30	0.0046±0.002	0.826 ^b
			C/T	71	2.64±1.44		44	0.0049±0.002	
			T/T	38	3.16±1.35		25	0.0049±0.001	
	2677 G>T/A	rs2032582	G/G	53	2.86±1.54	0.543 ^b	30	0.045±0.0015	0.384 ^b
			G/T	70	2.69±1.41		47	0.0050±0.001	
	3435 C>T		T/T	29	3.02±1.43		19	0.0047±0.001	
			C/C	42	2.71±1.51	0.384 ^b	27	0.0044±0.002	0.292 ^b
			C/T	79	2.70±1.46		47	0.0051±0.002	

		T/T							
ABCG2	421 C>A	rs2231142	A/C+A/A	35	3.09±1.35	24	0.0048±0.002	0.360 ^a	
				24	2.62±1.39	16	0.0045±0.002		
ABCC4	3870+3616 G>A	rs951765	C/C	133	2.83±1.46	83	0.0049±0.002	0.115 ^a	
			G/G	141	2.76±1.45	89	0.0047±0.002		
			A/G	16	3.17±1.41	10	0.0057±0.003		

^a Student's T-test; ^b ANOVA

Table 4. Genotype frequencies for *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *ABCG2* and *ALDH3B1* among CML patients according to response to standard IM treatment (400mg/d)

Gene	SNPs	rs number, Genotypes	Responders	Non-responders
CYP3A4	-392 A>G (*1B)	rs2740574	n = 105	n = 59
		*1/*1	79 (75.2%)	44 (74.6%)
		*1/*1B + *1B/*1B	26 (24.8%)	15 (25.4%)
	522-191 C>T (*22)	rs355399637	n = 104	n = 58
		*1/*1	91 (87.5%)	56 (96.6%)
		*1/*22	13 (12.5%)	2 (3.4%)
CYP3A5	6986 T>C (*3)	rs776746	n = 104	n = 59
		*3/*3	74 (71.2%)	42 (71.2%)
		*1/*3 + *1/*1	30 (28.8%)	17 (28.8%)
ABCB1	-129 T>C	rs3213619	n = 105	n = 59
		C/T	8 (7.6%)	3 (5.1%)
		T/T	97 (92.4%)	56 (94.9%)
	1236 C>T	rs1128503	n = 105	n = 59
		C/C	35 (33.3%)	18 (30.5%)
		C/T	46 (43.8%)	26 (44.1%)
		T/T	24 (22.9%)	15 (25.4%)
	2677 G>T/A	rs2032582	n = 103	n = 56
		G/G	42 (40.8%)	20 (35.7%)
		G/T	42 (40.8%)	26 (46.4%)
		T/T	19 (18.4%)	10 (17.9%)
	3435 C>T	rs1045642	n = 105	n = 58
		C/C	29 (27.6%)	19 (32.8%)
		C/T	56 (53.3%)	24 (41.4%)
		T/T	20 (19%)	15 (25.9%)
ABCG2	421 C>A	rs2231142	n = 105	n = 59
		C/C	85 (81%)	52 (88.1%)
		A/C + A/A	20 (19%)	7 (11.9%)

ABCC4	3870+3616 G>A	rs9561765	n = 105	n = 59	
		G/G	94 (89.5%)	54 (91.5%)	0.789 ^a
		A/G + A/A	11 (10.5%)	5 (8.5%)	

^aChi-square test; ^bFisher's exact test

Supplementary Table 1. Comparisons of dose-adjusted imatinib trough concentrations in plasma and hair between all genotypes among caucasian patients only

SNP, rs number		Genotype	n	Dose-adjusted plasma concentration (ng/mL.mg)	p	n	Dose-adjusted hair concentration (ng/mg ²)	p
<i>CYP3A4</i>	*1B (-392 A>G)	rs2740574	25	2.98±1.15	0.633 ^a	19	0.0047±0.001	0.889 ^a
			113	2.82±1.51		71	0.0047±0.002	
	*22 (522-191 C>T)	rs35599367	127	2.87±1.48	0.527 ^a	80	0.0046±0.002	0.134 ^a
			11	2.58±1.01		10	0.0055±0.002	
<i>CYP3A5</i>	*3 (6986 T>C)	rs776746	29	3.03±1.36	0.446 ^a	23	0.0049±0.001	
			108	2.80±1.48		66	0.0047±0.002	0.686 ^a
<i>ABCB1</i>	-129 T>C	rs3213619	7	3.48±1.30	0.238 ^a	4	0.0057±0.003	
			131	2.82±1.45		86	0.0047±0.002	0.566 ^a
	1236 C>T	rs1128503	40	2.89±1.48		28	0.0047±0.002	
			63	2.61±1.46	0.112 ^b	39	0.0047±0.002	0.982 ^b
	2677 G>T/A	rs2032582	35	3.24±1.35		23	0.0048±0.001	
			45	2.96±1.55		27	0.044±0.001	
			63	2.67±1.41	0.372 ^b	43	0.0050±0.002	0.362 ^b

		T/T		31	3.27±1.26	22	0.0047±0.002	
ABCG2	421 C>A	rs2231142	A/C+A/A	23	2.73±1.31	16	0.0045±0.002	0.549 ^a
				115	2.87±1.48	74	0.0048±0.002	0.654 ^a
ABCC4	3870+3616 G>A	rs951765	G/G	124	2.81±1.45	82	0.0047±0.002	0.407 ^a
				14	3.19±1.46	8	0.0052±0.002	

^a Student's T-test; ^b ANOVA

Supplementary Table 2. Comparison of dose-adjusted imatinib trough concentrations in plasma and hair between the most frequent ABCBI haplotypes

Haplotype	n	Dose-adjusted plasma concentration (ng/mL.mg)	p	n	Dose-adjusted hair concentration (ng/mg ²)	p
-129T_1236C_2677C_3435C/-129T_1236C_2677C_3435C	30	2.64±1.50		19	0.0045±0.001	
-129T_1236C_2677C_3435C/-129T_1236T_2677A_3435T	49	2.60±1.50	0.192 ^a	34	0.0051±0.002	0.351 ^a
-129T_1236T_2677A_3435T/-129T_1236T_2677A_3435T	22	3.25±1.21		15	0.0049±0.001	

^aANOVA

Supplementary Table 3. Comparison of dose-adjusted imatinib trough concentrations in plasma and hair between the most frequent ABCBI haplotypes, among caucasian patients only

Haplotype	n	Dose-adjusted plasma concentration (ng/mL.mg)	p	n	Dose-adjusted hair concentration (ng/mg ²)	p
-129T_1236C_2677C_3435C/-129T_1236C_2677C_3435C	24	2.74±1.49		17	0.0045±0.001	
-129T_1236C_2677C_3435C/-129T_1236T_2677A_3435T	44	2.51±1.49	0.108 ^a	31	0.0050±0.001	0.408 ^a
-129T_1236T_2677A_3435T/-129T_1236T_2677A_3435T	20	3.33±1.20		14	0.0046±0.001	

^a ANOVA

5 Considerações Finais

A LMC tornou-se uma doença manejável e de tratamento crônico, graças ao avanço do conhecimento sobre a fisiopatologia da doença e do uso de medicamentos no tratamento do MI. Porém, a resposta ao tratamento depende de diversos fatores que ainda não são totalmente esclarecidos. A fim de compreender melhor estas particularidades, este estudo estudou a influência da variabilidade genética nesse tratamento, através da análise de polimorfismos localizados em genes de enzimas transportadoras de fármacos e de marcadores de resposta ao tratamento.

A farmacogenética pode ser considerada uma abordagem interessante para avaliar com antecedência e de uma maneira rápida, a resposta de um paciente ao tratamento com base na sua constituição genética. Contudo, no presente estudo não foram encontradas associações entre os SNPs analisados e a concentração plasmática ou desfecho clínico em resposta ao tratamento.

Apesar disso, ainda que a medicina personalizada se torne uma realidade, a implementação da farmacogenética, é preciso questionar a sua disponibilidade para os pacientes. É necessário investir na redução de custo das tecnologias necessárias para realizar estas análises, a fim de garantir equidade através da redução do impacto de determinantes socioeconômicos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa porque possui a doença chamada Leucemia Mielóide Crônica e faz uso do medicamento chamado Imatinibe. O nome da pesquisa é: **Estudo Farmacogenômico da Resposta ao Tratamento com Mesilato de Imatinibe em Pacientes com Leucemia Mielóide Crônica** e tem como objetivo principal saber como a variação no código genético de cada pessoa influencia a sua resposta ao tratamento. Sua participação nesta pesquisa consiste em responder um questionário com perguntas sobre sua vida. Além disso, será coletada uma pequena amostra de seu sangue de forma a medir a quantidade do medicamento presente e para a identificação de suas características genéticas, junto com os exames solicitados pelo seu médico. Essa amostra não pode ser utilizada para nenhum outro tipo de manipulação genética além da aqui explicada.

O tema escolhido se justifica pela importância de que o uso correto do medicamento que o senhor (a) faz uso apresenta maior chance de fazer efeito se tomado corretamente e que, em algumas pessoas, mesmo tomando o medicamento adequadamente, a quantidade do medicamento no sangue fica abaixo do ideal. Você não irá receber nenhum pagamento por participar desta pesquisa e nem seus médicos receberão qualquer pagamento por realizar este trabalho. Mesmo que você esteja tomando os medicamentos de forma errada, não haverá nenhuma punição / constrangimento a você ou seus familiares e você continuará recebendo o mesmo atendimento prestado pela equipe assistente. Não haverá nenhum benefício imediato para que você participe desta pesquisa, entretanto, o resultado desta pesquisa poderá auxiliar as pessoas no futuro.

O trabalho está sendo realizado pelos médicos Marcelo Capra e Laura Maria Fogliatto, Profa. Sandrine Wagner e Profa. Vanessa Mattevi. Juntamente com a amostra coletada, serão obtidos alguns dados junto ao seu prontuário médico relativos ao seu tratamento. Será também, no dia da coleta de seus exames de rotina no laboratório, coletada uma pequena amostra (cerca de 5 mL), para as análises genéticas além da dosagem do nível de medicamento no seu sangue e verificar se o seu organismo elimina o medicamento muito rapidamente. Esta pequena quantidade de sangue que será coletada não fará falta a você e os riscos da coleta de sangue são os mesmos que ocorrem na coleta de rotina (manchas roxas na pele, dor no momento da picada).

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e/ou coerção, a respeito dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos aos quais serei submetido. Também fui informado dos riscos, desconfortos e benefícios a minha participação, todos acima listados.

Fui igualmente informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa.
- De que minha participação é voluntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento prestado a mim.
- Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.
- De que o material biológico que será coletado será armazenado, podendo ser utilizado para posteriores estudos por 10 anos, conforme estabelecido na Resolução nº 441 do Conselho Nacional de Saúde;
- Da utilização do material armazenado, que só ocorrerá mediante aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

· Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com os pesquisadores Sandrine Wagner, Fone: 33038763, Marcelo Capra, Fone 3357-2581 (Serviço de Hematologia - Hospital Conceição) ou Laura Fogliatto, Fone: 3359.8317 (Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

· Também que, se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3357-2407, com o Comitê de Ética da UFCSPA, telefone: 3303-8804, ou com o Comitê de Ética do HCPA, telefone 3359-7640.

Este documento foi revisado em seus aspectos éticos e metodológicos e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital Nossa Senhora da Conceição, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Porto Alegre, ____, de _____ de 20__.

Paciente
Data ____/____/____

Pesquisador
Data ____/____/____

Concordo em deixar minha amostra armazenada para estudos posteriores

Observação: O presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do Paciente ou seu Responsável Legal e outra com o Pesquisador Responsável.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo Farmacogenômico da Resposta ao Tratamento com Mesilato de Imatinibe em Pacientes com Leucemia Mielóide Crônica

Pesquisador: Sandrine Comparsi Wagner

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 16297913.4.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 362.566

Data da Relatoria: 15/08/2013

Apresentação do Projeto:

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica que resulta em um aumento do número de células mielóides devido à produção de uma proteína com atividade tirosina quinase, resultado de um gene híbrido (BCR-ABL). A LMC consiste em uma patologia grave, cujo tratamento foi recentemente revolucionado pelo medicamento mesilato de imatinibe (MI), a partir daqui denominado imatinibe, um fármaco inibidor da atividade tirosina quinase. A adesão é crítica para o sucesso do tratamento, porém, variações genéticas interindividuais também estão relacionadas com diferentes tipos de resposta. Desta maneira, a identificação da presença de fatores genéticos que levem a uma baixa resposta e/ou adesão ao tratamento pode antecipar uma futura perda de resposta, o que certamente impactaria no desfecho destes pacientes, permitindo ao corpo clínico a adoção de medidas preventivas. Este projeto tem por objetivo principal verificar a associação entre a presença de polimorfismos nos genes de metabolização e transporte do mesilato de imatinibe e a resposta citogenética e molecular a essa terapia. Serão investigados no presente estudo pacientes com LMC em tratamento com imatinibe atendidos no Grupo Hospitalar Conceição e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Serão preenchidos questionários a fim de determinar informações sobre características demográficas e ingestão concomitante de medicações. Demais informações serão obtidas dos prontuários médicos. Para as análises laboratoriais será coletada

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro:

UF: RS

Telefone: (51)303-8804

Município: PORTO ALEGRE

CEP: 91.050-170

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 362.568

uma amostra de 5 mL de sangue total. As variantes de genes envolvidos na farmacogenética do imatinibe serão determinadas por análise molecular baseada na reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os resultados serão submetidos às análises multivariadas apropriadas a cada desfecho analisado. Espera-se identificar aquelas variantes genéticas que estejam associadas a uma melhor resposta ao tratamento com o fármaco em questão.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Avaliar a associação de polimorfismos em genes de metabolização e transporte do mesilato de imatinibe com marcadores de resposta e adesão ao tratamento com este fármaco em pacientes com leucemia mieloide crônica.

Objetivos específicos

1. Avaliar o nível de resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe dos pacientes através de dados citogenéticos e moleculares.
2. Verificar se há alguma associação entre polimorfismos em genes de metabolização, pertencentes à família do citocromo P450 (CYP3A4 e CYP3A5), e transportadores (ABCB1 e ABCG2), com resposta ao tratamento com imatinibe;
3. Investigar a associação entre os referidos polimorfismos e os níveis plasmáticos de imatinibe.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos envolvidos e os benefícios para o conhecimento científico são relevantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora responsável observou o rigor exigido para a elaboração do projeto de pesquisa ora proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi reformulado de acordo com as considerações apresentadas por parecer anterior do CEP.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do projeto de pesquisa.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 362.566

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o Parecer do relator.

PORTO ALEGRE, 16 de Agosto de 2013

Assinador por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro:

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br