

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

**Renata Leite dos Santos**

**Estudo Farmacogenômico da  
Resposta ao Tratamento com  
Mesilato de Imatinibe em Pacientes  
com Leucemia Mielóide Crônica**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre**

**Porto Alegre**

**2015**

### Catálogo na Publicação

Leite dos Santos, Renata

Estudo Farmacogenômico da Resposta ao Tratamento com Mesilato de Imatinibe em Pacientes com Leucemia Mielóide Crônica / Renata Leite dos Santos. -- 2015.

61 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015.

Orientador(a): Dr<sup>a</sup> Vanessa Mattevi ; coorientador(a): Dr<sup>a</sup> Sandrine Comparsi Wagner.

1. Leucemia Mielóide Crônica. 2. Mesilato de Imatinibe. 3. Enzimas de metabolização do M. Imatinibe. 4. Polimorfismo nos genes de metabolização do MI. I. Título.

**Renata Leite dos Santos**

**Estudo Farmacogenômico da  
Resposta ao Tratamento com  
Mesilato de Imatinibe em Pacientes  
com Leucemia Mielóide Crônica**

Dissertação/Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Suñé Mattevi  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandrine Comparsi Wagner

**Porto Alegre  
2015**

## **Agradecimentos**

Cada passo que damos em nossa vida nada mais é que a união da vontade própria, da persistência e garra à permissão Divina. Cada caminho escolhido apresenta seus obstáculos, suas dificuldades, mas também, seus auxílios e orientações, presentes e anjos que Deus envia para nos ajudar a não desistirmos de nossa meta.

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas.

Às minhas orientadoras Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Suñé Mattevi e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandrine Comparsi Wagner que mais que orientadoras, foram incentivadoras constantes tanto do meu trabalho quanto da minha vida profissional e pessoal. Difícil em palavras expressar o tamanho de minha gratidão e admiração por estas duas mulheres, profissionais incríveis. Pelo apoio nos momentos tão importantes, felizes, mas delicados que ocorreram na união do final do mestrado com uma sonhada gestação. Por toda atenção, compreensão, orientação, muito obrigada.

A Natália Vieira, Fabíola Reginato, Andrea Kurek e Carlos, envolvidos na coleta de amostras, todos sempre muito competentes, dispostos e alegres em cada encontro.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Patologia desta Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), em especial Maristela, Magda, Marília Zandona, Grasiela Agnes sempre muito atenciosas e extremamente prestativas.

Aos funcionários do Hospital Nossa Senhora da Conceição por todo empenho e colaboração para que a coleta de material e de dados ocorresse de forma tão tranqüila e ágil.

À minha família, meu amado esposo Joni e minha amada filha Lauren, por estarem sempre ao meu lado pacientemente acompanhando minha caminhada, sofrendo comigo, me estimulando, principalmente neste período que se uniu à vinda de mais uma integrante na família, nossa pequena Nathalia.

A todas as pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas nesta pesquisa ou que me apoiaram durante mais esta etapa: MUITO OBRIGADA!

## Sumário

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	V
<b>Resumo</b> .....	VII
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Leucemia Mielóide Crônica .....	1
1.1.1. Cromossomo Filadélfia .....	2
1.1.2. Aspectos Clínicos da doença .....	4
1.1.3. Tratamento .....	5
1.1.4. Mesilato de imatinibe .....	11
1.1.4.1. Estudos clínicos com mesilato de imatinibe ...	12
1.1.4.2. Farmacocinética do mesilato de imatinibe .....	14
1.1.4.3. Resistência ao tratamento com mesilato de imatinibe .....	15
1.2. Farmacogenômica e farmacogenética do mesilato de imatinibe .....	18
1.2.1. Enzimas CYP3A4 e CYP3A5 .....	20
<b>2. Objetivos</b> .....	22
<b>3. Referências bibliográficas</b> .....	23
<b>4. Artigo científico</b> .....	29
<b>5. Considerações finais</b> .....	51
<b>6. Anexos</b> .....	53

**Lista de abreviaturas utilizadas**

*ABL*: Abelson

ACAs: anormalidades cromossômicas adicionais

ATP: adenosina trifosfato

*BCR*: *Breakpoint Cluster Region*

BU: bussulfam

CB: crise blástica

Cit: citarabina

DNA: ácido desoxirribonucléico

FA: fase acelerada

FC: fase crônica

HU: hidroxiuréia

IFN- $\alpha$ : interferon alpha

ILD: infusões de linfócitos do doador

*IRIS*: *International Randomized Study of Interferon and STI571*

LMC: leucemia mielóide crônica

MI: mesilato de imatinibe

Ph: cromossomo Philadelphia

RCC: resposta citogenética completa

RCM: resposta citogenética maior

RCP: resposta citogenética parcial

RHC: resposta hematológica completa

RMC: resposta molecular completa

RMM: resposta molecular maior

TCTH: transplante de células-tronco hematopoiéticas

TKIs: inibidores da tirosina quinase

TMO: transplante de medula óssea

## Resumo

**Introdução:** A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa caracterizada pela superprodução neoplásica clonal de células hematopoiéticas. O mesilato de imatinibe (MI) é o fármaco de escolha no seu tratamento. Cerca de 20% dos pacientes não alcançam uma resposta citogenética completa e uma das possíveis causas é a variação nos genes que codificam enzimas metabolizadoras do MI.

**Objetivos:** Avaliar a associação de polimorfismos em genes de metabolização do MI com marcadores de resposta ao tratamento em pacientes com LMC.

**Material e Métodos:** 122 pacientes com LMC em fase crônica de Porto Alegre, RS, Brasil, tratados com o MI, foram avaliados. Os polimorfismos *CYP3A4\*1B* (392A>G; rs2740574) e *CYP3A5\*3* (6986A>G; rs776746) foram genotipados através da reação em cadeia da polimerase em tempo real e relacionados à resposta clínica e aos níveis de MI no plasma e no cabelo, determinados através de cromatografia líquida.

**Resultados:** Não foram observadas diferenças nas frequências genotípicas entre 84 pacientes com resposta ótima e 8 com falha ao tratamento. Níveis plasmáticos de MI foram avaliados em 83 pacientes. Destes, 48.2% apresentaram concentrações inferiores a 1,002 ng / mL, que é considerado limite de concentração para resposta terapêutica. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos e no cabelo de MI entre os genótipos. Os níveis plasmáticos de MI não se correlacionaram com o tempo

de tratamento ( $r = 0,140$ ;  $P = 0,181$ ), no entanto, a concentração de MI no cabelo foi significativamente correlacionada com a duração do uso do medicamento ( $r = 0,345$ ,  $P = 0,016$ ).

**Conclusão:** os resultados deste estudo não identificaram a influência destes dois polimorfismos nos níveis de MI e na resposta ao tratamento, entretanto, reforçam a importância do monitoramento da concentração de MI. Estudos adicionais envolvendo polimorfismos em outros genes devem ser conduzidos, a fim de esclarecer as variações individuais observadas.

## **Estudo Farmacogenômico da Resposta ao Tratamento com Mesilato de Imatinibe em Pacientes com Leucemia Mielóide Crônica**

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Leucemia Mielóide Crônica

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa caracterizada pela superprodução neoplásica clonal de células hematopoiéticas. A morfologia da medula óssea (MO) é caracterizada pela hiperplasia de granulócitos, megacariócitos, e das linhagens monocíticas e linfocíticas (1). É responsável por 15% a 20% de todas as leucemias, acometendo um a dois casos em 100.000 habitantes por ano dentro da população ocidental (2). A idade média para o aparecimento da doença é de 55 anos, mas todas as faixas etárias, inclusive crianças, podem ser afetadas.

A doença se apresenta com uma leucocitose e frequentemente trombocitose no sangue periférico, imaturidade granulocítica, anemia e basofilia. A esplenomegalia é um achado clínico comum além da progressão para leucemia aguda (3, 4). As primeiras descrições científicas desta doença são creditadas a Donné em Paris (1844), Virchow na Alemanha (1845) e Craigie e Bennet em Edimburgo (1845) (5). Embora a LMC já fosse considerada uma forma distinta de leucemia em meados do século XIX, avanços no entendimento desta malignidade só foram possíveis a partir de 1960 através da descoberta de Nowell e Hungerford. Os autores que descreveram pela primeira vez uma anormalidade cromossômica associada a uma neoplasia em humanos, verificaram uma pequena irregularidade em um cromossomo de células leucêmicas de pacientes com

LMC, uma aparente perda do braço longo do cromossomo 22. Posteriormente, Rowley demonstrou que a origem deste cromossomo era uma translocação recíproca do material do cromossomo 22 para a parte terminal do braço longo do cromossomo 9 e vice-versa (Figura 1), ficando assim caracterizada como  $t(9;22)(6)$ .

### 1.1.1. O cromossomo Filadélfia

O cromossomo Filadélfia (Ph - do inglês *Philadelphia*), é considerado o marcador citogenético da LMC, visto que está presente em cerca de 90% dos doentes com esta patologia (7).

Como dito anteriormente, a anormalidade cromossômica característica da LMC é uma translocação recíproca que ocorre entre a região q34 do cromossomo 9 e a região q11 do cromossomo 22 sendo descrita como  $t(9;22)(q34;q11)$  (Figura 1).

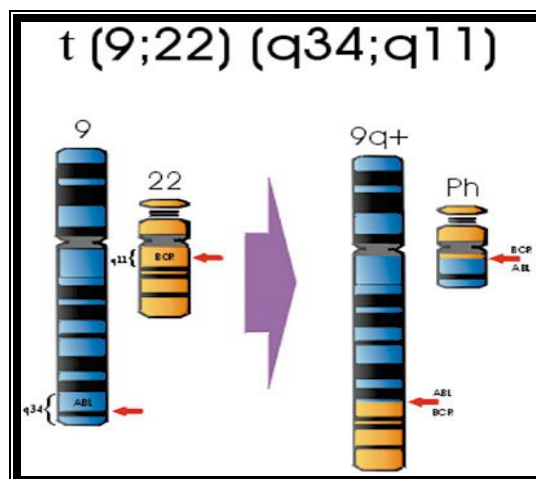


Figura 1: Representação esquemática da formação do cromossomo Ph através da translocação entre os cromossomo 9 e 22

Fonte: <http://www.unesp.br/prope/projtecn/Saude/saude48a.htm>

No cromossomo 22, a quebra ocorre dentro do gene *BCR* e no cromossomo 9 ocorre dentro do gene *ABL*; resultando no gene quimérico *BCR-*

*ABL*. Da expressão deste gene resulta a proteína quimérica Bcr-Abl com atividade tirosinoquinase constitutiva (8, 9). O *BCR-ABL* é regulado pela região promotora do gene BCR, já que seus dois componentes se encontram alinhados com uma sequência de leitura contínua, permitindo a formação de um transcrito (RNA mensageiro) que codifica uma proteína de fusão com propriedades de tirosinoquinase, responsável pela transformação maligna (5, 10). Esta proteína híbrida de 190-kDa ou de 210-kDa (diferente da normal que possui 145-kDa) com atividade tirosinoquinase aumentada, é necessária e suficiente para a atividade oncogênica da fase inicial da LMC (5).

O gene *ABL* é o homólogo humano do oncogene V-ABL do vírus Abelson da leucemia murina (A-MuLV), com 230kb de comprimento. Este gene codifica uma proteína com atividade de tirosinoquinase envolvida em vários mecanismos de regulação da homeostase celular, na regulação do ciclo celular, na resposta ao stress genotóxico e diferenciação celular, integrando sinais extra e intracelulares que influenciam o ciclo celular e a apoptose (11).

A t(9,22) ficou conhecida como cromossomo Filadélfia, em homenagem à cidade onde foi descoberta (12), e pode ser encontrada na linhagem celular mielóide maligna de 90% dos pacientes com LMC. Esta observação firmou-se como um marcador eficiente para o diagnóstico e a principal característica da LMC. O cromossomo Ph também pode ser encontrado na linhagem eritroide, megacariocítica e linfóide B, indicando que a LMC é uma doença da célula tronco hematopoiética, mas não é encontrado nas células de tecidos não hematológicos. Portanto o cromossomo Ph é adquirido e não herdado através das linhagens celulares (13).

### 1.1.2. Aspectos Clínicos da Doença

A LMC possui um curso clínico trifásico (tabela 1): a primeira fase da doença, a Fase Crônica (FC), é seguida pela Fase Acelerada (FAC) e pela Crise Blástica (CB). Cerca de 90% dos pacientes encontram-se na FC que é uma fase facilmente controlável com terapia. Tem duração aproximada de três a quatro anos. Esta é uma fase assintomática, com a avaliação clínica frequentemente normal. A avaliação do sangue periférico mostra uma leucocitose com neutrofilia com todo espectro das células mielóides: neutrófilos segmentados e bastonados, metamielócitos, mielócitos, promielócitos e basófilos. A basofilia, apesar de não ser patognomônica, é altamente sugestiva de LMC (13).

A doença progride para a fase acelerada com duração menor que um a um ano e meio, seguida da crise blástica, que resulta na morte do paciente num prazo de três a seis meses. Aproximadamente 20 a 25% dos doentes morrem de complicações da FAC (14). A FAC é caracterizada por um aumento gradual nos blastos no sangue periférico. Aparecem, no sangue ou na MO, em torno de 15-29% blastos ou blastos e/ou promielócitos. Anemia progressiva em 10 a 19% dos casos, trombocitopenia ( $<100.000/\mu\text{L}$ ), aumento da basofilia no sangue ( $>20\%$ ) e aumento da esplenomegalia também são características desta fase. Há o aparecimento de febre inexplicada, dores ósseas, astenia, sudorese noturna, perda de peso e artralgia (15, 16).

A terceira fase, crise blástica, é caracterizada pela presença de um mínimo de 30% de mieloblastos na MO ou sangue periférico (3, 16).

Tabela 1: Lista dos critérios para definição das fases crônica, acelerada e blástica

<b>Fase da doença</b>	<b>Definição</b>
<b>Fase Crônica (FC)</b>	Leucocitose com desvio à esquerda com predomínio de neutrófilos, aparecimento de células granulocíticas mais imaturas como alguns blastos, promielócitos, mielócitos e metamielócitos.
<b>Fase Acelerada (FAC)</b>	Blastos no SP ou na MO: 15-29% ou blastos+promielócitos no SP ou na MO: >30%  Basófilos no SP $\geq$ 20%  Trombocitopenia persistente (plaquetas < 100.000/ $\mu$ L)  anomalias cromossômicas adicionais /Ph+ no tratamento
<b>Crise Blástica (CB)</b>	Blastos no SP ou na MO $\geq$ 30%

SP: sangue periférico; MO: medula óssea

Fonte: Baccarani *et al*, 2013 (16)

### 1.1.3. Tratamento

Ao longo dos anos, houve marcos terapêuticos na LMC. A irradiação por volta de 1900, o bussulfan (BU) e a hidroxiuréia (HU) nos anos 1950 a 1960, o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), o alfa-interferon ( $\alpha$ -IFN)

nos anos 80 e a terapêutica com infusões de linfócitos do doador (ILD) na recaída pós-transplante, nos anos 1990 (17). No final do século XX uma nova classe de medicamentos surgiu revolucionando o tratamento da LMC, os inibidores da tirosinoquinase (ITKs), cujo principal representante é o medicamento de escolha atual para início da terapia em pacientes em fase crônica, o mesilato de imatinibe (MI) (13, 16, 18).

A LMC é uma leucemia potencialmente curável com transplante alogênico de células tronco, contudo, menos de 30% dos pacientes têm doadores compatíveis. A quimioterapia com  $\alpha$ -IFN produz uma resposta citogenética completa (RCC) entre 5 e 20% dos pacientes, e em geral está associada a sérios efeitos tóxicos. A terapia alternativa com HU ou BU somente alcança uma resposta hematológica por volta dos 50%, além disto, a taxa de resposta diminui rápido quando estes tratamentos são iniciados na última etapa da fase crônica da doença (aproximadamente 12 meses após o diagnóstico) (13, 19). Em contraste, a introdução do MI revolucionou a quimioterapia da LMC. É um dos primeiros medicamentos antineoplásicos desenvolvidos para um alvo molecular específico, um inibidor da transdução de sinais (12, 19, 20).

De acordo com as recomendações propostas pelo grupo *European LeukemiaNet* (ELN), uma organização europeia de médicos, cientistas e pacientes com interesse em leucemia, um tratamento eficaz para LMC é baseado na obtenção simultânea de:

- Resposta Hematológica Completa (RHC)
- Resposta Citogenética Completa (RCC)
- Resposta Molecular Completa (RMC) (16, 21).

A tabela 2 apresenta atualizações nos critérios de resposta terapêutica ao MI propostos em 2009 pelo *ELN* (22) para pacientes com LMC em FC. Nesta atualização, as respostas hematológica, citogenética e molecular devem ser avaliadas aos três, seis, doze e dezoito meses de tratamento e os pacientes devem ser agrupados em categorias de respostas definidas como resposta ótima, sub-ótima ou falha de resposta (16, 22).

A resposta ao tratamento com MI, ou outro ITK, é o mais importante fator prognóstico. Os critérios para definição de “falha”, resposta “ótima” ou “sub-ótima” foram estabelecidos pelo grupo *ELN* baseado em ensaios clínicos denominados *International Randomized Study of Interferon Versus STI571* (IRIS) e nos estudos e acompanhamentos de novas terapias (23).

A falha é a ausência de alguma resposta hematológica aos três meses, ausência de alguma resposta hematológica completa ou qualquer resposta citogenética aos seis meses; ausência de resposta citogenética maior (RCM) aos 12 meses e RCC aos 18 meses além de perda da RH e RCC (23). Resposta falha significa que o tratamento na dose atual já não é satisfatório e o paciente deve receber um tratamento diferente para limitar o risco de progressão da doença e morte (16).

Tabela 2: Definição do tipo de resposta e monitorização da LMC

	<b>Resposta</b>	<b>Resposta</b>	<b>Resposta</b>
	<b>Hematológica</b>	<b>Citogenética</b>	<b>Molecular</b>
	<b>Completa (RHC)</b>	<b>Completa (RCC):</b>	<b>Completa (RMC)</b>
<b>Definição de resposta</b>	Plaquetas <450.000/ $\mu$ L Leucócitos <10.000/ $\mu$ L Diferencial sem granulócitos imaturos <5% basófilos Baço não palpável	Ph+=0% <b>Parcial (RCP):</b> Ph+=1-35% <b>Menor:</b> Ph+=36-65% <b>Mínima:</b> Ph+=66-95% <b>Maior:</b> RCP+RCC	Transcrições não quantificáveis e indetectáveis <b>Maior:</b> 0,1%
<b>Frequência de Monitorização</b>	A cada 2 semanas até que uma resposta completa seja alcançada e confirmada. Após, a cada 3 meses.	A cada 6 meses até que a resposta completa seja alcançada e confirmada. Após, a cada 12 meses.	A cada 3 meses
<b>Método de Monitorização</b>	Hemograma	Exame citogenético convencional	RT-PCR

RCC: resposta citogenética completa; RHC: resposta hematológica completa; RMC: resposta molecular completa; RCP: resposta citogenética parcial; RT-PCR: do inglês *real time reverse transcription polymerase chain reaction*

Fonte: Baccarani *et al*, 2013 (16)

A resposta ótima é definida como: alcance de uma RCM aos 6 meses; uma RCC aos 12 meses; e uma Resposta Molecular Maior (RMM) aos 18 meses. Está associada a uma longa sobrevida, isto é, o tempo de duração de vida igual a da população em geral (16),

Entre ambas as respostas, existe uma zona intermediária chamada de “*Warning*” ou alerta indicando uma resposta subótima. A zona de alerta indica que as características da doença e a resposta ao tratamento requerem um monitoramento mais frequente para permitir a alteração da terapia em tempo hábil no caso de falha de tratamento (16). Na tabela 3 é apresentado o esquema de definição de resposta ao tratamento com ITKs de primeira linha segundo ELN.

O ideal no tratamento com MI é o alcance de uma RHC aos três meses, de uma RCM aos seis meses e uma RCC em um ano de tratamento. Depois de atingida uma RCM, espera-se que o paciente alcance uma RMM o que confere uma melhor sobrevida (21). Para análise da resposta citogenética, o grupo ELN recomenda avaliação pelo cariótipo convencional de células da MO antes do início do tratamento e pelo menos a cada 6 meses até que uma RCC seja alcançada e confirmada. Após, realizar análise citogenética a cada 12 meses (16, 21).

Para acompanhar a resposta molecular, o ELN indica realizar RT-PCR quantitativa a cada 3 meses avaliando a escala internacional (*IS* – do inglês *International Scale*), a razão de transcritos *BCR-ABL/ABL* e a resposta é expressa em escala logarítmica *BCR-ABL %* onde 10%, 1%, 0,1%, 0.01%,

0,0032% e 0,001% correspondem a um decréscimo de 1, 2, 3, 4, 4.5, e 5 logs, respectivamente (16).

Tabela 3. Definições de respostas ao mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica avaliadas aos três, seis, doze e dezoito meses de tratamento, segundo o *European Leukemia Net* (16).

	<b>Ótima</b>	<b>Alerta</b>	<b>Falha</b>
3 meses	RHC	Menor que RHC	Sem RH
6 meses	RCP	Menor que RCP	Sem RC
	Ph+<35%	Ph+>35%	Ph+>95%
12 meses	RCC	Menor que RCC	Menor que RCP Ph+>35%
18 meses	RMM	Menor que RMM	Menor que RCC
A qualquer momento		ACA além do Ph+ perda de MMRa, mutações	Perda de RHC, RCC, mutações

**RHC:** resposta hematológica completa; **RCP:** resposta citogenética parcial; **RCC:** resposta citogenética completa; **RMM:** resposta molecular maior; **ACA:** anomalias cromossômicas adicionais. Fonte: Bacarani *et al.* (16).

#### 1.1.4. Mesilato de Imatinibe

O MI, originalmente designado por “*Signal Transduction Inhibitor 571*” (STI-571), é um derivado 2-fenilaminopirimidina (Figura 2) que atua inibindo seletivamente o sítio de ligação do ATP na proteína quinase Bcr-Abl.

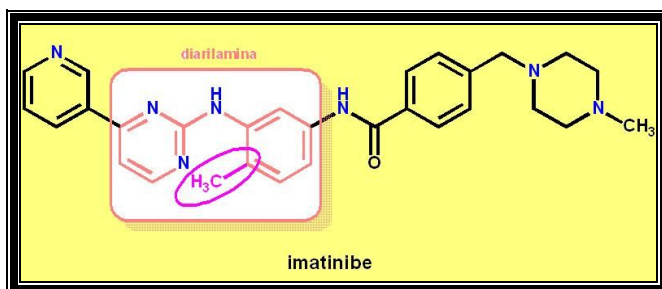


Figura 2: estrutura química do mesilato de imatinibe

Fonte: [http://ejb-eliezer.blogspot.com.br/2012\\_06\\_01\\_archive.html](http://ejb-eliezer.blogspot.com.br/2012_06_01_archive.html)

O MI bloqueia a atividade da enzima tirosinoquinase (Figura 3) e ao contrário de outras estratégias de tratamento apresenta efeitos colaterais mínimos e produz altas taxas de resposta citogenética duradoura (14). A oncoproteína Bcr-Abl possui um sítio de ligação para uma molécula de ATP. O substrato é ativado pela fosforilação de um resíduo de tirosina pelo ATP. Fosforilada, esta proteína pode interagir com sua molécula efetora e desencadear a LMC. O MI inibe sua capacidade enzimática de transferir um grupo fosfato do ATP e fosforilar resíduos de tirosina dos substratos, o que impede a transdução de sinais necessários para induzir a proliferação celular e apoptose sem afetar as células normais (6, 19, 24, 25).

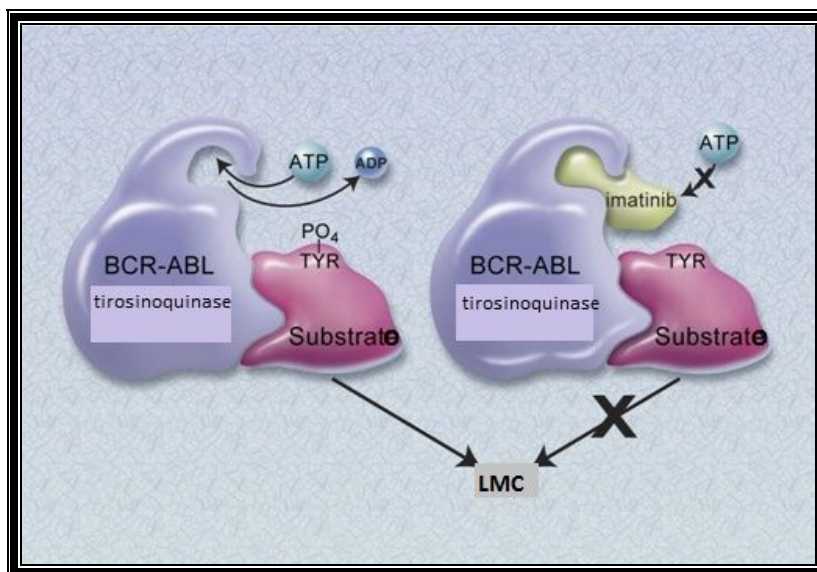


Figura 3: representação esquemática do mecanismo de ação da oncoproteína Bcr-Abl e sua inibição pelo MI.

Fonte: Druker, 2008 (25)

#### 1.1.4.1. Estudos Clínicos com MI

Os primeiros estudos com MI em pacientes com LMC datam de 1998, com os estudos clínicos de Fase I realizados em três centros nos EUA, para avaliar a dose e a eficácia do MI. Este estudo foi realizado em 83 pacientes com LMC em FC, intolerantes ou resistentes ao tratamento com  $\alpha$ -INF. Os pacientes foram subdivididos em grupos e receberam doses escalonadas de MI entre 25-1000 mg/dia via oral (1). As respostas hematológicas foram observadas com doses acima de 85 mg/dia. Quase todos os pacientes (53 dos 54) tratados com uma dose mínima de 300mg/dia de MI alcançaram uma RHC. Dos 54 pacientes, 29 (54%) obtiveram uma resposta citogenética: 17 (31%) atingiram uma RCM e 7 (13%) atingiram RCC. Nesta fase foram registrados

apenas efeitos secundários mínimos, que não tornaram impeditivo a continuidade do tratamento com MI (1).

Os ensaios clínicos de fase II iniciaram em 1999; foram conduzidos três estudos internacionais, abertos, não controlados, realizados em pacientes com LMC em FC, FA e CB (14, 26). Um total de 532 pacientes em FC, sem resposta ao tratamento com  $\alpha$ -INF, foram submetidos a 400mg/dia de MI por via oral. Destes, 60% atingiram RMC e 90% RHC com uma taxa de sobrevivência livre de progressão da doença de 89% após seguimento mediano de 18 meses. Apenas 2% dos pacientes descontinuaram o tratamento devido a efeitos adversos (14, 27).

Em outro estudo de fase II, com pacientes em FA ou CB, foram ministradas doses de MI compreendidas entre 400 e 600 mg/dia. O MI induziu uma taxa de RHC, RCM e RCC em 34%, 24% e 17% dos pacientes respectivamente (26, 28).

Os resultados obtidos nestas duas fases impulsionaram um ensaio randomizado que comparou a eficácia do tratamento com MI 400mg/dia à da combinação terapêutica  $\alpha$ -INF e citarabina em doses baixas, em pacientes com LMC em FC inicial sem qualquer tratamento prévio (29, 30). São os estudos de fase III descritos abaixo.

A fase III dos ensaios clínicos, denominada *IRIS (International Randomized Study of Interferon Versus STI571)* envolveu um estudo randomizado com 1106 pacientes, 533 em cada braço. Ao fim de 19 meses, 87% dos pacientes no grupo do MI atingiram RCM, contra 35% do grupo tratado com  $\alpha$ -INF e citarabina. Ainda, 76% dos pacientes tratados com MI atingiram RCC contra 15% do outro grupo (7, 30).

Atualmente, o MI é o medicamento de escolha no tratamento de pacientes com LMC na FC e Ph(+). Ele induz a um longo período de remissão e paralisa a progressão da LMC nos primeiros estágios e é bem tolerado quando comparado aos outros citostáticos (31).

#### 1.1.4.2. Farmacocinética do MI

Após o uso oral, o MI é rapidamente absorvido no intestino devido sua rápida dissolução em pH ácido. Ele deve ser administrado durante uma refeição e água para reduzir os efeitos colaterais gastrointestinais. Entretanto, uma alimentação gordurosa pode prolongar o tempo para alcançar a concentração máxima no plasma. Em condições normais, a concentração plasmática máxima é alcançada entre 2 a 4 horas. Após administração repetida de 400 mg/dia, a concentração plasmática média é de 1 mol/L após 24 horas (32). O MI é biotransformado pelas isoenzimas hepáticas do complexo citocromo P450 (CYPs). O MI serve como substrato para as isoformas CYP3A4 e CYP3A5 (Figura 4). Estas são as principais isoenzimas envolvidas, mas outras têm um envolvimento menor (24, 32, 33), iniciando reações de N-metilação, ao principal metabólito circulante com atividade terapêutica, o piperazínico N-demetilado (CGP74588) (1). O MI se liga extensivamente (95%) às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina e à alfa-glicoproteína ácida; somente uma pequena fração livre tem a possibilidade de entrar nas células e exercer seu efeito farmacológico (1, 34).

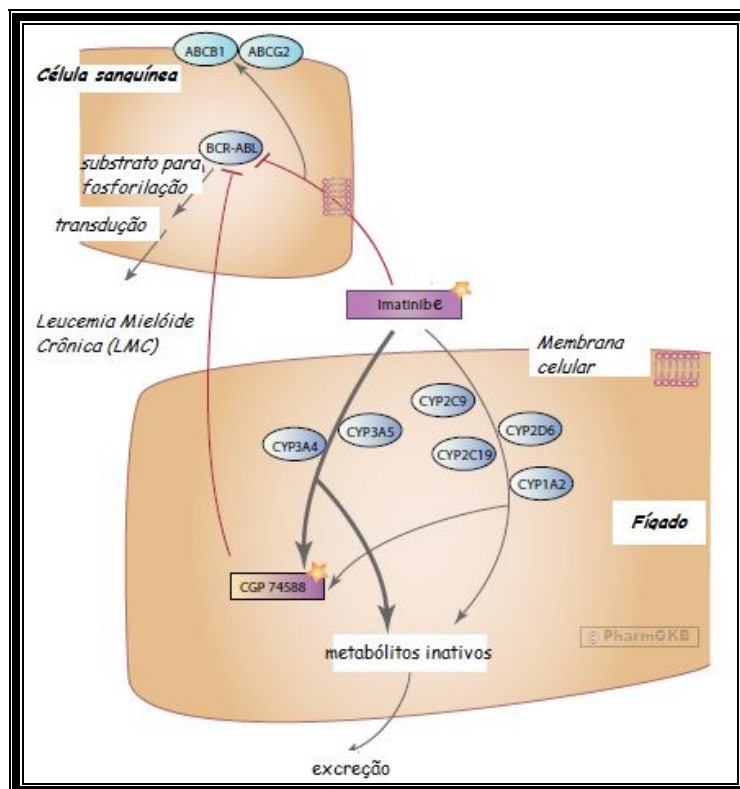


Figura 4. Esquema da ação farmacocinética e farmacodinâmica do MI na LMC

Fonte: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA164713427#PGG>

#### 1.1.4.3. Resistência ao tratamento com MI

Apesar dos resultados positivos ao tratamento, cerca de 20% dos pacientes que usam o MI não alcançam uma RCC, a qual é o maior objetivo da terapia. Além disso, alguns pacientes desenvolvem efeitos colaterais intoleráveis ou resistência ao tratamento ao longo do tempo. Uma RMM também é considerada uma meta importante na terapia. A probabilidade de perda da RCC em 7 anos é apenas de 3% entre os pacientes com RMM aos 18 meses contra 26% entre os pacientes com RCC mas não RMM.

Os fatores que podem estar associados com uma resposta subótima ou de alerta ao MI e à falha ao tratamento incluem:

- fatores biológicos, como a presença de mutação no sítio BCR-ABL ou outra variante genética, ou mutação no transportador do medicamento envolvido na captação intracelular do fármaco;
- fatores clínicos, como o estado da doença do paciente;
- fatores farmacocinéticos, como o metabolismo ou o transporte do fármaco, ou interações medicamentosas (33, 35).

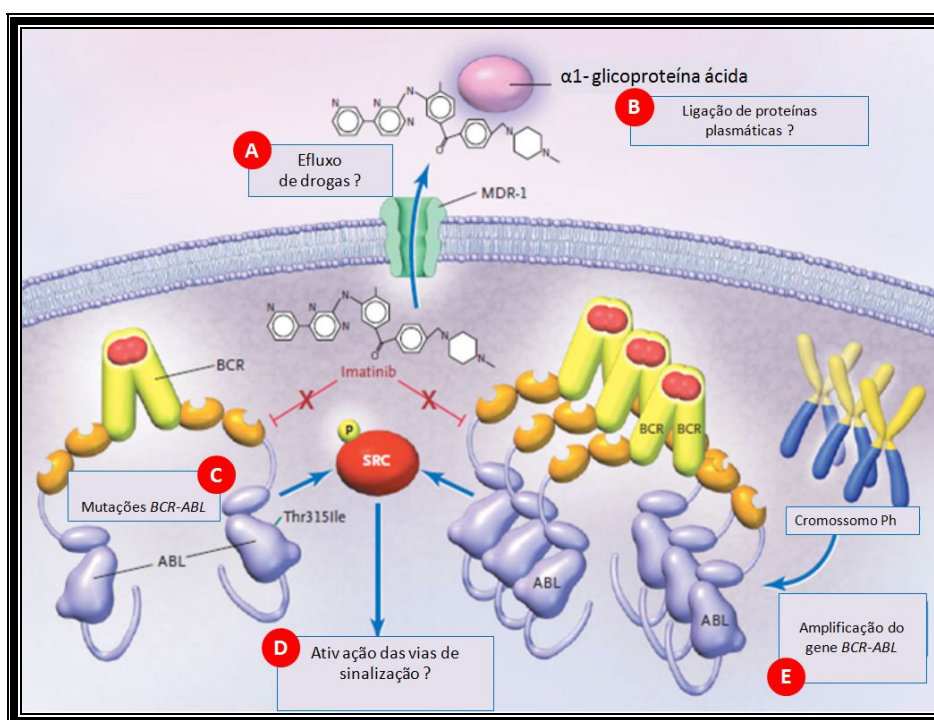
Cerca de 20-30% dos pacientes desenvolvem resistência ao MI; esta ocorre em qualquer fase da doença, sendo mais frequente em fases avançadas (36). A recidiva da doença após resposta inicial ao MI é identificada em todos os pacientes em CB, em cerca de 50% dos pacientes em FA e em 15-20% dos pacientes em FC (37).

A resistência pode ser definida como primária (ausência de resposta) se o paciente nunca apresentou resposta ao MI ou secundária (perda de resposta) quando é adquirida e ocorre devido a fatores BCR-ABL dependentes ou independentes (23, 36).

Cinco diferentes mecanismos podem determinar a resistência ao MI em LMC (Figura 5):

1. O maior efluxo de MI nas células leucêmicas por ação de transportadores de membrana, como as proteínas de resistência a múltiplas drogas, pode reduzir as concentrações intracelulares do agente (mecanismo A).

2. A maior ligação do fármaco a proteínas plasmáticas, como a  $\alpha$ -glicoproteína ácida, pode reduzir sua concentração intracelular (mecanismo B).
3. Mutações no domínio quinase *BCR-ABL* podem reduzir o seu efeito terapêutico (mecanismo C) (38).
4. A ativação das vias de sinalização celular por membros da família *Src* pode determinar proliferação celular contínua (mecanismo D).
5. Ainda, a amplificação do gene *BCR-ABL* induz a superprodução da proteína alvo que pode não ser inibida completamente pela terapia com MI (mecanismo E) (39).



**Figura 5.** Representação esquemática do mecanismo de resistência ao MI. O aumento do efluxo de drogas das células leucêmicas por ação de transportadores de membrana, como as proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR-1), pode diminuir as concentrações intracelulares do MI (mecanismo A). A maior ligação do fármaco a  $\alpha$ -glicoproteína ácida pode diminuir sua concentração efetiva (mecanismo B). Mutações no domínio quinase

*BCR-ABL*, incluindo Thr315Ile, podem diminuir ou inibir o efeito terapêutico do MI (mecanismo C). A ativação das vias de sinalização por membros da família Src estimula continuamente a proliferação celular (mecanismo D). A amplificação do gene *BCR-ABL* induz a superprodução da proteína alvo que deve ser inibida pela terapia com MI (mecanismo E). FONTE: Adaptado de Krause DS, Van Etten RA., 2005 (39).

Cerca de 5% dos pacientes apresentam resistência primária hematológica ao MI e, cerca de 15%, resistência citogenética. A resistência primária deve-se geralmente aos mecanismos BCR-ABL independentes, mecanismos D e E. Também pode ocorrer modificação enzimática do MI pelo complexo enzimático P450 no fígado ou maior produção de albumina e de alfa-1 glicoproteína ácida às quais o MI se liga cerca de 95% podendo neutralizar a atividade ou diminuir a biodisponibilidade do fármaco (10, 36). Os fatores BCR-ABL dependentes causam resistência secundária e podem ser os seguintes: (1) mutações de ponto do domínio quinase da BCR-ABL intervindo na ligação do MI ao alvo na enzima (38), (2) amplificação da proteína BCR-ABL e (3) superexpressão do gene BCR-ABL (36).

## 1.2 Farmacogenômica e farmacogenética do MI

A farmacogenômica surgiu em 1995 da união da farmacogenética com a genômica e a biotecnologia. A farmacogenética consiste no estudo das variações interindividuais na sequência de DNA, relacionadas com a resposta a fármacos, eficácia e segurança dos mesmos (40). A farmacogenômica é definida como o estudo da expressão de genes individuais relevantes na suscetibilidade a doenças, bem como a resposta a fármacos em nível celular

ou tecidual, individual ou populacional, procurando uma relação entre o metabolismo de fármacos e os estudos moleculares de DNA e RNA (41).

A maioria dos fármacos age a partir da interação com proteínas carreadoras, transportadoras ou enzimas de metabolização. Essas proteínas determinam a absorção, distribuição, excreção, a chegada ao sítio de ação e a resposta farmacológica. As variações genéticas, tanto no alvo molecular quanto nos genes envolvidos na doença e as enzimas que metabolizam o fármaco podem ser determinantes para a eficácia e/ou toxicidade do fármaco (41).

Os polimorfismos genéticos são diferenças de ocorrência natural no DNA e muitos deles não causam efeito algum, porém, alguns afetam a expressão e função de proteínas, resultando em fenótipos suscetíveis a doenças e com respostas diferenciadas aos medicamentos. O genoma humano apresenta cerca de uma troca de nucleotídeos a cada 300 pares de bases, chamados de polimorfismos de nucleotídeo único (*SNP* – do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) (41).

Os polimorfismos genéticos em enzimas metabolizadoras permitem a distinção de três subgrupos com diferentes capacidades de transformar fármacos em metabólitos. Indivíduos capazes de metabolizar os fármacos com eficiência são chamados metabolizadores rápidos. Os que têm deficiência no metabolismo, devido à mutação ou deleção em ambos os alelos do gene, são denominados metabolizadores lentos. Ainda, indivíduos com uma super expressão da enzima são chamados metabolizadores ultra-rápidos. Metabolizadores lentos podem apresentar reações adversas, toxicidade ou diminuição da eficácia com doses-padrão de um determinado fármaco.

A importância da investigação de polimorfismos deve-se ao fato de que, uma vez identificado e caracterizado em termos de expressão, funcionalidade e frequência, torna-se possível uma associação do polimorfismo com a doença e sua progressão ou o efeito de um fármaco (41).

### 1.2.1 Enzimas CYP3A4 e CYP3A5

O MI é metabolizado pelas isoenzimas do complexo citocromo P450 no fígado. Seu metabolismo é mediado pelas isoenzimas CYP3A4 e CYP3A5, mas outras isoenzimas como CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 e CYP2C19 também estão envolvidas (Figura 4). A enzima CYP3A4 está envolvida em aproximadamente 50% do metabolismo das fármacos em geral (42, 43). O principal metabólito do MI é o derivado piperazínico N-demetilado. Baseado em dados in vitro, este metabólito tem potência semelhante ao composto original (32).

A atividade enzimática de CYP3A se dá principalmente pelos genes CYP3A4 e CYP3A5 (44). O alelo CYP3A4\*1B é definido pelo polimorfismo -392A>G, que está localizado no elemento de resposta específica de nifedipina da região promotora 5' do gene CYP3A4 (45). Esta alteração de nucleotídeos causa o aumento da transcrição de CYP3A4 in vitro, embora estes resultados permaneçam controversos. Alguns autores sugeriram que alguns dos efeitos atribuídos inicialmente para o alelo CYP3A4\*1B são, na verdade, devidos a CYP3A5\*1, porque os dois genes estão localizados muito próximos um do outro, no cromossomo 7q (46). A substituição 6986 A>G no gene CYP3A5 que caracteriza o alelo \*3 resulta em uma proteína não funcional truncada no

aminoácido 102. Desta forma, indivíduos homozigotos \*3/\*3 são considerados CYP3A5 não-expressores (46).

Takahaschi *et al.* investigaram, em japoneses, o papel da variação farmacogenética no metabolismo e eficácia do MI. SNPs nos genes de metabolização do MI, entre eles CYP3A5\*3 foram avaliados em um total de 67 pacientes com LMC em fase crônica, tratados com MI (400mg, 300mg, menos de 300mg e mais de 400mg/dia). As concentrações plasmáticas mínimas de MI ajustadas por dose para CYP3A5 foram determinadas. Não houve diferenças significativas nas concentrações de MI dose-ajustadas entre indivíduos portadores do alelo o CYP3A5\*1 e indivíduos homozigotos \*3/\*3 (47)

Camargo *et al.* (48) avaliaram na Colômbia a frequência dos polimorfismos CYP3A4\*1B e CYP3A4\*2 em uma amostra de pacientes com LMC tratados com MI e em uma amostra controle. A análise citogenética revelou uma correlação direta entre o tempo de tratamento com MI e redução do percentual de blastos Ph(+). As genotipagens mostraram que a presença do polimorfismo CYP3A4\*1B não afetou a resposta citogenética Ph(+) em pacientes tratados com MI e que a variante CYP3A4\*2 estava ausente nessa população.

Poucos estudos, como os descritos anteriormente têm-se centrado na associação de polimorfismos nos genes que codificam as enzimas CYP3A4 e CYP3A5 na resposta ao tratamento com MI. Estes estudos foram realizados em amostras muito pequenas ou somente em indivíduos asiáticos, que apresentam uma base genética muito diferente da nossa população.

Frente ao exposto, foram definidos os objetivos do presente estudo.

## 2 Objetivos

### 2.2 Objetivo geral

Avaliar a associação de polimorfismos nos genes de metabolização do mesilato de imatinibe, CYP3A4 e CYP3A5, com marcadores de resposta e adesão ao tratamento com este fármaco em pacientes com leucemia mielóide crônica.

### 2.3 Objetivos específicos

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

## 1.6. Referências Bibliográficas

1. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1031-7.
2. Perrotti D. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2254-64.
3. Associação Brasileira de Hematologia EH, Sociedade Brasileira de P, Sociedade Brasileira de P. [Chronic myeloid leukemia]. *Rev Assoc Med Bras*. 2013;59(3):220-32.
4. Anunciação SF. Aspectos Diagnósticos da Leucemia Mielóide Crônica e Detecção de Doença Residual Mínima. *Estudos*. 2008;35(11/12):1069-83.
5. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med*. 2003;349(15):1451-64.
6. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1038-42.
7. Deininger MW, Druker BJ. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol Rev*. 2003;55(3):401-23.
8. Frazer R, Irvine AE, McMullin MF. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. *Ulster Med J*. 2007;76(1):8-17.
9. Nowell PC. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2033-5.
10. Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(8):1619-30.

11. Inokuchi K. Chronic myelogenous leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies. *J Nippon Med Sch.* 2006;73(4):178-92.
12. Garcia-Manero G, Talpaz M, Giles FJ, Cortes J, Faderl S, O'Brien S, et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia with weekly polyethylene glycol formulation of interferon-alpha-2b and low-dose cytosine arabinoside. *Cancer.* 2003;97(12):3010-6.
13. Kalaycio ME. Chronic myelogenous leukemia: the news you have and haven't heard. *Cleve Clin J Med.* 2001;68(11):913, 7, 20-1, 25-6.
14. Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien S, Giles F, Garcia-Manero G, Faderl S, et al. Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic responses. *Blood.* 2003;101(1):97-100.
15. Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Beth Rios M, Shan J, et al. Effects of age on prognosis with imatinib mesylate therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer.* 2003;98(6):1105-13.
16. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood.* 2013;122(6):872-84.
17. Henkes M, van der Kuip H, Aulitzky WE. Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (Glivec, Gleevec trade mark). *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(1):163-87.

18. Dobbin JA. Mesilato de Imatinibe para o Tratamento da Leucemia Mieloide Crônica. Rev. Bras. de Cancerologia. [Revisão de Literatura]. 2002;48(3):429-38.
19. Camargo M. Tratamiento con imatinib y el farmacogenotipo CYP3A4 en relación con la expansión clonal Ph(+) en leucemia mieloide crónica (LMC). Colômbia Médica. 2008;39:314-22.
20. Lopes NR. Inibidores da Tirosina Quinase na Leucemia Mielóide Crônica. Rev Bras Hematol Hemoter. 2009;31(6):449-553.
21. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2006;108(6):1809-20.
22. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. J Clin Oncol. 2009;27(35):6041-51.
23. Pagnano BBK. Leucemia Mielóide Crônica - Causas de falha do tratamento com mesilato de imatinibe. Rev Bras Hematol Hemoter. 2008;30(1):22-6.
24. Leveque D, Maloisel F. Clinical pharmacokinetics of imatinib mesylate. In Vivo. 2005;19(1):77-84.
25. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. Blood. 2008;112(13):4808-17.
26. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients

with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*. 2002;99(10):3530-9.

27. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 2002;346(9):645-52.

28. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. 2002;99(6):1928-37.

29. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood*. 2008;111(8):4022-8.

30. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(11):994-1004.

31. Zaharieva MM, Amudov G, Konstantinov SM, Guenova ML. *Modern Therapy of Chronic Myeloid Leukemia*. IntechOpen. 2013.

32. de Kogel CE, Schellens JH. Imatinib. *Oncologist*. 2007 Dec;12(12):1390-4.

33. Takahashi N, Miura M. Therapeutic drug monitoring of imatinib for chronic myeloid leukemia patients in the chronic phase. *Pharmacology*. 2011;87(5-6):241-8.

34. Widmer N, Decosterd LA, Csajka C, Leyvraz S, Duchosal MA, Rosselet A, et al. Population pharmacokinetics of imatinib and the role of alpha-acid glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;62(1):97-112.
35. Marktel S, Marin D, Foot N, Szydlo R, Bua M, Karadimitris A, et al. Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. *Haematologica*. 2003;88(3):260-7.
36. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*. 2009;16(2):122-31.
37. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006 1;108(1):28-37.
38. Saglio G, Fava, C. Chronic myelogenous leukemia: the present and the future of the TKI therapy. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(2):57-60.
39. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*. 2005;353(2):172-87.
40. Hughes JE. Genomic technologies in drug discovery and development. *Drug Discov Today*. 1999;4(1):6.
41. Fontana V. O conceito de gene está em crise. A farmacogenética e a farmacogenômica também? *Biotemas*. 2006;19(3):87-96.

42. Bottorff M, Hansten P. Long-term safety of hepatic hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitors: the role of metabolism-monograph for physicians. *Arch Intern Med.* 2000;160(15):2273-80.
43. Cavalli SA, Hirata MH, Hirata RD. Detection of MboII polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Chem.* 2001;47(2):348-51.
44. Thompson EE, Kuttub-Boulos H, Witonsky D, Yang L, Roe BA, Di Rienzo A. CYP3A variation and the evolution of salt-sensitivity variants. *Am J Hum Genet.* 2004;75(6):1059-69.
45. [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org). The Pharmacogenomics Knowledgebase. Accessed in 12 – 6- 2014. 2014.
46. [www.omim.org](http://www.omim.org). O-Aa. Online Mendelian Inheritance in Man. Accessed in 12- 5 – 2014.
47. Takahashi N, Miura M, Scott SA, Kagaya H, Kameoka Y, Tagawa H, 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.* 2010;55(11):731-7.
48. Camargo M, Marin, M.I.S., Zea O., Saavedra, D. Tratamiento con imatinib y el Farmacogenotipo CYP3A4 en relación con la expansión clonal Ph(+) en leucemia mieloide crónica (LMC). *Colombia Médica.* 2008;39(4):314-22.

4. Artigo Científico

**INFLUENCE OF CYP3A4 AND CYP3A5 GENE POLYMORPHISMS ON  
RESPONSE TO CHRONIC MYELOID LEUKEMIA TREATMENT WITH  
IMATINIB MESYLATE**

**Manuscrito em preparação para submissão ao  
Periódico *International Journal of Clinical Oncology*,  
Fator de impacto: 2,17**

**INFLUENCE OF CYP3A4 AND CYP3A5 GENE POLYMORPHISMS ON  
RESPONSE TO CHRONIC MYELOID LEUKEMIA TREATMENT WITH  
IMATINIB MESYLATE**

Renata Leite dos Santos<sup>1</sup>, Natalia Moreira Vieira<sup>2</sup>, Fabíola Reginato<sup>3</sup>, Marília Zandoná<sup>3</sup>, Marcelo Capra<sup>4</sup>, Laura Fogliato<sup>5</sup>, Rafael Linden<sup>6</sup>, Marina Venzon Antunes<sup>6</sup>, Sandrine Wagner<sup>3</sup>, Vanessa S. Mattevi<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>6</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, Brazil

Correspondence to:

Prof. Vanessa Suñé Mattevi

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre,

Rua Sarmiento Leite, 245, sala 309,

CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55 51 33038763

E-mail: [vmattevi@ufcspa.edu.br](mailto:vmattevi@ufcspa.edu.br)

## Abstract

**Objectives:** To evaluate the association of polymorphisms in metabolizing genes of imatinib mesylate (IM) CYP3A4 and CYP3A5 with markers of response to treatment with this drug in patients with chronic myeloid leukemia (CML).

**Materials and Methods:** A total of 122 patients with CML in chronic phase (68 men) from two public hospitals in Porto Alegre, Brazil, who were treated with IM were included in this study. Plasma and hair concentrations of IM were measured through liquid chromatography tandem mass spectrometric methodologies. Genotypes of 104 patients for *CYP3A4\*1B* and *CYP3A5\*3* variants were determined through real-time polymerase chain reaction. Response to IM (optimal, warning or failure) was defined according European LeukemiaNet Recommendations for the management of CML.

**Results:** Genotype frequencies were not different between the 84 individuals with optimal response and 8 patients with treatment failure. IM plasma levels were evaluated in 83 patients. Of these, 40 (48.2%) patients had concentrations lower and 43 (51.8%) greater than 1,002 ng / mL, which is considered the threshold concentration to attain therapeutic response. IM concentrations were also measured in the hair of 68 patients. No statistically significant differences were observed for both raw measurements and dose-adjusted IM plasma and hair levels between genotypes. Plasma levels of IM did not correlate with the treatment time ( $r = 0.140$ ;  $P = 0.181$ ). However, the concentration of IM in hair was significantly correlated with the duration of drug use ( $r = 0.345$ ,  $P = 0.016$ ).

**Conclusions:** We were not able to detect any influence of the two SNPs analyzed in IM levels or response, whereas we can reinforce the relevance of the evaluation of IM concentrations in monitoring the CML treatment. Further studies should include other gene variants that can potentially modulate these levels, once the mechanisms behind the high interindividual variation in IM levels and response still need to be clarified.

**Key words:** chronic myeloid leukemia, imatinib mesilate, CYP3A4, CYP3A5

## Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal neoplastic disorder of hematopoietic stem cells caused by expression of the chimeric *BCR-ABL* (breakpoint cluster region - Abelson oncogene) tyrosine kinase oncogene, the product of the t(9;22) Philadelphia translocation (1). Expression of the *BCR-ABL* gene is sufficient to cause chronic phase CML, whereas progression of disease to blast crisis is thought to depend on the development of additional genetic changes leading to loss of differentiation and an increasingly aggressive clinical presentation (2).

The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesilate (IM) has revolutionized the treatment of CML (3). The success of IM is mostly due to its excellent efficacy but also to its tolerability (4). It is a rationally designed, potent competitive inhibitor of the Bcr-Abl protein tyrosine kinase. In preclinical studies, IM showed specific antileukemic activity both *in vitro* and *in vivo* against *BCR-ABL*-positive cells, including eradication of leukemia induced by injection of cell lines derived from patients with blast-crisis CML (5). However, despite its outstanding efficacy, nearly 20% of patients who take IM do not achieve a complete cytogenetic response (CCyR), which is the major objective of therapy and is associated with prolonged survival (6). Moreover, some patients develop intolerable side effects or drug resistance over time. A major molecular response (MMR) is also considered an important therapeutic target (7). The probability of loss of CCyR within 7 years is only 3% among patients with an MMR at 18 months versus 26% among patients with CCyR but no MMR (8).

Despite of the initial recommendation of a standard dosage of 400 mg of IM per day, several studies had identified a relationship between plasma IM levels and treatment efficacy (9). In a study performed by Larson *et al.*, patients with CCyR had mean IM plasma trough levels of  $1009 \pm 544$  ng/mL, while those who did not attain CCyR presented levels of  $812 \pm 409$  ng/mL (9). Several other studies had confirmed the relation between IM trough plasma concentration and therapeutic response, with a widely accepted concentration threshold of 1002 ng/mL (10, 11).

Pharmacogenomics studies the effect of the variability in the human genome in the modulation of therapeutic response or side effects of a given drug. Genetic variations in both the molecular target, as the genes involved in the disease, and the enzymes that metabolize the drug or its transporters may be crucial for its effectiveness and / or toxicity (12). It is already known that IM is mostly metabolized by the hepatic cytochrome P450 enzyme system; mainly CYP3A4 and CYP3A5 isoforms, which exhibit widely variable activity among different individuals (1). Few studies have focused on the putative role of the genes encoding these enzymes on the response to the treatment with imatinib (13, 14). These studies were performed in very small samples or in Asian individuals, who present a very different genetic background from our population.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the association between polymorphisms in *CYP3A4* and *CYP3A5* genes and the response to treatment and with IM plasma and hair concentrations in patients with CML.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **PATIENTS**

A total of 122 patients with CML in chronic phase (68 males) from two public hospitals in Porto Alegre, RS, Brazil, who were being treated with IM, were included in this study. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the institutions involved; informed consent for the use of the biologic samples was obtained from all patients.

### **CLINICAL PARAMETERS**

A CCyR was defined as the finding of Philadelphia positive metaphases in 20 or more examined cells. MMR was defined as a threefold log reduction in BCR-ABL transcripts measured using real-time quantitative reverse transcriptase-mediated PCR. Response to IM (optimal, warning or failure) was defined according European LeukemiaNet Recommendations for the management of CML (2013). Summarizing, optimal response is associated with the best long-term outcome that is, with a duration of life comparable with that of the general population, indicating that there is no indication for a change in that treatment. Failure means that the patient should receive a different treatment to limit the risk of progression and death. Between optimal and failure, there is an intermediate zone, which is designated as “warning.” Warning implies that the characteristics of the disease and the response to treatment require more frequent monitoring to permit timely changes in therapy in case of treatment failure (8). The ideal treatment response with IM is achieved with a

complete hematological response (CHR) at three months, a major cytogenetic response (MCR) at six months and a complete cytogenetic response (CCyR) in one year of treatment. After achieving a MCR, it is expected that the patient reaches a major molecular response (MMR) which gives a better survival (15). For analysis of cytogenetic response, ELN group recommends evaluation by conventional MO cells karyotype before starting treatment and at least every 6 months until a CCyR is reached and confirmed. Then, perform cytogenetic analysis every 12 months (8, 15). To monitor the molecular response, the ELN indicates performing quantitative RT-PCR every 3 months evaluating the international scale (IS), the ratio of BCR transcripts -ABL / ABL. The response is expressed in logarithmic scale BCR-ABL% where 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.0032% and 0.001% corresponds to a decrease of 1, 2, 3, 4, 4.5, and 5 logs respectively (8).

The samples used for IM response evaluation were obtained from patients on the same day of the samples used for plasma and hair IM levels determination.

## **DETERMINATION OF IMATINIB PLASMA CONCENTRATIONS**

The blood samples were collected by venipuncture 24 h ( $\pm$  2 h) after oral daily intake for the analysis of IM plasma concentrations in EDTA-containing tubes. The tubes were centrifuged and the resulting plasma was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the determination of IM plasma concentration. Imatinib plasma concentration was determined by liquid chromatography tandem mass spectrometric methodology (LC-MSMS, Micromass UK, Ltd., Manchester, UK)

(Linden R, personal communication). These analyses were performed at the Laboratory of Toxicology from the Health Sciences Institute at Feevale University, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

### **DETERMINATION OF IMATINIB HAIR CONCENTRATIONS**

Hair samples were cut as close as possible to the scalp in the occipital region, washed, weighed, processed and analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometric methodology (LC-MSMS, Micromass UK, Ltd., Manchester, UK) (Capron A, personal communication). These analyses were also performed at the Laboratory of Toxicology from the Health Sciences Institute at Feevale University, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

### **GENOTYPING OF *CYP3A4* AND *CYP3A5* POLYMORPHISMS**

DNA was extracted from whole blood using the previously described method of precipitation with a high salt concentration (16). The *CYP3A4*\*1B (392A>G; rs2740574) and *CYP3A5*\*3 (6986A>G; rs776746) polymorphisms were genotyped through real-time polymerase chain reaction with the use of an allele discrimination assay with hydrolysis probes (TaqMan SNP genotyping assay, Applied Biosystems, Foster City, CA). These SNPs were selected for this study based on their putative functionality and comparability with previous studies.

## STATISTICAL ANALYSIS

Differences in IM trough concentration (plasma and hair) between subgroups were evaluated using the Student's t-test. The  $\chi^2$ -test or Fisher's exact test were used to compare the clinical response and specific genotypes. Pearson's product moment correlation was applied to assess the relation between IM concentrations (plasma and log hair) and treatment time with IM.

Variables with non-normal distribution, as the IM hair concentration, were logarithmically transformed for analysis. P-values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were carried out using SPSS statistical software (SPSS, version 20.0).

## RESULTS

One-hundred and twenty-two Brazilian patients with chronic phase CML, with ages varying between 18 and 87 years old, were recruited for this study. Table 1 shows their main clinical and biodemographic characteristics. The majority of patients received the standard dose, 400 mg/day (79.5%), but some of them received 600 mg/day (12.3%). Two patients received different doses (300 and 500 mg/day) and for 8 patients (6.6%) the IM dosing information was not available.

The genotypes of the *CYP3A4* and *CYP3A5* polymorphisms were obtained for 104 individuals and are presented in Table 2, together with their responses to IM therapy. Genotype frequencies were compared between the 84 individuals with optimal response and the 8 patients with treatment failure. Those patients classified as “warning” (8 patients) were not considered for this comparison, due to its uncertain prognosis. There was no statistically significant difference of genotype frequencies between the two groups of clinical response to treatment.

IM plasma levels were evaluated in 83 patients. Their mean trough concentration of IM in the plasma was 1124.6 ( $\pm$  597.4) ng/mL. Of those, 40 (48.2%) subjects had concentrations lower and 43 (51.8%) higher than 1002 ng/mL. IM concentrations were measured in the hair of 68 patients, also. The mean levels of IM in the hair were 9.2 ( $\pm$  4.9) ng/mg.

We next evaluated the relation between IM daily dose and its concentrations in plasma and hair. Only individuals taking 400 and 600mg/day were considered for this analysis, due to the low number of patients taking other doses of IM (Table 1). These results are shown in Table 3. There were no significant differences in mean IM concentrations in plasma and hair between the groups that take 400 or 600 mg/day.

The possible effect of the two SNPs analyzed on IM levels was evaluated through the comparison of mean plasma and hair IM concentrations between genotypes. These were grouped in carriers and non-carriers of the risk alleles and are presented in Table 4. No statistically significant differences were

observed for both crude measurements and dose-adjusted levels between genotypes.

A correlation analysis was performed between treatment time and plasma and hair IM concentrations. Plasma IM levels were not correlated with treatment time ( $r = 0.140$ ;  $P = 0.181$ ). However, the concentration of IM in hair was significantly correlated with the duration of drug use ( $r = 0.345$ ,  $P = 0.016$ ).

## DISCUSSION

Despite the efficacy of IM, an important proportion of CML patients show inadequate response, being resistant or suboptimal responders (17). Several groups have investigated the role of factors that can influence this response, such as: biological factors, as the presence of mutations in the *BCR-ABL* site or other genetic variant, or mutations in drug transporters involved in the intracellular disposition of the drug (17, 18); clinical factors, as the disease severity (19) or poor treatment adherence (20, 21); and pharmacokinetic factors, as drug biotransformation or transportation, or drug interactions that could affect IM plasma levels (6, 22). However, the role of variants in the genome of the patients in modulating the response to IM treatment and its concentrations is far less explored.

After an oral administration, IM is absorbed at the gut lumen and it is transported through the portal circulation. When it reaches the liver, it undergoes biotransformation by the hepatic isoenzymes of the cytochrome P450 (CYPs), being mainly a substrate of CYP3A4 and CYP3A5 isoforms (5,

22, 23). CYP3A enzymatic activity is the sum activity of the family of the CYP3A genes, mainly represented by *CYP3A4* and *CYP3A5* (24). The *CYP3A4\*1B* allele is defined by the -392A>G polymorphism (rs2740574), which is located in the nifedipine-specific response element of the 5-prime promoter region of the *CYP3A4* gene (25). This nucleotide change has been shown to increase *CYP3A4* transcription *in vitro*, although some authors have suggested that some of the effects originally attributed to *CYP3A4\*1B* are actually due to *CYP3A5\*1*, because these two genes are located very close to each other, in chromosome 7q (24). 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. This way, the \*3/\*3 homozygote individuals are considered *CYP3A5* non-expressors (24). 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. However, the frequency of carriers of *CYP3A4\*1B* which presented optimal response to treatment (24.4%) was not different to the frequency among patients who presented failure (25%). A similar finding was obtained for the *CYP3A5\*1* carriers, who represented 27.4% of responders versus 37.5% of failures. Furthermore, there was no difference in mean plasma crude and dose-adjusted IM concentrations between genotypes.

Takahashi *et al*, in studies in the Japanese population, also found no significant interference of the polymorphisms studied in clinical response (13). A

similar finding was presented by Seong *et al.* in another study performed in Korea (26).

No statistical significant differences were verified in mean plasma and hair IM concentrations between individuals taking 400 mg or 600 mg of the drug per day. However, we can verify that there individuals taking 600 mg/day presented a trend to have higher plasma ( $p = 0.0832$ ) and hair ( $p = 0.1130$ ) levels of IM. These results may be due to the lower number of individuals who had their levels measured. Notwithstanding, we verified that a high proportion of patients (48.2%) presented IM through plasma concentrations under the effective dose of 1002 ng/mL (10, 27) which stresses the importance of monitoring IM plasma levels in CML patients.

Although not standardized yet, the evaluation of hair IM concentration was performed. The concentration in hair evaluated in this study was not different between genotypes. On the other hand, a significant correlation was found between IM concentration in hair and treatment time, but not in plasma. These results suggest that the IM concentration in hair could be a more reliable measurement to evaluate long term treatment efficacy.

In summary, we were not able to detect any influence of the two SNPs analyzed in IM levels or response, whereas we can accentuate the relevance of the evaluation of IM concentrations in monitoring the CML treatment. Further studies should include other gene variants that can potentially modulate these levels, once the mechanisms behind the higher interindividual variation in IM levels and response still need to be clarified.

1. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1031-7.
2. Kalaycio ME. Chronic myelogenous leukemia: the news you have and haven't heard. *Cleve Clin J Med*. 2001 Nov;68(11):913, 7, 20-1, 25-6.
3. Dobbin JA. Mesilato de Imatinibe para Tratamento da Leucemia Mieloide Crônica. *Rev Bras de Cancerologia*. 2002;48(3):429-38.
4. Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien S, Giles F, Garcia-Manero G, Faderl S, et al. Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic responses. *Blood*. 2003 Jan 1;101(1):97-100.
5. Leveque D, Maloisel F. Clinical pharmacokinetics of imatinib mesylate. *In Vivo*. 2005 Jan-Feb;19(1):77-84.
6. Markt S, Marin D, Foot N, Szydlo R, Bua M, Karadimitris A, et al. Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. *Haematologica*. 2003 Mar;88(3):260-7.
7. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):6041-51.
8. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):872-84.

9. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4022-8.
10. Bouchet S, Titier K, Moore N, Lassalle R, Ambrosino B, Poulette S, et al. Therapeutic drug monitoring of imatinib in chronic myeloid leukemia: experience from 1216 patients at a centralized laboratory. *Fundam Clin Pharmacol*. 2012 Dec;27(6):690-7.
11. Takahashi N, Wakita H, Miura M, Scott SA, Nishii K, Masuko M, et al. Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther*. 2010 Dec;88(6):809-13.
12. Fontana V. O Conceito de gene está em crise. A Farmacogenética e a farmacogenômica também? *Rev Biotemas*. 2006;19(3):87-96.
13. Takahashi N, Miura M, Scott SA, Kagaya H, Kameoka Y, Tagawa H, 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*. 2010 Nov;55(11):731-7.
14. Gurney H, Wong M, Balleine RL, Rivory LP, McLachlan AJ, Hoskins JM, et al. Imatinib disposition and ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein) genotype. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Jul;82(1):33-40.
15. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):1809-20.

16. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991 Oct 11;19(19):5444.
17. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control.* 2009 Apr;16(2):122-31.
18. Saglio G, Fava, C. Chronic myelogenous leukemia: the present and the future of the TKI therapy. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31(2):57-60.
19. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med.* 2005 Jul 14;353(2):172-87.
20. Oliveira A. Avaliação da Adesão ao Mesilato de Imatinibe de Pacientes com Leucemia Mielóide Crônica. *Rev Bras Farm Hosp Serv Saúde São Paulo.* 2013;4(3):6-12.
21. Russo D, Martinelli G, Malagola M, Skert C, Soverini S, Iacobucci I, et al. Effects and outcome of a policy of intermittent imatinib treatment in elderly patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2013 Jun 27;121(26):5138-44.
22. Takahashi N, Miura M. Therapeutic drug monitoring of imatinib for chronic myeloid leukemia patients in the chronic phase. *Pharmacology.* 2011;87(5-6):241-8.
23. de Kogel CE, Schellens JH. Imatinib. *Oncologist.* 2007 Dec;12(12):1390-4.
24. Online. Mendelian Inheritance in Man Available at: [www.omim.org](http://www.omim.org). Accessed in 12- 5 – 2014.
25. The. Pharmacogenomics Knowledgebase. Accessed in 12 – 6- 2014. Available at [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org). 2014.

26. Seong SJ, Lim M, Sohn SK, Moon JH, Oh SJ, Kim BS, et al. Influence of enzyme and transporter polymorphisms on trough imatinib concentration and clinical response in chronic myeloid leukemia patients. *Ann Oncol.* 2013 Mar;24(3):756-60.
27. Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard MA, et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2007 Apr 15;109(8):3496-9.

**Table 1** Characteristics of the 122 individuals analyzed

<b>Variables</b>	<b>Proportions or means <math>\pm</math> SD and range</b>	
Males	68 (55.7%)	
Age (years)	52.8 $\pm$ 15.9 (18.3-87.7)	
Disease duration (years)	7.1 $\pm$ 4.0 (0.66 – 15.71)	
IM time intake (months)	74.8 $\pm$ 34.1 (7 - 155)	
IM Dose (mg/day)	300	1 (0.8%)
	400	97 (79.5%)
	500	1 (0.8%)
	600	15 (12.3%)
	unknown	8 (6.6%)

---

SD, standard deviation; IM, imatinib mesylate

**Table 2** Response to imatinib according to genotype in CML patients

Genotypes	Optimal	Failure	<i>p value</i> <sup>a</sup>
<i>CYP3A4</i> *1/*1B+*1B/*1B	20 (24.4%)	2 (25%)	1.000
*1/*1	62 (75.6%)	6(75%)	
<i>CYP3A5</i> *3/*3	61 (72.6%)	5 (62.5%)	0.683
*1/*1+*1/*3	23 (27.4%)	3 (37.5%)	

<sup>a</sup> chi-squared tests. CML, chronic myeloid leukemia

**Table 3** IM trough plasma concentration according to daily IM dose

	<i>Daily dose (mg)</i>	<i>n</i>	<i>Mean concentration</i>	<i>p</i>
<i>Plasma conc. (ng/mL)</i>	400	68	1076.07±576.53	
	600	10	1117.02±494.15	0.0832
<i>Hair conc. (ng/mg)</i>	400	51	8.64±4.63	
	600	7	11.68±5.13	0.113

**Table 4** Comparison of mean crude and dose-adjusted imatinib trough concentrations in plasma and hair between *CYP3A4* and *CYP3A5* genotypes

Genotype	n	Plasma concentration (ng/mL)	<i>p</i>	n	Dose-adjusted plasma concentration (ng/mL.mg)	<i>p</i>	n	Hair concentration (ng/mg)	<i>p</i>	n	Dose-adjusted hair concentration (ng/mg <sup>2</sup> )	<i>p</i>
<i>CYP3A4</i>	*1/*1B+*1B/*1B	20	1104 ± 431	0.846	20	2.57±0.87	18	10.04 ± 5.90	0.420	18	0.023±0.013	0.525
	*1/*1	59	1130 ± 665		55	2.62±1.59		45		8.93 ± 4.44	41	
<i>CYP3A5</i>	*3/*3	61	1114 ± 617	0.788	58	2.61 ± 1.50	45	8.75 ± 4.45	0.207	42	0.021 ± 0.010	0.310
	*1/*1+*1/*3	22	1154 ± 553		21	2.57 ± 1.11		18		10.48 ± 5.79	17	

## 5. Considerações finais

A história da leucemia mielóide crônica (LMC) teve um dos sucessos mais marcantes e emocionantes da medicina moderna, tornando um câncer quase sempre fatal em uma doença controlada com medicação, proporcionando esperança para um número crescente de pacientes. A descoberta das bases moleculares da LMC e de uma classe de medicamentos, os inibidores de tirosinoquinase (ITKs), tendo como alvo a molécula que causa a transformação leucêmica de células-tronco hematopoiéticas, tem proporcionado um suporte fortemente positivo para o conceito de que o tratamento do câncer deve basear-se no conhecimento das características biológicas do câncer e sobre o desenvolvimento de agentes especificamente voltados para essas características.

Outros ITKs, além do alvo de nosso estudo, mesilato de imatinibe, têm sido utilizados e muitos estudos acerca desta classe de medicamentos têm sido conduzidos. Dados recentes já consideram a suspensão da medicação, objetivando avaliar o potencial de remissão da LMC após a retirada do tratamento.

A fim de compreender melhor o funcionamento e os interferentes na terapia com MI buscamos estudar o papel das enzimas de metabolização do MI, investigando a variabilidade genética através da presença de polimorfismos e sua relação com a resposta clínica.

Nesse estudo, não observamos associação dos dois polimorfismos analisados, *CYP3A4*\*1B (392A>G; rs2740574) e *CYP3A5*\*3 (6986A>G;

rs776746), com níveis de MI ou resposta clínica, enquanto podemos acentuar a relevância da avaliação das concentrações de MI no acompanhamento do tratamento da LMC.

Novos estudos devem incluir outras variantes genéticas que podem potencialmente modulam estes níveis, uma vez que os mecanismos por trás da variação nos níveis de MI e resposta ainda precisam ser esclarecidos. Além de continuar a investigação em torno dos genes de metabolização, vislumbramos estudos voltados para outros polimorfismos como em genes de transporte.

## **6. Anexos**

### **6.1 Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa Plataforma Brasil**

**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:** 3

**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:** 652.449

**Data da Relatoria:** 15/05/2014

**Apresentação do Projeto:**

Estudo farmacogenômico da Resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica.

**Objetivo da Pesquisa:**

Geral: avaliar a associação de polimorfismos em genes de metabolização e transpote de mesilato de imatinibe com marcadores de resposta e adesão ao tratamento com este fármaco em pacientes com leucemia mielóide crônica.

Específicos: avaliar o nível de resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe dos pacientes através de dados citogenéticos e moleculares; 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; investigar a associação entre os referidos polimorfismos e os níveis plasmáticos de imatinibe.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são mínimos. Se houver estarão associados ao desconforto do preenchimento de um questionário e da realização de uma venopunção.

Os benefícios são muitos, econômicos e cognitivos, relacionados às doses e níveis séricos da droga em estudo (imatinibe)

**Endereço:** Rua Sarmento Leite ,245

**Bairro:**

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (513)303 -8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 652.449

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Na data de 27 de abril de 2014, foi encaminhada uma emenda ao projeto supra citado, já avaliado e aprovado anteriormente (24.07.2013) por este CEP-CEUA, e pelo CEP do HCPA (09.09.2013), visando atender algumas solicitações feitas pelo CEP do Hospital Conceição. Foram anexados alguns documentos solicitados pelo referido CEP: 1 anuência do superior ao autor da pesquisa; 2 - termo de entrega do relatório; 3- lista dos integrantes do projeto, indicando o contrato dentro do GHC (Renata Leite). Em anexo, carta explicativa ao CEP-GHC contemplando as questões solicitadas pelo mesmo. Ao mesmo tempo, a pesquisadora responsável solicita a este CEP-CEUA a inclusão de mais uma autora no projeto, a saber, a acadêmica do curso de Biomedicina Noturno Fabíola Reginato, bolsista de iniciação científica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram anexados um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) reformulado e uma nova versão do projeto de pesquisa original.

**Recomendações:**

Tendo em vista que as solicitações e recomendações feitas pelo CEP-HCPA e CEP-GHC foram contempladas, recomenda-se a aprovação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto está adequado às exigências formais do CEP-CEUA.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

De acordo com o Parecer do Relator.

**Endereço:** Rua Sarmiento Leite ,245

**Bairro:**

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (513)303 -8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 652.449

PORTO ALEGRE, 19 de Maio de 2014

---

**Assinado por:**  
**José Geraldo Vernet Taborda**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Sarmiento Leite ,245

**Bairro:**

**CEP:** 90.050-170

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (513)303 -8804

**E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

## 6.2 Anexo 2 – Normas da Revista Científica



International Journal of Clinical  
Oncology

Editor-in-Chief: Osamu **Ogawa**

ISSN: 1341-9625 (print version)

ISSN: 1437-7772 (electronic version)

### Instructions for Authors

(Revised: October 30, 2014)

#### Manuscript submission

#### *Legal requirements:*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### *Prerequisites for publication:*

A copy of the certification form included in each issue must be submitted to the journal's editorial office at the same time you submit your manuscripts via Editorial Manager.

IMPORTANT: Upon receipt of a Certificate of Exclusive Submission, manuscripts are officially recognized as submissions.

- <http://www.editorialmanager.com/ijco>

*Permissions:*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

*Online submission:*

Authors should submit their manuscripts to the International Journal of Clinical Oncology online. No manuscripts will be accepted by mail or fax. Please log in directly at: <http://www.editorialmanager.com/ijco> and upload your manuscript following the instructions given.

**Potential conflict of interest**

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. They should also state that they have full control of all primary data and that they agree to allow the journal to review their data if requested.

Therefore the manuscript must be accompanied by the "Conflict of Interest Disclosure Statement". This form can be obtained from <http://www.springer.com/10147>.

## Manuscript preparation

### *Types of articles:*

Articles may be in the form of original articles, letters to the editor, review articles, and editorials.

- Original articles should not exceed 3000 words, not including the abstract, references, tables, and figure captions. The text should be arranged in accordance with the format described below in “Text”. Acceptance of an original article is based primarily on the originality of the work and its potential clinical influence. For reports of randomized controlled trials, authors should refer to the CONSORT statement of guidelines (<http://www.consort-statement.org>). For studies of the diagnostic accuracy of tests, authors are encouraged to refer to the STARD statement (<http://www.stard-statement.org/>).
- Letters to the editor may offer criticism of published material. They must be objective, constructive, and educational, and should not exceed 500 words, not including references, tables, and figure captions.
- Review articles provide an overview of the state of the art in an area or an update in areas of current interest in clinical oncology. Review articles are solicited by the editors.
- Editorials may be published as viewpoints of the editor(s) of the journal on current, relevant topics.

### *Manuscript form:*

The abstract, text, references, tables, and figure captions must be typed double-space with wide margins. Incomplete or improperly prepared manuscripts will

be returned to the authors without review. A separate cover page should be provided. The abstract, text, acknowledgments, references, tables, captions, and figures should begin on separate sheets and follow in that order. Standard abbreviations and units should be used. Abbreviations should be defined at first appearance, and their use in the title and abstract should be avoided. Generic names of drugs and chemicals should be used.

All manuscripts must be written in English. Authors who are not fluent in English must seek the assistance of a colleague who is a native English speaker and is familiar with the field of the work.

*Cover page:*

The cover page should contain the title, the full names of the authors, and the street address of the authors' academic affiliations. Please supply a fax number, telephone number, and e-mail address for the proofs.

*Abstract:*

The abstract should be comprehensible without reference to the text, and the use of abbreviations should be avoided whenever possible. The abstract should not exceed 250 words and should be arranged under the following subheadings for original articles: (1) Background (the problem being addressed and the purpose of the study); (2) Methods (study design/methods and materials); (3) Results (research findings), and (4) Conclusion(s) (summary of the main findings obtained and the conclusions drawn).

*Key words:*

3-6 key words should be listed below the abstract.

*Text:*

The text should be arranged as follows: (1) Introduction; (2) Patients and methods, or Materials and methods; (3) Results; (4) Discussion; (5) Acknowledgment(s). The sections should describe: (1) the problem being addressed and the purpose of the study with reference to previous findings; (2) materials and methods used in the study in concise yet sufficient detail to allow the study to be replicated; (3) main findings obtained; (4) conclusions drawn from the findings and implications for further research and clinical application, with a review of relevant published literature and other evidence.

*Text formatting:*

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Save your file in doc format. Do not submit docx files.

*Footnotes:*

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be

indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

## References

### Citation:

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. The entries in the list should be numbered consecutively. Give the names of the first three authors only, followed by “et al” if there are other coauthors.

#### Journal article

1. Smith J, Jones M Jr, Houghton L, et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
2. Inoue T, Sue K, Nakano K, et al. (1991) A case report of long survival in a 17-year-old girl with gastric carcinoma treated by immunochemo-endocrine therapy (in Japanese). *Shinyaku to Rinsho (New Med)* 40:117–121

#### Article by DOI

3. Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). doi: 10.1007/s001090000086

#### Book

4. South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

#### Book chapter

5. Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp230-257

#### Online document

6. Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed Jan 1999

#### Dissertation

7. Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN

List of Title Word Abbreviations, see <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>

- [EndNote style file \(zip, 17 kB\)](#)

#### Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## Figures

### *Electronic Figure Submission:*

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### *Line art:*

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files

### *Halftone art:*

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### *Combination art:*

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### *Color art:*

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### *Figure lettering:*

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions into your illustrations.

*Figure numbering:*

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in the text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). If illustrations are supplied with uppercase labeling, lowercase letters will still be used in the figure legends and citations.
- If an appendix appears in your article/chapter and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic supplementary Material) should, however, be numbered separately.

*Figure captions:*

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

*Figure placement and size:*

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- Figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

The publisher reserves the right to reduce or enlarge figures.

*Permissions:*

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

**After acceptance**

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs. You will also receive a separate e-mail for ordering offprints and printing of figures in color.

*Copyright transfer:*

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Japan Society of Clinical Oncology. This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

*Offprints:*

Offprints can be ordered by the corresponding author.

*Color illustrations:*

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs. (152 000 JPY per article). Otherwise the figures will be printed in black and white. Please note that, in such cases, it is authors' responsibility to prepare figures to be illustrative enough to convey the necessary information even after they are converted into black and white.

*Proof reading:*

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.