



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Ana Carolina Rabello de Moraes

**Importância da Investigação de Proteínas de Resistência ABCB1,
ABCC1 e LRP e da Proteína Antiapoptótica Bcl-2 no Diagnóstico e
no Prognóstico de Leucemias Agudas.**

Florianópolis - SC, abril de 2010

Ana Carolina Rabello de Moraes

Importância da Investigação de Proteínas de Resistência ABCB1, ABCC1 e LRP e da Proteína Antiapoptótica Bcl-2 no Diagnóstico e no Prognóstico de Leucemias Agudas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia na Área de Concentração de Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

M827i Moraes, Ana Carolina Rabello de
Importância da investigação de proteínas de resistência
ABCB1, ABCC1 e LRP e da proteína antiapoptótica Bcl-2 no
diagnóstico e no prognóstico de leucemias agudas
[dissertação] / Ana Carolina Rabello de Moraes ;
orientadora, Maria Cláudia Santos da Silva. -
Florianópolis, SC, 2010.
175 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Resistência a múltiplas drogas. 3.
Leucemia aguda. 4. Proteínas de resistência. 5. Proteínas
antiapoptóticas. I. Silva, Maria Cláudia Santos da. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

Ana Carolina Rabello de Moraes

Importância da Investigação de Proteínas de Resistência ABCB1, ABCC1 e LRP e da Proteína Antiapoptótica Bcl-2 no Diagnóstico e no Prognóstico de Leucemias Agudas.

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação pela Banca Examinadora para a obtenção do Título de:

Mestre em Farmácia

E aprovada na sua versão final em 09 de abril de 2010, atendendo às normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração de Análises Clínicas.

Banca Examinadora:

Dra. Daniela Ferraz Pereira Leite (Triplix Farm – Membro Titular)

Prof^a. Dra. Cidônia de Lourdes Vituri (UFSC – Membro Titular)

Prof^a. Dra. Rosemeri Maurici da Silva (UFSC – Membro Titular)

Prof^a. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC – Orientadora)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 09 abril de 2010

AGRADECIMENTOS

À minha família. Aos meus pais, Josué e Maria Cristina, os melhores amigos e mestres que a vida me deu. O que sinto por vocês não tem palavras que expressem. Aos meus irmãos, Frederico e Liege; Cristiano e Flávia, por seu amor incondicional, conselhos e eterna fé em mim, sempre serei grata. À minha Vó Zuza (*in memoriam*) e meus avós, Rubens (*in memoriam*) e Maria Isabel (*in memoriam*), que nunca conheci, mas que sempre amei, tenho certeza de seu orgulho. Aos irmãos que adquiri pela vida, Leonardo e Christiane, e Hederson (*in memoriam*), pela amizade, proteção e carinho que sempre me deram.

Às minhas maravilhosas orientadora e co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia e Prof.^a Dr.^a Maria Luiza, pela amizade, atenção, dedicação e preocupação durante todo esse tempo. Minha amizade e gratidão por vocês jamais esvanecerá.

Ao pessoal do laboratório, Aline C, Chris, Haíra, Juliana, Karina, Letícia, Manoela, Mariana, Michelle, Pâmela, Toni e em especial a Susie e a Marley, por seu companheirismo, amizade, cumplicidade e ajuda. O mundo precisa de pessoas como vocês.

À Prof.^a Dr.^a Teresinha que me orientou em meus primeiros passos acadêmicos, demonstrou-me caminhos à frente e sempre me dedicou amizade e apoio. Minha amizade e respeito por você serão eternos.

Às minhas grandes amigas, as Demáceas e Hialinas, pelos anos de companheirismo, lealdade e amizade. A nossa afinidade é algo que não tem explicação.

À Prof.^a Dr.^a Joanita Ângela Gonzaga Del Moral pelo auxílio e disposição.

Ao Prof.^o Dr. Marcos José Machado pela ajuda na estatística e pelas longas conversas e conselhos.

Ao Prof.^o Dr. Mário Steindel do Laboratório de Protozoologia por disponibilizar o uso do equipamento BioPhotometer.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC, aos médicos do HU/UFSC e do HIJG, e ao Júlio A. Zampirolo pelo encaminhamento das amostras e pela estrutura necessária à realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina que ofereceu condições para mais uma etapa da minha formação.

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo suporte financeiro.

E enfim, para todos que de um jeito ou de outro se sentem responsáveis pela execução deste trabalho.

***“Compartilhe o seu conhecimento.
Eis uma maneira de alcançar a imortalidade.”***

Dalai Lama

RESUMO

A resistência a múltiplas drogas é uma das maiores causas para a falha do tratamento das leucemias agudas (LA). A resistência adquirida ou intrínseca a múltiplas drogas (MDR) depende de muitas variáveis biológicas e é principalmente caracterizada pela resistência cruzada a uma ampla variedade de fármacos não relacionados estrutural e funcionalmente. Vários mecanismos podem estar envolvidos no fenômeno MDR, como o mecanismo de efluxo de drogas através da membrana plasmática e as alterações nos mecanismos que regulam a morte celular por apoptose. Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar o perfil de expressão das proteínas relacionadas à resistência a múltiplas drogas (ABCB1, ABCC1 e LRP) e à apoptose (Bcl-2) em células blásticas de pacientes com leucemia aguda (LA), ao diagnóstico, atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) e pelo Serviço de Oncologia do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HI-Florianópolis) no período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2009. Para tanto, as células blásticas dos adultos e crianças com LA foram separadas por gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque e a expressão dos genes e das proteínas de resistência foram avaliadas por RT-PCR semiquantitativo e citometria de fluxo, respectivamente. A média da expressão relativa de todas as amostras foi utilizada como ponto de corte para superexpressão. Tanto os pacientes adultos quanto as crianças apresentam uma ampla variedade de expressão para as proteínas estudadas. Os pacientes adultos com LA apresentaram correlação significativa entre a expressão dos genes *abcb1* e *lrp* e a expressão das proteínas ABCB1 e ABCC1, ABCB1 e Bcl-2, e ABCC1 e Bcl-2 e nos pacientes pediátricos com LA não houve correlação significativa entre os níveis de expressão de dos genes e proteínas estudados. Nos pacientes adultos com LA, houve correlação positiva entre a expressão do gene *abcb1* e a idade dos pacientes, e a concentração de LDH, enquanto nos pacientes pediátricos com LA, houve correlação positiva entre a expressão do gene *abcc1* e a expressão de CD34, entre a expressão da proteína LRP e a idade, e entre a expressão da proteína ABCB1 e a leucometria ao diagnóstico. Esses resultados sugerem que a análise da expressão gênica de *abcb1* está mais relacionada com um pior prognóstico nos pacientes adultos com LA, enquanto que nos pacientes com LA infantil, é a expressão conjunta das proteínas ABCB1, ABCC1 e LRP que parece estar relacionada com um pior prognóstico. Além disso, os resultados também indicam que a

determinação do perfil de expressão da ABCB1, ABCC1 e LRP pelo método do RT-PCR semiquantitativo é mais significativa nos casos de LA em adultos e a determinação do perfil de expressão dessas proteínas por citometria de fluxo é mais significativa nas LAs em crianças.

Palavras-chave: Resistência a múltiplas drogas. Leucemia Aguda. Proteínas de resistência. Proteínas antiapoptóticas.

ABSTRACT

Multidrug resistance (MDR) is one of the greatest causes of acute leukemia (AL) treatment failure. Acquired or intrinsic MDR depends on numerous biological variables and is mainly characterized by a cross resistance to a wide variety of drugs that are structurally and functionally unrelated. Many mechanisms may be involved in MDR phenomenon, such as drug efflux across the plasmatic membrane and changes in mechanisms that regulate cell death by apoptosis. Therefore, the aim of the present study was to analyze the expression profile of multidrug resistance proteins (ABCB1, ABCC1, and LRP) and of proteins related to apoptosis (Bcl-2) in blast cells from patients with AL at diagnosis from the Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) and from the Serviço de Oncologia do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HI-Florianópolis) between January 2008 and December 2009. In order to achieve this, blast cells from adult and pediatric AL patients were separated by density gradient with Ficoll-Hypaque, while genes and protein expression were evaluated by semi-quantitative RT-PCR and flow cytometry, respectively. The mean value of relative expression for all samples was used as cutoff for superexpression. Both adult and pediatric patients showed highly variable expression of the proteins in question. Adult patients with AL presented a significant correlation between *abcb1* and *lrp* gene expression, between the expression of ABCB1 and ABCC1, ABCB1 and Bcl-2, and ABCC1 and Bcl-2 proteins, while pediatric patients with AL showed no significant correlations between multidrug resistance genes and protein expression. Adult patients presented a significant correlation between *abcb1* gene expression and patient age, and LDH levels, while pediatric patients with AL presented a positive correlation between *abcc1* gene expression and CD34 expression, between LRP protein expression and age, and between ABCB1 protein expression and white blood cell count upon diagnosis. These results suggest that the expression of the *abcb1* gene is more closely related to a worse prognosis in adult patients with AL, while in children with AL the combined expression of ABCB1, ABCC1, and LRP proteins appears to be related to a worse prognosis. Moreover, the results also indicate that the determination of ABCB1, ABCC1, and LRP expression profile by semi-quantitative RT-PCR is more significant for adult AL cases and the determination of the expression profile for these proteins by flow cytometry is more significant in pediatric AL

cases.

Keywords: Multidrug Resistance, Acute Leukemia, Prote resistance, Antiapoptotic proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Géis de integridade de RNA total para a padronização da extração de RNA total.....	66
Figura 2	Géis de integridade de RNA total para a padronização do número de células blásticas.....	67
Figura 3	Gel apresentando a padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	71
Figura 4	Representações gráficas dos resultados de intensidade média das bandas em função da variação do número de ciclos.....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sítios de ação dos agentes citotóxicos.....	43
Quadro 2	Estrutura da Glicoproteína-P (ABCB1/Pgp/MDR1)..	46
Quadro 3	Estrutura da Proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1 (ABCC1/MRP1).....	50
Quadro 4	Possíveis mecanismos de interação entre ABCC1 e GSH.....	52
Quadro 5	Mecanismos de ação propostos para as MVPs.....	55
Quadro 6	Vias da apoptose: intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (receptores de morte).....	56
Quadro 7	Proteína Bcl-2.....	60

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Revisão da Literatura

Tabela 1	Extratificação de Risco para as Leucemias Mielóides Agudas e Leucemias Linfóides Agudas Baseada na Citogenética.....	40
Tabela 2	Lista de Fármacos que são Extruídos pela ABCB1....	48

Capítulo 2: Padronização da Transcrição Reversa – Reação Em Cadeia Da Polimerase Semiquantitativa (RT-PCR Semiquantitativa)

Tabela 3	Sequência dos Oligonucleotídeos Iniciadores ou <i>Primers</i>	69
-----------------	---	----

Capítulo 3: Perfil De Expressão Das Proteínas De Resistência A Múltiplas Drogas Em Pacientes Recém Diagnosticados Com Leucemia Aguda

Publicação: *Importance of abcb1 gene expression in Newly Diagnosed Adult Acute Leukemia*

Table 1	Mean \pm Standard Deviation (SD) and Range of Relative Expression Values for the Different Drug Resistance Proteins Evaluated by Semi-Quantitative RT-PCR and Flow Cytometry in Acute Leukemias.....	86
Table 2	Level of Significance for the Expression of the Different Drug Resistance Genes and Proteins and Clinical Features of Acute Leukemia.....	87

Publicação: *Expression of Resistance Proteins in Newly Diagnosed Childhood Acute Leukemia*

Table I	Mean \pm Standard Deviation (SD) and Range of the Relative Expression Values of the Different Drug Resistance Proteins and Genes Evaluated by Semi-Quantitative RT-PCR and Flow Cytometry in Acute Leukemias.....	104
Table II	Significance Level for the Expression of the Different Drug Resistance Genes and Proteins and Clinical Features of Acute Leukemia.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB1	Glicoproteína-P/Pgp/MDR1
ABCC1	Proteína Associada à Resistência a Múltiplos Fármacos 1/MRP1
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica
cDNA	DNA complementar
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DTT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
FAB	French-American-British Cooperative Group
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSH	Glutathiona oxidada
LA	Leucemia aguda
LDH	Lactato desidrogenase
LLA	Leucemias linfóides agudas
LMA	Leucemias mielóides agudas
LRP	Proteína Associada à Resistência Pulmonar
MDR	Resistência a múltiplas drogas
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MVP	<i>Human major vault proteins</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	27
OBJETIVOS.....	31
Objetivo geral.....	33
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>33</i>
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA.....	35
1.1 Leucemias Agudas.....	37
1.2 Bombas de Efluxo de Drogas.....	44
<i>1.2.1 Glicoproteína-P (ABCB1/Pgp/MDR1).....</i>	<i>46</i>
<i>1.2.2 Proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1 (ABCC1/MRP1).....</i>	<i>49</i>
<i>1.2.3 Proteína associada à resistência pulmonar (LRP).....</i>	<i>53</i>
1.3 Mecanismos de regulação da morte celular por apoptose...	56
CAPÍTULO 2: PADRONIZAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO REVERSA – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE SEMIQUANTITATIVA (RT-PCR SEMIQUANTITATIVA).....	61
2.1 Cultura de células.....	63
2.2 Obtenção das células leucêmicas de pacientes.....	63
2.3 Padronização da extração do RNA total.....	64
2.4 Padronização do número de células blásticas de pacientes..	66
2.5 Síntese de cDNA complementar (primeira fita).....	67
2.6 Quantificação de cDNA.....	68
2.7 Padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR)....	69
2.8 Padronização do número de ciclos.....	71
CAPÍTULO 3: PERFIL DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS EM PACIENTES RECÉM DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA AGUDA.....	73

Publicação: <i>Importance of abcb1 gene expression in Newly Diagnosed Adult Acute Leukemia</i>	77
Publicação: <i>Expression of Resistance Proteins in Newly Diagnosed Childhood Acute Leukemia</i>	95
CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO GERAL	113
CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO	121
REFERÊNCIAS	125
ANEXOS	153
Anexo 1: <i>Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos – CEPESH/UFSC</i>	155
Anexo 2: <i>Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Joana de Gusmão – CESH/HIJG</i>	159
Anexo 3: <i>Síndromes Mielodisplásicas: Aspectos Moleculares, Laboratoriais e a Classificação OMS 2008</i>	165

INTRODUÇÃO GERAL

A modulação da homeostase nos organismos multicelulares requer a combinação de diferentes sistemas regulatórios altamente eficientes para controlar os mais diversos processos fisiológicos, incluindo proliferação e diferenciação celular. A existência de processos de controle e sinalização é fundamental para manter a identidade e integridade do organismo. Quando esses mecanismos de controle são subvertidos, ocorrem processos degenerativos e, dentre eles, o mais conhecido exemplo é o câncer (LODISH et al., 2000; WEINBERG, 2000).

Atualmente, mais de 12 milhões de pessoas por ano são diagnosticadas com câncer. Ele é a maior causa de morte no mundo, sendo responsável pela morte de 7,9 milhões de pessoas por ano, o que é, aproximadamente, 13% dos óbitos no mundo. Estima-se que em 2030 o câncer será responsável pela morte de 12 milhões de pessoas (WHO, 2010). Em 2007, o Sistema de Informações sobre Mortalidade notificou que desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida no Brasil. Em 2010, são esperados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. As estimativas para o ano de 2010, que serão válidas também para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Dentre os casos de câncer diagnosticados, as leucemias encontram-se entre os dez tipos mais freqüentes, somente superadas pelos cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino. As estimativas para 2010 são de 9.580 novos casos de leucemia no Brasil, com 360 novos casos no estado de Santa Catarina (INCA, 2007).

Os custos financeiros para o diagnóstico e o tratamento das neoplasias são exorbitantes, e, considerando que no Brasil, cerca de 80% do sistema de saúde, inclusive a assistência oncológica, é financiado por recursos públicos, o câncer consolida-se como um importante problema de saúde pública (KLIGERMAN, 2002). Sendo assim, o aumento da eficácia dos tratamentos com o uso de protocolos terapêuticos individualizados e específicos pode resultar na diminuição do tempo de internação hospitalar, diminuição de custos para o SUS e melhora na qualidade de vida desses pacientes.

O tratamento das leucemias envolve radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, transplante de medula óssea ou uma combinação dessas (GOL B et al., 2001; BRAUNWALD et al., 2002). A aplicação das atuais técnicas de tratamento permite a remissão completa de mais de

50% dos pacientes com câncer diagnosticado (BRAUNWALD et al., 2002). No entanto, a grande maioria dos pacientes recidivam e morrem dois anos após atingirem a remissão (SHIPLEY e BUTERA, 2009). O transplante de medula óssea é considerado uma importante ferramenta terapêutica para a remissão completa das leucemias, mas apresenta restrições clínicas e sócio-econômicas para o paciente. Sendo assim, a quimioterapia ainda é a terapia antileucêmica de escolha, devido ao seu fácil acesso (GOL B et al., 2001; LUQMANI, 2005). Em vários casos, a leucemia pode ser refratário ao tratamento, resultando numa perda de resposta aos fármacos citotóxicos ou em uma conseqüente recidiva. A resistência ao tratamento pode ser explicada por duas prováveis causas: i) as células tumorais podem ser inerentemente resistentes, possivelmente devido a algumas características genéticas; ou ii) elas podem adquirir uma resistência devido à exposição aos fármacos (LUQMANI, 2005).

A resistência à quimioterapia frequentemente resulta da superexpressão de uma classe de proteínas transportadoras de membrana, conhecidas como ABC-transportadoras (bombas de efluxo de drogas dependentes de ATP), as quais levam à diminuição da concentração intracelular de fármacos e ocasionam o fenômeno denominado de resistência a múltiplas drogas (MDR) (BORST et al., 2000; JORDAN e WILSON, 2004). Além dessas proteínas, outros mecanismos podem estar envolvidos na MDR, como a alteração na regulação da apoptose com o envolvimento das proteínas da família Bcl-2 e p53; a superexpressão de gama-glutamyltranspeptidase (γ -GT) e o aumento dos níveis de glutathione reduzida (GSH) (KRISHNA e MAYER, 2000).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar o perfil de expressão das proteínas relacionadas à resistência a múltiplas drogas (ABCB1, ABCC1 e LRP) e à apoptose (Bcl-2) em células blásticas de pacientes com leucemia aguda (LA), antes da primeira terapia, atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) e pelo Serviço de Oncologia do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG-Florianópolis) no período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2009.

Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de extração de RNA total;
- Padronizar a técnica de Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) semi-quantitativa;
- Investigar, por RT-PCR semi-quantitativa, o perfil de expressão dos genes de resistência a múltiplos fármacos *abcb1*, *abcc1* e *lrp* nos blastos leucêmicos dos pacientes com LA, antes da primeira terapia, atendidos no HU-UFSC e no HIJG-Florianópolis;
- Investigar, por citometria de fluxo, o perfil de expressão das proteínas de resistência a múltiplos fármacos ABCB1, ABCC1 e LRP e da proteína anti-apoptótica Bcl-2 nos blastos leucêmicos dos pacientes com LA, antes da primeira terapia, atendidos no HU-UFSC e no HIJG-Florianópolis;
- Correlacionar os níveis de expressão dos genes (*abcb1*, *abcc1* e *lrp*) e das proteínas (ABCB1, ABCC1, LRP e Bcl-2) de resistência à quimioterapia com os fatores prognósticos, como a idade, a leucometria, o imunofenótipo, a porcentagem de blastos CD34+, a expressão de CD34, a concentração de lactato desidrogenase (LDH) e o *status* vital em pacientes com LA, antes da primeira terapia, atendidos no HU-UFSC e no HIJG-Florianópolis.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Leucemias Agudas

As leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfóides, que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos (SWERDLOW et al., 2008).

O clone leucêmico origina-se a partir de uma mutação somática em uma célula primordial (*stem cell*). A tumorigênese é um processo de múltiplos passos, em que cada passo reflete uma alteração genética sofrida pela célula. Cada mudança genética sucessiva confere à célula um ou outro tipo de vantagem de proliferação em relação às células normais, o que permite o desconhecimento dos circuitos regulatórios da proliferação celular normal e homeostasia. Com isso, ocorre a conversão progressiva de uma célula normal em uma célula neoplásica (HANAHAH e WEINBERG, 2000; BRAUNWALD et al., 2002). Acredita-se que os diversos genótipos das células neoplásicas representam a manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia celular que coletivamente ditam a proliferação maligna. Esses fatores são: i) auto-suficiência dos sinais de crescimento; ii) insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento; iii) evasão da morte celular programada (apoptose); iv) potencial de replicação ilimitado; v) angiogênese sustentada; e vi) invasão de tecidos e metástase (HANAHAH e WEINBERG, 2000).

A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfóides ou mielóides, o que a caracteriza como uma doença heterogênea, sob o aspecto biológico e morfológico (PUI e EVANS, 1998; BAIN, 2003). Dessa forma, as leucemias podem ser divididas em linfóides e mielóides; em agudas e crônicas (BAIN, 2003). Nas leucemias agudas há predomínio de células imaturas ou blásticas, denominadas de linfoblastos e mieloblastos. Esses blastos são incapazes de se diferenciar em células maduras, devido a um bloqueio de maturação, o que consiste no marco fisiopatológico das leucemias agudas (LAs) (WANG e CHEN, 2000; BENE et al., 2001).

O diagnóstico das LAs é dado pela avaliação conjunta das características clínicas e laboratoriais apresentadas pelo indivíduo no momento do diagnóstico (KEBRIAEL, ANASTASI e LARSON, 2003). As manifestações clínicas são bastante variáveis e a sintomatologia geralmente está associada aos órgãos envolvidos (PUI e EVANS, 1998;

BAIN, 2003; ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2005). A proliferação acelerada de células leucêmicas e a infiltração da medula óssea resultam na inibição da produção das células hematopoiéticas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Em decorrência da não funcionalidade das células leucêmicas, os indivíduos com diagnóstico de LA freqüentemente apresentam sintomas como: fadiga, astenia e palidez, em virtude da anemia; sangramento gengival e outras manifestações hemorrágicas, resultantes da plaquetopenia; e febre, devido a complicações infecciosas associadas à neutropenia ou à liberação de citocinas secretadas pelas células leucêmicas (BAIN, 2003; BASSAN et al., 2004; GUIMARÃES, 2004). Nesses pacientes, pode-se observar linfadenopatia generalizada, esplenomegalia e hepatomegalia, devido à infiltração das células leucêmicas nos diferentes tecidos do organismo (PEJOVIC e SCHWARTZ, 2002).

O diagnóstico laboratorial das LAs inicia-se com a observação de 20% ou mais de blastos neoplásicos no exame morfológico de esfregaços de sangue periférico e/ou medula óssea (PEJOVIC e SCHWARTZ, 2002; BAIN, 2003). O fato de a leucemia ser uma doença genética faz com que a identificação das alterações nas células blásticas seja imprescindível para a escolha do tratamento mais adequado. Neste sentido, houve a necessidade de agrupar casos biologicamente semelhantes, para uma melhor compreensão do processo de transformação leucêmica, prognóstico e conduta terapêutica. No entanto, a diferenciação entre linfoblastos e mieloblastos pela microscopia óptica é difícil e pouco precisa e portanto não é recomendada. Por isso, após a detecção de blastos no esfregaço, outras análises laboratoriais, como análise citoquímica, citogenética e imunofenotípica, são necessárias para a exata classificação, diferenciação e caracterização da célula neoplásica encontrada (SWERDLOW et al., 2008).

Durante muitos anos, a classificação para leucemias proposta pelo grupo FAB (French-American-British Cooperative Group), em 1976 (BENNETT et al., 1976) e modificada em 1982 e 1991 (BENNETT et al., 1982; BENNETT et al., 1991), foi utilizada. Nessa classificação, baseada no aspecto morfológico e nas características citoquímicas dos blastos leucêmicos, as leucemias mielóides agudas (LMAs) foram divididas em oito subtipos (M0 a M7) e as leucemias linfóides agudas (LLAs), em três subtipos (L1 a L3). Com a finalidade de superar as limitações da classificação FAB, em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS), publicou uma nova classificação para as neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide, levando em

consideração não só as características morfológicas e citoquímicas, mas também as imunofenóticas e genético-moleculares dos blastos (JAFFE et al., 2001). Em 2008, a OMS em conjunto com a Sociedade de Hematologia Americana e a Associação Européia de Hematologia publicou uma nova classificação para neoplasias do sistema hematopoético e linfóide. Nessa classificação, foram criadas sete subcategorias para a LMA, como segue: LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes, LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia, neoplasias mielóides associadas ao tratamento, LMA não categorizada nos itens anteriores, sarcoma mielóide, proliferação mielóide relacionada com síndrome de Down e neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitóides. As LLAs foram subdivididas em três subgrupos: Leucemia/linfoma linfoblástica B com anormalidades genéticas recorrentes, Leucemia/linfoma linfoblástica B não categorizada nos itens anteriores e Leucemia/linfoma linfoblástica T (SWERDLOW et al., 2008).

Por constituírem um grupo heterogêneo de doenças, as LMAs e as LLAs diferem, não só, quanto à etiologia e patogênese, mas também, quanto ao prognóstico e resposta ao tratamento (PUI e EVANS, 1998; BAIN, 2003). Os índices de remissão e sobrevida livre dessas doenças dependem de vários fatores, incluindo a idade dos pacientes, alterações citogenéticas, outras alterações moleculares relacionadas ao clone leucêmico, desordens prévias na medula óssea e comorbidades associadas (BASSAN et al., 2004; SWERDLOW et al., 2008; SHIPLEY e BUTERA, 2009).

O prognóstico do paciente e a genética estão amplamente relacionadas nas LAs e estratificações de risco baseadas em alterações citogenéticas são realizadas para a classificação dos pacientes em três grandes grupos: risco favorável, intermediário e desfavorável (Tabela 1). Além das alterações citogenéticas básicas, novos marcadores moleculares vêm ajudando no refinamento dos grupos prognósticos. Dentre esses marcadores, incluem-se mutações no gene FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*), c-KIT e NPM1 (*nucleophosmin member 1*) (FROHLING et al., 2002; BIENZ et al., 2005; VERHAAK et al., 2005; CAIROLI et al., 2006; PASCHKA et al., 2006; SCHNITTGER et al., 2006; FALINI et al., 2007). Os dois marcadores moleculares mais comuns são a duplicação interna de *tandem* do gene FLT3 (FLT3-ITD) e as mutações no gene NPM1. Ambas as mutações podem ser encontradas isoladamente ou em conjunto em pacientes com cariótipo normal. Isoladamente, a mutação no gene NPM1 confere uma melhora na

sobrevida de pacientes com cariótipo normal, tornando-a similar a sobrevida dos pacientes com alterações citogenéticas favoráveis (VERHAAK et al., 2005; FALINI et al., 2007). Mutações do tipo FLT3-ITD são preditores independentes de sobrevida livre de recidiva, uma vez que pacientes com essa alteração genética apresentam maiores chances de recaída em cinco anos (FROHLING et al., 2002; BIENZ et al., 2005). Os riscos de recidiva também podem ser significativamente maior em indivíduos com cariótipo favorável que apresentam alterações em c-KIT (CAIROLI et al., 2006; PASCHKA et al., 2006; SCHNITTGER et al., 2006).

Tabela 1. Extratificação de Risco para as Leucemias Mielóides Agudas e Leucemias Linfóides Agudas Baseada na Citogenética

	Risco Favorável	Risco Intermediário	Risco Desfavorável
	t(15;17)(q22;q12-21)	Cariótipo normal	Cariótipo complexo
	t(8;21)(q22;q22)	t(9;11)(p22;q23)	inv(3)(q21q26)/t(3;3)
	inv(16)(p13q22)/	del(7q)	(q21;q26)
	t(16;16)(p13;q22)	del(9q)	t(6;9)(p23;q34)
L		del(11q)	t(6;11)(q27;q23)
M		del(20q)	t(11;19)(q23;p13.1)
A		-Y	del(5q)
		+8	-5
		+11	-7
		+13	
		+21	
	del(12p)	Cariótipo normal	t(9;22)
	t(12p)	Outras alterações	t(4;11)
L	Alta hiperploidia	não	-7
L	t(10;14)	favoráveis/desfavor	+8
A	t(14q11-q13)	áveis	Anormalidades (11q23) Hipoploidia

LMA – Leucemia Mielóide Aguda; LLA – Leucemia Linfóide Aguda; del – Deleção; t – Translocação; inv – Inversão.

Adaptado de: BASSAN et al., 2004; SHIPLEY e BUTERA, 2009.

As alterações citogenéticas também apresentam uma grande relação com a idade do paciente, uma vez que a ocorrência de anormalidades citogenéticas aumenta com o avanço da idade. Dessa forma, dentro de cada grupo de risco citogenético, o prognóstico piora com o aumento da idade. De forma geral, são considerados de pior prognóstico, pacientes com diagnóstico de LMA maiores de 60 anos e com diagnóstico de LLA maiores de 50 anos (BASSAN et al., 2004; SHIPLEY e BUTERA, 2009). No entanto, sabe-se que a idade influencia na sobrevida na forma de uma variável contínua e, portanto, independente do ponto de corte, considera-se que quanto mais idoso o paciente, pior o prognóstico (BACCARANI et al., 1982; TAYLOR et al., 1992; PERENTESIS, 1997; CHESSELLS et al., 1998; STILLER et al., 1999; LEVI et al., 2000).

Outro fator prognóstico de importância clínica é a leucometria ao diagnóstico (SWERDLOW et al., 2008). O uso da leucometria ao invés da contagem absoluta de blastos baseia-se no fato de que a discriminação morfológica entre os verdadeiros blastos leucêmicos e as células mononucleares atípicas não leucêmicas é muito difícil, o que implica numa alta probabilidade de um erro na contagem de blastos. Portanto, uma alta leucometria no momento do diagnóstico é considerado um fator prognóstico desfavorável, uma vez que essa reflete uma elevada massa tumoral (BASSAN et al., 2004). Dessa forma, são considerados de pior prognóstico, leucometrias superiores a $10.000/\text{mm}^3$ em indivíduos com LMA e superiores a $20.000/\text{mm}^3$ em indivíduos com LLA (BASSAN et al., 2004; SHIPLEY e BUTERA, 2009). Assim como a idade, os pontos de corte para a leucometria não estão firmemente definidos e considera-se quanto maior o número de leucócitos ao diagnóstico, pior o prognóstico do paciente (BASSAN et al., 2004).

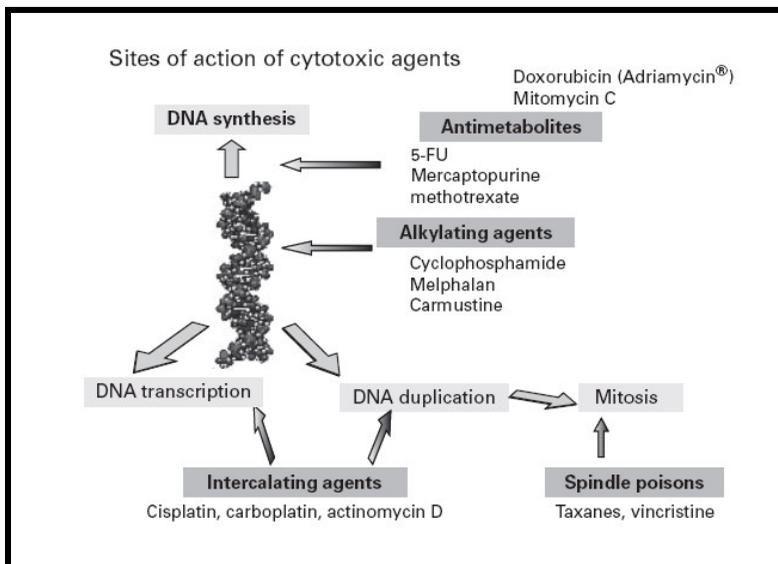
Além das alterações citogenéticas, a expressão de imunofenótipos aberrantes também está relacionada como um fator prognóstico a ser considerado no momento da determinação da conduta terapêutica do paciente. Fenótipos aberrantes são aqueles em que uma célula de uma determinada linhagem expressa antígenos característicos de outra linhagem, ou seja, antígenos que em circunstâncias normais não seriam encontrados nesse tipo celular. Em alguns subtipos de LMA, a expressão de CD56, um marcador típico dos linfócitos *natural killer*, está associada a um pior prognóstico e uma menor chance de cura (SWERDLOW et al., 2008). Já a expressão de antígenos mielóides, como o CD13 e o CD33, em células leucêmicas de indivíduos com LLA

parecem conferir um pior prognóstico. Aparentemente, a expressão de CD34 nas LLAs, um marcador de *stem-cells*, também se apresenta como um fator prognóstico negativo, muito provavelmente porque a expressão desse antígeno está comumente associada à t(9;22), uma alteração citogenética considerada de prognóstico desfavorável nessa doença (BASSAN et al., 2004).

Apesar dos fatores clínicos e laboratoriais citados acima possuírem grande influência no resultado do tratamento, uma das determinantes primárias para a sobrevida do paciente é a sensibilidade da doença à quimio-radioterapia. Pacientes com LMA ou LLA que atingem remissão completa após o primeiro ciclo de quimioterapia ou após 4-5 semanas de tratamento, respectivamente, são considerado bons respondedores e, portanto, são classificados como de melhor prognóstico (BASSAN et al., 2004; SHIPLEY e BUTERA, 2009).

Os conceitos da terapêutica moderna são baseados no diagnóstico e tratamento individualizados. O aperfeiçoamento da terapia e cura alcançado nos últimos 20 anos inclui um diagnóstico completo, a classificação exata do subtipo da leucemia aguda e uma correta estratificação dos fatores prognósticos (HAFERLACH et al., 2005; LUQMANI, 2005). Essa ampla variedade de fatores faz com que os procedimentos terapêuticos para pacientes com leucemia ainda não apresentem um consenso, o que faz com que variem amplamente entre os diversos centros de tratamento (LUQMANI, 2005).

O objetivo da terapia antineoplásica é destruir as células leucêmicas, causando o menor dano possível aos tecidos normais (LUQMANI, 2005). Existem diferentes tipos de tratamentos antileucêmicos, no entanto, entre estes, a quimioterapia é a mais utilizada (GOL B et al., 2001). A quimioterapia consiste na utilização de uma ampla variedade de fármacos citotóxicos que objetivam promover a morte celular por apoptose ou modificar processos intracelulares que convergem a ela (HERR e DEBATIN, 2001; LUQMANI, 2005). A apoptose induzida por quimioterápicos tem a finalidade de danificar o DNA, os componentes lipídicos de membranas celulares e as proteínas celulares, causando um desbalanço na homeostase celular (Quadro 1) (HERR e DEBATIN, 2001).



Quadro 1. Sítios de ação dos agentes citotóxicos.
 Adaptados de: LUQMANI, 2005.

O tratamento das LAs é dividido em quimioterapia de indução e terapia de pós-remissão ou consolidação (BASSAN et al., 2004; SHIPLEY e BUTERA, 2009; NCCN, 2010). A fase de indução consiste numa terapia “agressiva” que visa alcançar uma remissão completa, ou seja, fazer com que a medula óssea apresente menos de 5% de blastos e que o sangue periférico atinja valores normais de leucócitos, neutrófilos, plaquetas e hemoglobina. A terapia de pós-remissão ou consolidação é utilizada assim que a remissão completa é alcançada e objetiva evitar uma recidiva da doença, diminuindo a quantidade de células leucêmicas a quantidades não detectadas laboratorialmente (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2005). Mesmo reconhecendo a importância da fase inicial do tratamento quimioterápico para a obtenção da remissão e o controle inicial da doença, é igualmente importante que o paciente termine a fase de indução em condições de tolerar maiores doses subsequentes de tratamento na fase de consolidação, para que dessa forma a remissão atingida seja mais duradoura, uma vez que pacientes que não conseguem receber a terapia pós-remissão tendem a recidivar em 6 a 9 meses (NCCN, 2010).

Atualmente, o número de pacientes que atingem remissão completa após a quimioterapia é de 32% a 80% em adultos com diagnóstico de LMA e de 60% a 85% dos adultos diagnosticados com LLA (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2005; SWERDLOW et al., 2008). Já os pacientes pediátricos apresentam uma remissão completa em 40% a 60% dos casos de LMA e em mais de 95% dos casos de LLA. Apesar das elevadas taxas de remissão completa, aproximadamente 35% e 40% dos pacientes adultos com LMA e LLA, respectivamente, recidivam; enquanto as taxas de recidiva nos paciente pediátricos com LMA e LLA são de 50% e 25%, respectivamente (PUI e CRIST, 1995; ZWAAN e KASPERS, 2004; KARDOS et al., 2005; KASPERS e CREUTZIG, 2005; RIBEIRO et al., 2005; PUI e EVANS, 2006; SWERDLOW et al., 2008).

A resistência ao tratamento é um dos fatores que podem ser responsáveis pelo insucesso no tratamento de LA (ESTEY, 2001; LUQMANI, 2005). A resistência adquirida ou intrínseca a múltiplas drogas (MDR) é o maior obstáculo clínico no tratamento de neoplasias hematológicas (GOLDIE, 2001; OZBEN, 2006) e é caracterizada pela resistência cruzada a uma ampla variedade de fármacos não relacionados estrutural e funcionalmente (ENDICOTT e LING, 1989; BORST, 1991; KRUIH, 2003). Vários mecanismos podem estar envolvidos no fenômeno MDR, como o mecanismo de efluxo de drogas através da membrana plasmática, as alterações nos mecanismos que regulam a morte celular por apoptose e a resposta gênica, como a superexpressão de proteínas de resistência (KARAKAS et al., 1998; LUQMANI, 2005; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007).

1.2 Bombas de Efluxo de Drogas

Provavelmente, uma das mais significantes formas de resistência a múltiplos fármacos antineoplásicos é através da ação de um grupo de proteínas de membrana, consideradas como bombas de efluxo de drogas, as quais transportam para fora da célula moléculas citotóxicas, mantendo as concentrações intracelulares de quimioterápicos abaixo das concentrações citotóxicas desejadas (LUQMANI, 2005). Duas famílias de proteínas são as principais implicadas no fenômeno de MDR: a superfamília das *ATP-binding cassette* (transportadoras ABC) e a família das *human major vault*

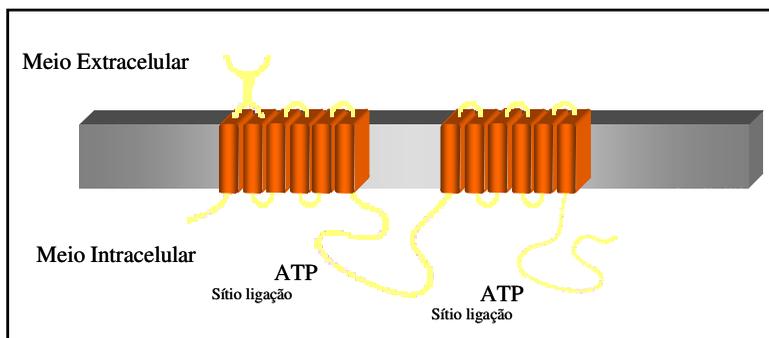
proteins (MVP) (BORST et al., 2000; SONNEVELD, 2000; DURDUX et al., 2004; JORDAN e WILSON, 2004; VALERA et al., 2004; HUH et al., 2006; KOURTI et al., 2007; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007).

Muitos membros da superfamília das *ATP-binding cassette* são bombas de efluxo de drogas dependentes de ATP envolvidas nos processos de absorção, distribuição e excreção de vários compostos farmacológicos e endógenos (DEAN e ALLIKMETS, 2001; LUQMANI, 2005; VAN DER DEEN et al., 2005). Baseado na organização genômica, na ordem dos domínios e na homologia das sequências, essa superfamília foi dividida em 7 subclasses, que vão de ABCA à ABCG (DEAN, HAMON e CHIMINI, 2001; LUQMANI, 2005). Dentre os diversos membros dessa superfamília, a Glicoproteína-P (ABCB1/Pgp/MDR1) e a Proteína Associada à Resistência a Múltiplos Fármacos 1 (ABCC1/MRP1) são as mais bem estudadas e estão amplamente relacionadas com um prognóstico desfavorável em várias neoplasias hematológicas (MARTINEZ et al., 1997; COVELLI, 1999; LEITH et al., 1999; TSIMBERIDOU et al., 2002; VALERA et al., 2004; SCHAICH et al., 2005; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; LOURENCO et al., 2008; CORTEZ et al., 2009).

As proteínas da família das MVP são os componentes predominantes de organelas denominadas de *vaults* (ROME, KEDERSHA e CHUGANI, 1991; SCHEFFER et al., 1995). Essas organelas estão localizadas principalmente em vesículas citoplasmáticas, mas uma pequena fração também pode ser encontrada na membrana nuclear e nos complexos de poros nucleares (CHUGANI, KEDERSHA e ROME, 1991; IZQUIERDO et al., 1998; SWERTS et al., 2006). A função exata das proteínas que compõem a família das MVP ainda é desconhecida, mas a sua localização sugere que elas sejam responsáveis por um transporte bidirecional de uma variedade de substratos entre o núcleo e o citoplasma (CHUGANI, KEDERSHA e ROME, 1991; ROME, KEDERSHA e CHUGANI, 1991; IZQUIERDO et al., 1998). Dentre os membros dessa família, a Proteína Associada à Resistência Pulmonar (LRP) é a única que já foi relacionada ao fenômeno de MDR (SCHEPER et al., 1993; SCHEFFER et al., 1995; VALERA et al., 2004).

1.2.1 Glicoproteína-P (ABC1/Pgp/MDR1)

A proteína ABCB1 é codificada pelo gene *abcb1* que se localiza no cromossoma 7q21.12 (DEAN, HAMON e CHIMINI, 2001; VAN DER DEEN et al., 2005). Ela é uma proteína glicosilada de 170 kDa, composta por duas metades simétricas, cada uma constituída de um domínio transmembrana N-terminal e um domínio citosólico C-terminal ligante de ATP (Quadro 2). Cada domínio transmembrana possui seis segmentos abrangentes que estão envolvidos no reconhecimento e na ligação com o substrato (GOTTESMAN e PASTAN, 1993; AMBUDKAR et al., 1999; EJENDAL e HRYCYNA, 2005; LUQMANI, 2005).



Quadro 2. Estrutura da Glicoproteína-P (ABCB1/Pgp/MDR1).
Adaptado de: ENDICOTT e LING, 1989.

A ABCB1 é um dos membros mais estudados da superfamília das *ATP-binding cassette*. Ela é uma proteína capaz de se ligar e hidrolisar ATP, a energia resultante é utilizada para a translocação de substratos através da membrana celular (EJENDAL e HRYCYNA, 2005; SHIPLEY e BUTERA, 2009). Dessa forma, a proteína ABCB1 possui um papel fisiológico na defesa da célula contra estímulos externos (DUHEM, RIES e DICATO, 1996; VAN DER DEEN et al., 2005), sendo responsável, principalmente, pelo transporte de substâncias hidrofóbicas neutras ou fracamente positivas (TSURUO, 1988; DUHEM, RIES e DICATO, 1996; VAN DER DEEN et al., 2005; KOURTI et al., 2007; HEMBRUFF et al., 2008). Além da função de

proteção, a proteína ABCB1 também apresenta papel fundamental na regulação da diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. Alguns polimorfismos de ABCB1 estão relacionados com a liberação de diversas citocinas, como a interleucina-2 e -4, interferon- γ e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (BUDA et al., 2008). A proteína ABCB1 parece também exercer um papel no transporte de fosfolipídios através da membrana celular e também pode atuar como uma molécula antiapoptótica, através da inibição da ativação das caspases 8 e 3 (SCOTTO e JOHNSON, 2001; BUDA et al., 2008).

Tipicamente, a ABCB1 é expressa em órgãos relacionados com as funções de absorção e excreção, como o fígado e o intestino; em órgãos com função de barreira sanguínea, como a barreira hematoencefálica, o endotélio capilar e a placenta; e no sistema hematopoiético, como nos precursores hematopoiéticos e linfócitos (DUHEM, RIES e DICATO, 1996; VAN DER DEEN et al., 2005). Apesar de ser encontrada em vários tecidos, os níveis de expressão de ABCB1 são altamente variáveis entre os diferentes tecidos e indivíduos e é dependente, tanto de característica genotípicas, quanto de condições gerais de metabolismo e meio ambiente, o que inclui exposição a choques térmicos, irradiação, estresse genotóxico e estímulos antiinflamatórios (SCOTTO e JOHNSON, 2001; LUQMANI, 2005).

A proteína ABCB1 está bem caracterizada como uma bomba de efluxo capaz de extrair para fora da célula diversos fármacos e quimioterápicos (Tabela 2) (TSURUO, 1988; KOURTI et al., 2007; HEMBRUFF et al., 2008; SHIPLEY e BUTERA, 2009). Com isso, uma alta expressão de ABCB1 tem sido associada à resistência à quimioterapia (TSURUO, 1988; SCOTTO e JOHNSON, 2001; VAN DER DEEN et al., 2005; KOURTI et al., 2007; HEMBRUFF et al., 2008). Curiosamente, altos níveis de expressão dessa proteína são comumente observados em células tumorais que não foram tratadas, mesmo quando o tecido de origem exibe uma pequena ou nenhuma expressão constitutiva de ABCB1, o que sugere que a expressão desse gene deve ser influenciada por componentes envolvidos na transformação maligna (SCOTTO e JOHNSON, 2001).

Tabela 2. Lista de Fármacos que são Extruídos pela ABCB1

Antineoplásicos	Inibidores de Proteases do HIV
Doxorubicina	Amprenavir
Daunorubicina	Indinavir
Vinblastina	Nelfinavir
Vincristina	Ritonavir
Actinomicina D	Saquinavir
Paclitaxel	Fármacos Cardíacos
Teniposide	Digoxina
Etoposide	Quinidina
Imunossupressores	Anti-Eméticos
Ciclosporina A	Ondansetrona
FK506	Antibióticos
Esteróides	Eritromicina
Aldosterona	Anti-Helmínticos
Hidrocortisona	Ivermectina
Cortisol	Antagonistas da Dopamina
Corticoesterona	
Dexametasona	

Adaptado de: LUQMANI, 2005.

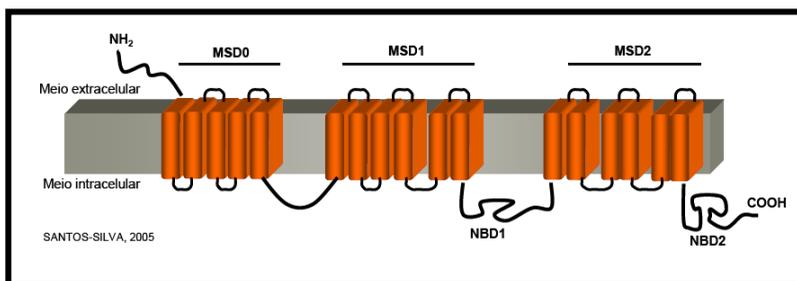
A função a nível celular da ABCB1 em células neoplásicas tem sido extensivamente investigada (FOJO et al., 1987; LEGRAND, ZITTOUN e MARIE, 1999; MAHJOUBI et al., 2008; HIROSE, 2009). A atividade e a expressão da ABCB1 representa um fator de risco independente na falha do tratamento quimioterápico (TSIMBERIDOU et al., 2002; MAHADEVAN e LIST, 2004; LOURENCO et al., 2008; SHIPLEY e BUTERA, 2009) e um aumento da atividade ou da expressão têm sido associado a menores taxas de remissão completa e menor sobrevida livre de doença em pacientes tratados com regimes terapêuticos padrão (MUSTO et al., 1991; PIRKER et al., 1991; CAMPOS et al., 1992; WOOD et al., 1994; ZOCHBAUER et al., 1994; GUERCI et al., 1995; LEITH et al., 1997; LEITH et al., 1999; KOURTI

et al., 2007). Estudos demonstraram que pacientes adultos com LMA e LLA que não superexpressam ABCB1 ao diagnóstico apresentam uma taxa de remissão completa após a terapia de indução de 89% e 93%, respectivamente; enquanto apenas 53% e 56% dos pacientes que expressam ABCB1 e possuem LMA e LLA, respectivamente, atingem remissão completa após terapia de indução (DUHEM, RIES e DICATO, 1996). Os níveis de expressão de ABCB1 parecem também estar correlacionados com diversas variáveis prognósticas clínicas e biológicas, como idade, imunofenótipo (SAMDANI et al., 1996), contagem de leucócitos ao diagnóstico (VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007), expressão de CD34 (SAMDANI et al., 1996; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007) e resposta à terapia de indução (LIST et al., 1996). No entanto, muitos desses estudos são controversos e, apesar de alguns estudos relatarem que a ABCB1 possui um significado prognóstico em certos tipos de neoplasias (VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, SONNEVELD e PIETERS, 2000; WUCHTER et al., 2000; PENSON et al., 2004), muitos outros comumente falham em demonstrar uma correlação com a resposta clínica do paciente (KUMTA et al., 2001; CONSOLI et al., 2002; LEONESSA e CLARKE, 2003), o que leva a uma controvérsia em relação a relevância do papel da ABCB1 na resistência a drogas (LUQMANNI, 2005). Apesar dos dados contraditórios, muitos centros de tratamento utilizam os níveis de expressão de ABCB1 como um fator prognóstico e um indicador para a necessidade de utilização de um protocolo de tratamento mais agressivo, com quimioterápicos de segunda ou terceira linha (DUHEM, RIES e DICATO, 1996).

1.2.2 Proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1 (ABCC1/MRP1)

ABCC1 é uma proteína transmembrana, dependente de ATP e pertencente à subfamília ABCC (BORST et al., 2006; DEELEY e COLE, 2006; HUANG e SADEE, 2006). O gene *abcc1*, que codifica a proteína ABCC1, localiza-se no cromossoma 16p13.12 (DEAN, HAMON e CHIMINI, 2001; VAN DER DEEN et al., 2005). Estruturalmente, a proteína ABCC1 possui dois domínios abrangentes de membrana (MSD1 e MSD2), que contém seis hélices transmembranares cada e um terceiro domínio abrangente de membrana

(MSD0), com aproximadamente 200 aminoácidos, que é formado por cinco hélices transmembranares, com uma região amino (NH₂) terminal (Quadro 3) (BAKOS et al., 1996; KAST e GROS, 1997; COLE e DEELEY, 2006; DEELEY e COLE, 2006). Evidências indicam que a ligação de substratos ocorra pela interação entre estas hélices transmembranares (ZHANG, COLE e DEELEY, 2001; HAIMEUR et al., 2004). Na porção citoplasmática da proteína, há dois sítios de ligação de nucleotídeos (NBDs) (FLENS et al., 1994; COLE e DEELEY, 2006). Estes sítios não são funcionalmente equivalentes, de forma que o NBD1 possui uma maior afinidade de ligação para ATP do que o NBD2; no entanto, o NBD2 possui maior capacidade de hidrolisar o ATP (COLE e DEELEY, 2006).



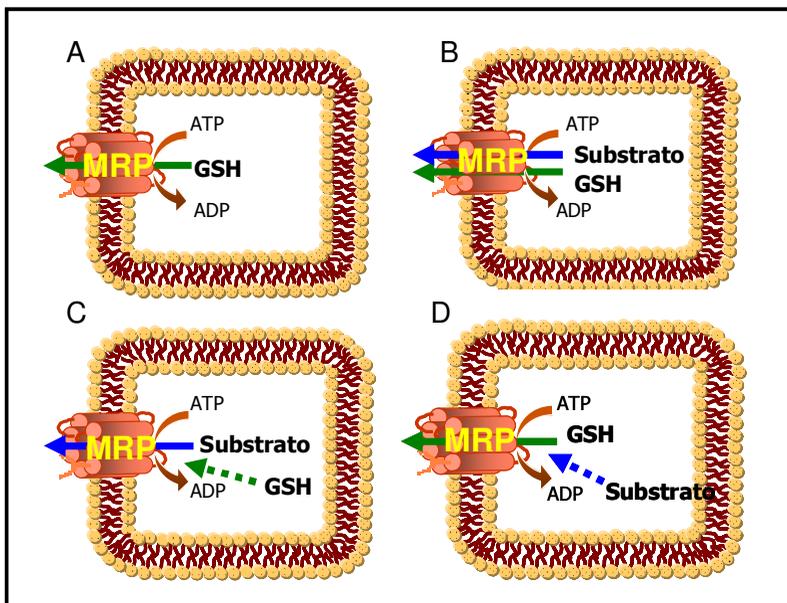
Quadro 3. Estrutura da Proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1 (ABCC1/MRP1).

Adaptado de: DEELEY, WESTLAKE e COLE, 2006.

A expressão de ABCC1 é variável entre os diferentes tecidos e os indivíduos. Essa proteína é altamente expressa nos pulmões, testículos, rins, esqueleto, músculo cardíaco e placenta (LESLIE, DEELEY e COLE, 2005; COLE e DEELEY, 2006; DEELEY, WESTLAKE e COLE, 2006). Comparado com outros órgãos, o pulmão é o órgão sólido que mais expressa essa proteína. A ABCC1 é principalmente expressa no lado basolateral das células epiteliais dos brônquios e nos macrófagos alveolares (DEAN, HAMON e CHIMINI, 2001; VAN DER DEEN et al., 2005). Na maioria dos outros tecidos, a ABCC1 também está localizada na superfície celular basolateral, o que resulta no efluxo de substratos para a circulação sanguínea (LESLIE, DEELEY e COLE, 2005; COLE e DEELEY, 2006). No cérebro, a ABCC1 encontra-se na região apical da célula (GRAFF e POLLACK,

2004) e serve como uma barreira de permeabilidade de compostos entre o sangue e o fluido cerebrospinal (COLE e DEELEY, 2006). Curiosamente, a ABCC1 é muito pouco expressa no fígado adulto, no entanto possui altos níveis de expressão em hepatócitos em proliferação e linhagens de células tumorais (DEELEY, WESTLAKE e COLE, 2006).

A função fisiológica da proteína ABCC1 é de proteger a célula contra o acúmulo de substâncias tóxicas, bem como de promover o transporte de sinais de transdução através da membrana celular (DEAN, HAMON e CHIMINI, 2001; LESLIE, DEELEY e COLE, 2005). A ABCC1 é capaz de transportar um amplo espectro de substratos aniônicos hidrofóbicos através da membrana celular, no entanto, seus principais substratos fisiológicos são o leucotrieno C₄ e a glutationa oxidada (GSSG) (LOE, DEELEY e COLE, 1996; VAN DER DEEN et al., 2005). Essa proteína também é capaz de transportar conjugados de GSH, o que a torna uma transportadora de conjugados de GSH e/ou transportadora de ânions orgânicos (LOE, DEELEY e COLE, 1996). No entanto, a interação entre GSH e ABCC1 é complexa e não está completamente esclarecida. A GSH parece interagir com a ABCC1, por meio de pelo menos quatro diferentes mecanismos (Quadro 4): i) a GSH por si só é substrato de baixa afinidade para ABCC1; ii) a GSH é requerida para o co-transporte de alguns substratos para ABCC1; iii) a GSH estimula o transporte de alguns compostos através da ABCC1, mas ela não é co-transportada; iv) o transporte da GSH pode ser intensificado por certos compostos, os quais não são substratos para ABCC1 (BALLATORI et al., 2005). Além da função de transporte, a ABCC1 parece estar envolvida na regulação de canais endógenos e de outros transportadores (LOE, DEELEY e COLE, 1996).



Quadro 4. Possíveis mecanismos de interação entre ABCB1 e GSH. (A) GSH como substrato para ABCB1; (B) A GSH como co-transportador de alguns substratos para ABCB1; (C) GSH como estimulador do transporte de certos compostos pela ABCB1, porém, a GSH não é co-transportada; (D) O transporte da GSH é acelerado por certos compostos, mas estes não são transportados pela ABCB1.

Adaptado de: BALLATORI et al., 2005.

Estudos demonstraram que a expressão de ABCB1 confere um perfil de resistência *in vitro* muito similar ao conferido pela proteína ABCB1 (LAUTIER et al., 1996; LOCKHART, TIRONA e KIM, 2003; HEMBRUFF et al., 2008). Apesar das similaridades, existem algumas diferenças no perfil de resistência oferecido por essas duas proteínas. Por exemplo, enquanto a proteína ABCB1 possui uma afeição pelo paclitaxol e a colchicina, o que fornece uma grande resistência a esses compostos, a ABCB1 não tem uma boa capacidade de extrusão dos mesmos, o que faz com que uma expressão de ABCB1 confira apenas uma pequena resistência ao paclitaxol e a colchicina (LOE, DEELEY e COLE, 1996). Alguns dos substratos mais conhecidos da ABCB1 são: as antracilinas, os alcalóides da vinca, os etoposídeos, o metotrexato, a doxorubicina e a daunorubicina (KRUH, 2003; COUTURE, NASH e

TURGEON, 2006). O mecanismo mais aceito para explicar a resistência conferida pela ABCC1 é o de que a GSH forme complexos com esses agentes quimioterápicos, o que possibilita a ABCC1 extrair esses compostos para fora da célula (ZAMAN et al., 1995; BORST et al., 2006; COLE e DEELEY, 2006). Essa hipótese é corroborada por estudos que demonstraram que há uma correlação direta entre o aumento da expressão de ABCC1 e de GSH em células tumorais (ISHIKAWA et al., 1996; KUO et al., 1998). Além disso, está demonstrado que a redução da concentração de GSH diminui a resistência mediada pela ABCC1, contra alcalóides da vinca e antraciclina (ISHIKAWA et al., 1996; KUO et al., 1998; BORST et al., 2000).

A determinação do significado clínico de expressão de ABCC1 nas LAs tem sido complicada pelo fato de que todas as linhagens de células hematopoiéticas normais possuem uma expressão constitutiva dessa proteína. Devido a essa constatação, muitos resultados demonstrados na literatura são discordantes (DEELEY, WESTLAKE e COLE, 2006; HIROSE, 2009). Enquanto alguns estudos relatam que a alta expressão de ABCC1 é um fator de prognóstico desfavorável em diferentes neoplasias hematológicas não tratadas e refratárias à quimioterapia, incluindo as LMAs e LLAs (BURGER et al., 1994; SCHNEIDER et al., 1995; PLASSCHAERT et al., 2005; SCHAICH et al., 2005), outros autores não encontram correlação entre os níveis de expressão de ABCC1 e o desfecho do paciente (DEN BOER et al., 1998; LEITH et al., 1999; TSIMBERIDOU et al., 2002). Outro desafio na interpretação do valor prognóstico da ABCC1 é a possibilidade de que as células leucêmicas expressem múltiplos transportadores de membrana (DEELEY, WESTLAKE e COLE, 2006). Por exemplo, estudos demonstraram que a co-expressão de ABCB1 e ABCC1 em células leucêmicas tem um forte impacto negativo na resposta ao tratamento e na sobrevida dos pacientes (LEGRAND, ZITTOUN e MARIE, 1999; SONNEVELD e LIST, 2001); no entanto, essa resistência preditiva não é encontrada quando as proteínas são consideradas separadamente (LEGRAND, ZITTOUN e MARIE, 1999).

1.2.3 Proteína associada à resistência pulmonar (LRP)

A proteína LRP foi inicialmente identificada em células de linhagem de câncer de pulmão resistentes a antraciclina que não

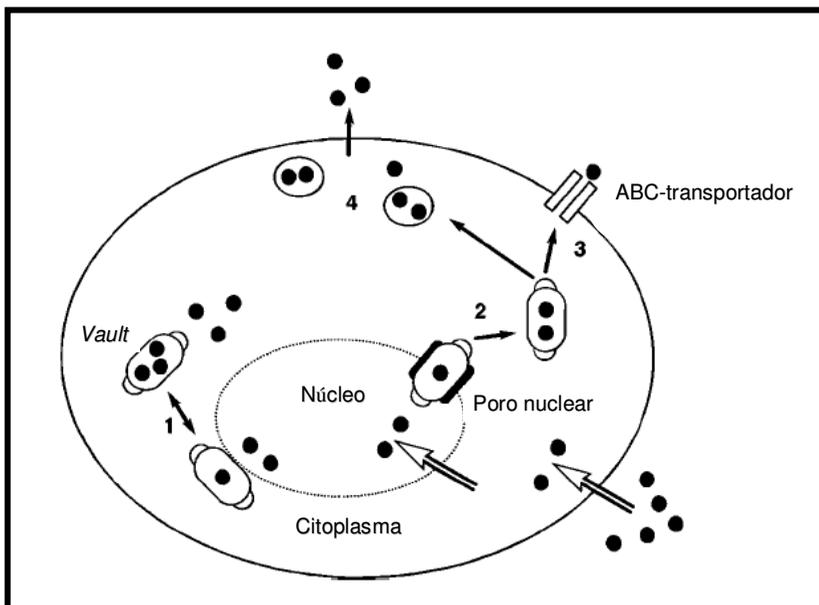
apresentavam um aumento de expressão de ABCB1. O gene *lrp*, que codifica a proteína LRP, está localizado na região cromossomal 16p11.2, próximo ao gene da proteína ABCC1 (IZQUIERDO et al., 1998; SWERTS, 2006). Diferentemente das proteínas ABCB1 e ABCC1, essa proteína de 100 kDa não possui fragmentos transmembrana ou sítios de ligação de ATP, não sendo, portanto, considerada um membro da superfamília *ATP-binding cassette* (IZQUIERDO et al., 1998; MOSSINK et al., 2003; DURDUX et al., 2004; SWERTS et al., 2006). A LRP é membro da família MVP e é o principal componente das organelas ribonucleoprotéicas denominadas de *vaults* (ROME, KEDERSHA e CHUGANI, 1991; SCHEFFER et al., 1995; SWERTS et al., 2006).

O papel funcional dessa proteína ainda não está bem esclarecido, mas acredita-se que ela esteja envolvida no transporte de substâncias para fora do núcleo e/ou para dentro de vesículas, o que sugere que ela exerça um papel nos processos de detoxificação (SWERTS et al., 2006). Além disso, a LRP também parece estar envolvida no transporte intracelular de substâncias para o funcionamento normal da célula, como por exemplo, hormônios, ribossomos e RNA mensageiro (mRNA) (LU e SHERVINGTON, 2008; KUO, 2009).

A LRP é expressa em uma variedade de tecidos humanos normais. Seus níveis de expressão são variáveis entre os diferentes tecidos e indivíduos, altos níveis de expressão são observados no tecido epitelial dos brônquios e trato digestivo, bem como nos queratinócitos, córtex adrenal e macrófagos (SWERTS et al., 2006). Uma superexpressão de LRP também é encontrada em uma variedade de células de linhagem tumoral caracterizadas por uma quimioresistência intrínseca ou adquirida, o que indica que a regulação positiva do gene *lrp* pode ser uma forma de reação dessas linhagens à exposição a agentes citotóxicos (SCHEPER et al., 1993; MULLER et al., 1994; IZQUIERDO et al., 1998; MOSSINK et al., 2003; DURDUX et al., 2004; SWERTS et al., 2006).

O mecanismo de ação da LRP no fenótipo MDR ainda não está completamente compreendido. Baseado na sua função de transporte e na sua distribuição celular, um dos mecanismos propostos é que as MVPs agem como transportadores de drogas associados à membrana citoplasmática e/ou nuclear, transportando os agentes antineoplásicos para longe de seus sítios de ação subcelular através de extrusão das drogas do núcleo e/ou seu seqüestro em vesículas exocitóticas (Quadro

5) (MOSSINK et al., 2003; SWERTS et al., 2006). Apesar de seus mecanismos de ação não estarem completamente elucidados, a superexpressão de LRP está associada com uma resistência intrínseca a vários agentes quimioterápicos, como a doxorubicina, a vincristina, a mitoxantrona, o etoposide e os compostos de platina (SCHEPER et al., 1993; SCHEFFER et al., 1995).



Quadro 5. Mecanismos de ação propostos para as MVPs. As MVPs podem atuar na: 1 e 2 – na compartimentalização intracelular e/ou transporte de biomoléculas; 2 – no transporte de fármacos para longe do seu sítio de ação, por exemplo o núcleo; 3 – no transporte de fármacos para bombas de efluxo; 4 – no transporte de fármacos para vesículas exocitóticas. Adaptado de: MOSSINK et al., 2003.

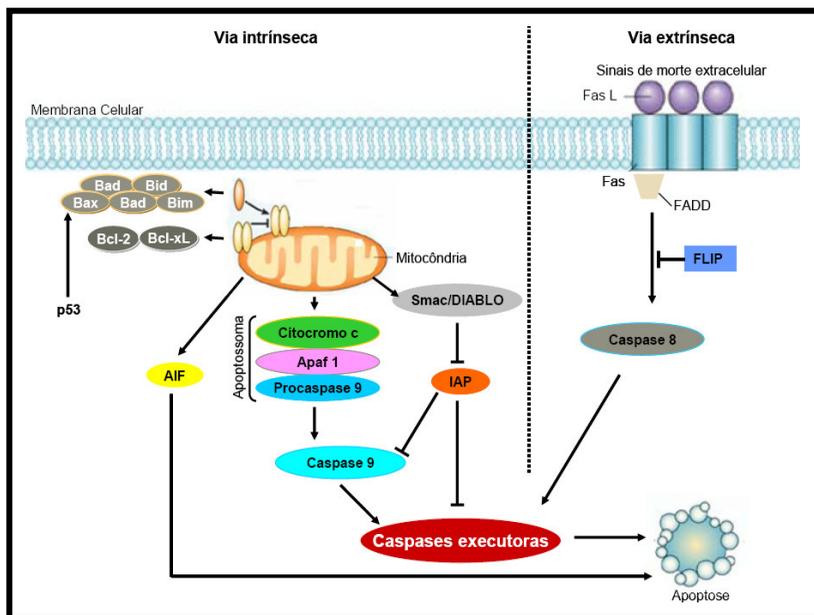
O resultado da expressão da LRP em células leucêmicas agudas ainda é controverso, pois, enquanto alguns trabalhos associam a LRP com uma resistência ao tratamento e uma menor sobrevida dos pacientes (VALERA et al., 2004; HUH et al., 2006), outros afirmam que a expressão de LRP ao diagnóstico não tem um impacto negativo na resposta clínica do paciente (DEN BOER et al., 1998; KAKIHARA et

al., 1999; SONNEVELD e LIST, 2001). De 26% a 91% dos pacientes com LMA superexpressam LRP ao diagnóstico (LIST et al., 1996; BORG et al., 1998; FILIPITS et al., 1998; LEITH et al., 1999; MICHIELI et al., 1999; MOSSINK et al., 2003). No entanto, quando comparada com o momento do diagnóstico, a expressão de LRP nos casos de recidiva e refratariedade não está elevada (MOSSINK et al., 2003). Já nos casos de LLA, a expressão de LRP vai de 10% a 47%, ao diagnóstico, para 68% nos casos de recidiva, sugerindo que a expressão de LRP pode ser induzida tanto durante a quimioterapia quanto por seleção positiva após um tratamento prévio (DEN BOER et al., 1998; KAKIHARA et al., 1999; MOSSINK et al., 2003).

1.3 Mecanismos de regulação da morte celular por apoptose

A apoptose ou morte celular programada é um processo de morte celular altamente regulado, fundamental para o controle da fisiologia celular e dos tecidos, em resposta a estímulos internos e externos, os quais levam à morte celular em poucas horas (TESTA e RICCONI, 2007). Este evento celular caracteriza-se morfologicamente pela condensação da cromatina, perda do volume celular, aumento da granulosidade citoplasmática e formação de pregas na membrana plasmática, culminando na fragmentação celular em corpos apoptóticos e fragmentação do DNA em 180 e 200 pares de base, por DNases endógenas em oligonucleossomas; entretanto, há a manutenção da estrutura das organelas (COULTAS e STRASSER, 2003; SHIOZAKI e SHI, 2004; CONRADT, 2009).

Os mecanismos que regulam a apoptose são complexos e consistem na ativação de numerosas vias de sinalização e de componentes inibitórios, que compõem vários sistemas paralelos ou inter-relacionados, os quais culminam na autodestruição celular (Quadro 6). Quando esses mecanismos são alterados em favor da sobrevivência das células, eles contribuem para o desenvolvimento e persistência do câncer (REED, 2000; NOTARBARTOLO et al., 2004; GOELLNER et al., 2006).



Quadro 6. Vias da apoptose: intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (receptores de morte). Bax, Bad, Bid, Bik, Bim, proteínas da família Bcl-2 apoptóticas; Bcl-2, Bcl-xL. Proteínas da família Bcl-2 antiapoptóticas; p53, proteína p53; AIF, fator indutor da apoptose; Smac/DIABLO, ativador secundário da caspase derivado da mitocôndria; IAP, proteína inibidora da apoptose; Apaf-1, fator ativador de caspase; FLIP, proteína inibitória associada a Fas; Fas, receptor de superfície celular; FasL, ligante de Fas; FADD, proteína associada ao Fas com um domínio de morte. Adaptado de: CORRY e ADAMS, 2002.

A apoptose é acionada apenas na presença de sinais específicos. Vários sinais, externos e internos, podem desencadear um processo apoptótico. Como sinais externos, pode-se incluir a ausência de um fator de crescimento presente no soro, ou a ligação de um “sinal de morte”, por exemplo os quimioterápicos, que induzem a produção de um ligante Fas (*Fas ligand*), que ativam do receptor Fas (KAUFMANN e EARNSHAW, 2000). Os sinais internos compreendem aqueles que surgem quando, durante o processo de replicação do DNA, acontecem muitos erros e danos a essa macromolécula e o sistema de reparo do DNA não consegue repará-los (LODISH et al., 2000; WEINBERG,

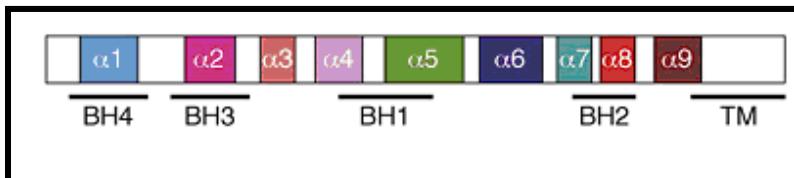
2000). Outro fator que inicia a apoptose é a liberação do citocromo C pelas mitocôndrias, resultante da transição de permeabilidade da membrana, que pode ativar as caspases, que são as executoras da apoptose (KANNAN e JAIN, 2000; SARASTE e PULKKI, 2000). As caspases têm um papel preponderante na apoptose. Elas são cisteíno-proteases, que estão presentes na forma de zimogênio (forma inativa) e são ativadas em cascatas proteolíticas. A ativação das pró-caspases iniciadoras (procaspases 8, 9 e 10) induz a ativação das caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7), as quais quebram substratos específicos, como a laminina, proteínas do citoesqueleto e o inibidor de CAD (DNAase ativada por caspase) (TESTA e RICCONI, 2007; DEL POETA et al., 2008).

A apoptose pode ser inibida ao nível de pró-caspases iniciadoras ou caspases efetoras, servindo como “pontos de verificação” durante o processo de ativação das caspases. Por exemplo, a família das proteínas antiapoptóticas ADEDs (assim denominadas pela sua função antiapoptótica e pela presença de um domínio efetor de morte) bloqueia a apoptose pela supressão das caspases iniciadoras, as quais são ativadas pelos 8 receptores de fator de necrose tumoral (TNF). Outro grupo de proteínas antiapoptóticas que inibe as caspases iniciadoras é o da família da proteína Bcl-2. Essas proteínas são moduladoras centrais da apoptose na via mitocondrial, regulando a liberação do citocromo c para o citosol, que, por sua vez, se liga ao fator ativador de caspase Apaf-1, promovendo alterações conformacionais que permitem a ativação da caspase 9 e, subseqüentemente, a ativação em cascata das caspases. A família é constituída de proteínas com funções opostas, isto é, enquanto algumas proteínas inibem a apoptose, como a Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, A1 e Mcl-1, outras a ativam, como é o caso da Bax, Bik, Bak, Bad e Bcl-xS. Sob circunstâncias normais, o delicado equilíbrio entre as duas classes de proteínas influencia no resultado final, no qual a célula é induzida à apoptose ou não (KUSENDA, 1998; RUVOLO, DENG e MAY, 2001).

O desequilíbrio entre Bcl-2 e Bax leva à resistência ou à sensibilização por estímulos de morte, como os quimioterápicos. No câncer, o desequilíbrio é em favor da inibição da apoptose, como pode ser observado nos linfomas, cuja translocação dos cromossomos 14;18 resulta na superexpressão de Bcl-2. A superexpressão de Bcl-2 tem emergido como um fator de mau prognóstico nos pacientes com leucemia aguda (KUSENDA, 1998; CAMPOS et al., 1999; ONG et al., 2000; RUVOLO, DENG e MAY, 2001; SUAREZ et al., 2001). Estudos com linfócitos normais e células de linfomas demonstraram que uma

superexpressão de Bcl-2 inibe a apoptose induzida por radiação e antineoplásicos e promove um maior tempo de vida da célula, bem como uma expansão clonal continuada (STRASSER et al., 1994; SCHMITT, ROSENTHAL e LOWE, 2000). Vários estudos correlacionam altos níveis de expressão de Bcl-2 com uma pior resposta à quimioterapia e um reduzido tempo de sobrevida global (CAMPOS et al., 1993; MAUNG et al., 1994; BRADBURY e RUSSELL, 1995; LAURIA et al., 1997; KARAKAS et al., 1998; MENENDEZ et al., 2004). Além disso, com relativa frequência, pacientes com LMA apresentam uma expressão aumentada de Bcl-2 associada a uma positividade para CD34, pior resposta à quimioterapia e uma sobrevivência significativamente mais curta (BRADBURY e RUSSELL, 1995; CAMPOS et al., 1999; SHIKAMI et al., 1999; WUCHTER et al., 1999; TOTHOVA et al., 2002).

A proteína Bcl-2 possui em sua estrutura um domínio transmembrana que permite a sua fixação nas membranas do retículo endoplasmático e mitocondrial, locais onde permanecem continuamente fixas e exercem a sua função protetora contra a morte celular (PATEL e GORES, 1995; CORY e ADAMS, 2002). Como todos os membros da sua família, a proteína Bcl-2 possui um domínio protéico comum, denominado BH3. A Bcl-2 também possui outros três domínios homólogos, conhecidos como domínios BH1, BH2 e BH4 (Quadro 7). O domínio BH4 está presente apenas nos membros com função antiapoptótica, como a Bcl-2, o que sugere que esse domínio esteja diretamente relacionado com essa atividade (SCHULZE-BERGMEN e KRAMMER, 2004). Por outro lado, o domínio BH3 parece estar relacionado com a função pró-apoptótica dessas proteínas (KELEKAR e THOMPSON, 1998), uma vez que alguns membros da família Bcl-2, conhecidos como BH3-*only*, não apresentam os domínios BH1, BH2 ou BH4 e exercem uma atividade pró-apoptótica importante (SCHULZE-BERGMEN e KRAMMER, 2004). Já os domínios BH1 e BH2 mostram uma atividade relacionada com a formação de canais iônicos, regulando a liberação de citocromo C pela mitocôndria (KLUCK et al., 1997; YANG et al., 1997).



Quadro 7: Proteína Bcl-2. Adaptado de: CORY e ADAMS, 2002.

**CAPÍTULO 2: PADRONIZAÇÃO DA
TRANSCRIÇÃO REVERSA – REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE
SEMIQUANTITATIVA (RT-PCR
SEMIQUANTITATIVA)**

2.1 Cultura de células

Para a padronização da extração de RNA total, foram utilizadas células de linhagem de LLA de origem murina L-1210. Para a padronização da RT-PCR, foram utilizadas células de linhagem de LMA de origem humana K562-Lucena, que expressam *abcb1* (VALERA et al., 2004); e células de linhagem de LLA de origem humana Jurkat, que expressam *abcc1* e *lrp* (HAMMOND et al., 2007). As células foram mantidas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio DMEM ou RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10 mM de tampão HEPES em pH 7.4. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Para a realização dos experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%).

2.2 Obtenção das células leucêmicas de pacientes

As amostras de sangue periférico ou medula óssea dos pacientes com diagnóstico de LMA ou LLA foram colhidas com EDTA e processadas em até 30 minutos. As amostras foram diluídas em tampão fosfato (PBS) numa proporção de 1 mL de amostra para 0,5 mL de PBS. Após diluição, a amostra foi colocada sobre 4 mL de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/m³; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e centrifugada a 300 x g por 30 minutos. A interfase com as células mononucleadas foi transferida para um tubo cônico, ressuspensa em 10 mL de tampão PBS e centrifugada a 200 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente lavadas com PBS e centrifugadas. Ao fim da última lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS e o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%).

2.3 Padronização da extração do RNA total

Para a padronização da extração de RNA total, foram utilizadas células de linhagem L-1210. Os métodos testados foram os de isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e de isotiocianato de guanidina não baseado em fenol (GERSTEIN, 2001).

A extração com isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio utilizou os seguintes reagentes: TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), clorofórmio, isopropanol, água dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), etanol 75% e solução precipitante de RNA (NaCl 1,2M:Citrato de Sódio 0,8M). Para a padronização do método, foi adicionado 1 mL de TRIzol para cada 1×10^6 de células L-1210. Após a adição do TRIzol, a amostra foi homogeneizada com a própria pipeta e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos, logo em seguida, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio e o tubo foi homogeneizado com *vortex* (Vortex Mixer, Vision Scientific Co.) por 15 segundos. A amostra foi centrifugada a 10000 x g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 250 μ L de isopropanol e 250 μ L de solução precipitante de RNA. A amostra foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, a amostra foi centrifugada a 15000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta. O sedimento restante no fundo do tubo foi lavado duas vezes com 500 μ L de etanol 75% e centrifugado novamente a 15.000 x g por 10 minutos a 4°C. Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e o sedimento foi secado. Após secagem do sedimento, foram adicionados 50 μ L de água DEPC e dissolvido em banho-maria a 56°C por 10 minutos.

A extração com isotiocianato de guanidina não baseado em fenol utilizou os seguintes reagentes: solução de isotiocianato de guanidina 5M, solução de dióxido de sílica acidificada, solução de lavagem de isotiocianato de guanidina, acetona, água dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e etanol 75%. Para a padronização do método, foi adicionado 1 mL de solução de isotiocianato de guanidina 5M para cada 1×10^6 de células L-1210. Após a adição da solução de isotiocianato de guanidina 5M, a amostra foi homogeneizada com a própria pipeta e incubada a 15°C *over night*. Após incubação, foram adicionados 50 μ L de solução de dióxido de

sílica acidificada e o tubo foi homogeneizado com *vortex* por 2 minutos. A amostra foi centrifugada a 300 x g por 1 minuto à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. À sílica, foram adicionados 500 µL de solução de lavagem de isotiocianato de guanidina e o tubo foi novamente centrifugado a 300 x g por 1 minuto à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a lavagem com solução de lavagem de isotiocianato de guanidina foi repetida mais uma vez. Logo após, a sílica foi lavada duas vezes com 500µL de etanol 75% e, após cada lavagem, centrifugada a 300 x g por 1 minuto à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada uma última lavagem com 500 µL de acetona, seguida de secagem em termobloco por 10 minutos a 56°C. Depois de seca, a sílica foi reidratada com 50 µL de água DEPC e incubada por 10 minutos a 56°C. Após incubação, o tubo foi centrifugado a 10000 x g por 5 minutos e o sobrenadante contendo o RNA total foi transferido para um tubo de 1,5 mL.

Ao término das extrações, a integridade das amostras de RNA total e a verificação de possível contaminação com DNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% (60 volts/30 minutos) corado com brometo de etídio. Foram aplicados no gel 5 µL de cada amostra e as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S foram visualizadas em transiluminador (HOEFER-MacroVue UV-20) sob luz UV de 320 nm (Figura 1). Todas as amostras foram armazenadas em freezer -70°C até posterior utilização.

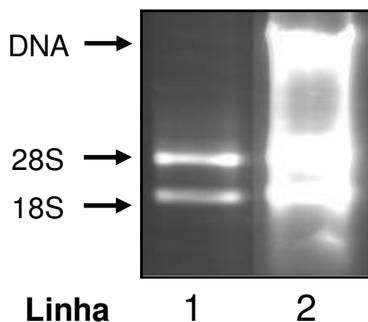


Figura 1. Géis de integridade de RNA total para a padronização da extração de RNA total. Linha 1 – RNA total extraído de 1×10^6 células L-1210 pelo método de isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio; Linha 2 – RNA total extraído de 1×10^6 células L-1210 pelo método de isotiocianato de guanidina não baseado em fenol.

Com ambas as metodologias obteve-se quantidades de RNA total suficiente. No entanto, como pode ser observado na Figura 1, linha 2, o método de isotiocianato de guanidina não baseado em fenol apresentou uma grande contaminação com DNA, além de uma grande degradação do RNA. Dessa forma, a metodologia de extração escolhida foi a de isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio, utilizando-se o reagente comercial TRIzol.

2.4 Padronização do número de células blásticas de pacientes

Para a padronização do número de células blásticas de pacientes com LA a ser utilizada na extração de RNA total com TRIzol, foram utilizadas células blásticas de pacientes com diagnóstico de LMA ou LLA, separadas por gradiente de densidade.

Foi adicionado 1 mL de TRIzol em tubos contendo entre 1×10^6 e 3×10^6 células blásticas de pacientes. A extração foi realizada conforme protocolo descrito no item 2.3. A integridade das amostras de RNA total e a possível contaminação com DNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% (60 volts/30 minutos) corado com brometo de etídio. Foram aplicados no gel 5 μ L de cada amostra e as

bandas de RNA ribossomal 28S e 18S, foram visualizadas em transluminador sob luz UV de 320 nm (Figura 2). Todas as amostras foram armazenadas em freezer -70°C até posterior utilização.

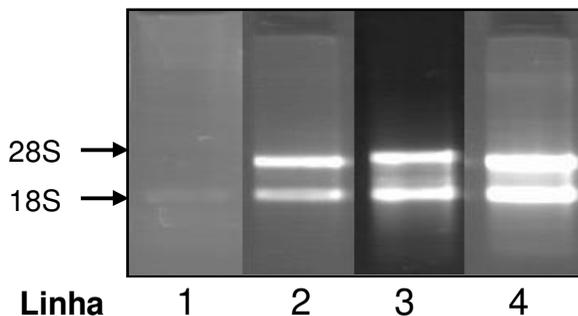


Figura 2. Géis de integridade de RNA total para a padronização do número de células blásticas. Linha 1 – RNA total extraído de 1×10^6 células blásticas de paciente com leucemia aguda; Linha 2 – RNA total extraído de 2×10^6 células blásticas de paciente com leucemia aguda; Linha 3 – RNA total extraído de $2,7 \times 10^6$ células blásticas de paciente com leucemia aguda; Linha 4 – RNA total extraído de 3×10^6 células blásticas de paciente com leucemia aguda.

A extração, feita com 1×10^6 células blásticas de paciente, obteve uma pequena quantidade de RNA total, sendo possível observar apenas uma fraca banda na altura de 28S (Figura 2, linha 1). Todas as outras quantidades de células blásticas de pacientes forneceram quantidade apreciáveis de RNA total e ausência de contaminação com DNA. Como a extração de RNA total com 3×10^6 células blásticas de paciente com LA apresentou as bandas com maior intensidade (Figura 2, linha 4), determinou-se esta como a quantidade de células blásticas a ser utilizada nos demais experimentos.

2.5 Síntese de cDNA complementar (primeira fita)

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita através da reação de transcriptase reversa utilizando-se a enzima SuperScript III

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Todos os demais reagentes também foram adquiridas da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

A quantificação e verificação da qualidade do RNA foram realizadas utilizando-se uma programação de leitura de RNA (a 260 nm e 280 nm) em um espectrofotômetro (BioPhotometer plus, Eppendorf). Para a leitura da densidade óptica, 2 μL de cada amostra foram diluídos em 98 μL de água DEPC. Para o cálculo da concentração de RNA, considerou-se que, no comprimento de onda de 260 nm, o valor de absorvância de 1 é igual a 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNA. A qualidade do RNA foi avaliada pela razão dos valores de absorvância em 260 nm e 280 nm, e foram consideradas de boa qualidade amostras com uma razão superior a 1,8 (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

O protocolo para a síntese do cDNA foi dividido em três fases. Na primeira fase, foi realizada a desnaturação na qual de 1 μg a 5 μg de RNA total foram adicionados em tubos de 200 μL e completou-se o volume para 10 μL com água DEPC. Os tubos foram colocados no termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf) utilizando-se um programa de 70°C por 5 minutos em seguida os tubos foram retirados do termociclador e incubados no gelo por 5 minutos. Para a segunda fase, foi preparada uma solução *mix* com volume suficiente para o número de amostras. Para cada amostra, foram adicionado à solução *mix* 5 μL de tampão *first strand*, 2 μL de DTT (0,1M), 2 μL de *random hexamers* (100 ng/ μL), 0,4 μL de dNTP *mix* (100 mM cada), 0,5 μL de RNaseOUT (40 U/ μL), 0,5 μL de Super Script III (200 U/ μL) e água DPEC q.s.p. para 50 μL . A cada tubo contendo o RNA total desnaturado, foi adicionado 15 μL da solução *mix*. Após a adição da solução *mix*, as amostras foram levadas ao termociclador utilizando-se um programa de 25°C por 5 minutos, então 37°C por 60 minutos, seguida de uma inativação da enzima a 90°C por 5 minutos. Após a inativação, foi realizada uma última fase de incubação no gelo por 5 minutos. Após essa fase, completou-se a síntese de cDNA e as amostras foram dosadas e armazenadas em freezer a -20°C.

2.6 Quantificação de cDNA

A quantificação de cDNA foi realizada utilizando-se uma programação de leitura de RNA (a 260 nm) em um espectrofotômetro (BioPhotometer plus, Eppendorf). Para a leitura da densidade óptica, 2

μL de cada amostra foram diluídos em 98 μL de água DEPC. Para o cálculo da concentração de cDNA, considerou-se que, no comprimento de onda de 260 nm, o valor de absorvância de 1 é igual a 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cDNA. A qualidade do cDNA foi avaliada pela razão dos valores de absorvância em 260 nm e 280 nm, e foram consideradas de boa qualidade amostras com uma razão superior a 1,8 (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

O espectrofotômetro foi zerado com água DEPC para excluir qualquer interferência da água no momento da leitura das amostras.

2.7 Padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se a Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Todos os demais reagentes também foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* (Tabela 3) utilizados para avaliar a expressão de *abcb1*, *abcc1* e *lrp* foram previamente descritos por Valera et al. (2004) e a expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizada para a normalização das bandas.

Tabela 3. Sequência dos Oligonucleotídeos Iniciadores ou *Primers*

Gene		Sequência	Tamanho do produto
<i>abcb1</i>	<i>sense</i>	5' -CCCATCATTGCAATAGCAGG-3'	157pb
	<i>antisense</i>	5' -GTTCAAACCTCTGCTCCTGAG-3'	
<i>abcc1</i>	<i>sense</i>	5' -TGGGACTGGAATGTCACG-3'	260pb
	<i>antisense</i>	5' -AGGAATATGCCCCGACTTC-3'	
<i>lrp</i>	<i>sense</i>	5' -GTCTTCGGGCCTGAGCTGGTGTGCG-3'	240pb
	<i>antisense</i>	5' -CTTGGCCGTCTCTTGGGGTCCCTT-3'	
GAPDH	<i>sense</i>	5' -CGTCTTCACCACCATGGAGAA-3'	330pb
	<i>antisense</i>	5' -GAGGCAGGGATGATGTTCTG-3'	

Para a padronização da PCR, as células de linhagem de LMA de origem humana K562-Lucena foram utilizadas como controle positivo de expressão para os pares de *primers abcb1* e GAPDH; as células de linhagem de LLA de origem humana Jurkat foram utilizadas como controle positivo de expressão para os pares de *primers abcc1* e *lrp*. As células foram cultivadas e contadas; e a partir de amostras contendo 3×10^6 células, foram realizadas a extração de RNA total e a síntese de cDNA. A temperatura de pareamento dos *primers* foi calculada pelo *BioPHP - Melting Temperature (Tm) calculation software* (insilico.ehu.es, Espanha) e as condições da reação foram ajustadas de forma que todas as temperaturas de pareamento (*melting*) ficassem abaixo de 65°C. As temperaturas de pareamento utilizadas foram as seguintes: 53°C para *abcb1*, 60°C para *abcc1*, 64°C para *lrp* e 60°C para GAPDH.

Todas as reações foram preparadas com um volume final de 50µL. As reações de PCR com os *primers* para *abcb1* e *lrp*, foram padronizadas nas seguintes condições: 1 µg de cDNA, 5 µL de tampão 10X concentrado para Taq DNA polimerase (20mM Tris-HCl, pH 8.4; 50mM KCl), 0,75 µL de MgCl₂ (50 Mm), 0,4 µL de dNTP *mix* (100 mM de cada), 1 µL de *primer sense* e *antisense* (10 mM cada), 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água ultra-pura q.s.p para 50µL. As condições das reações com os *primers* para *abcc1* e GAPDH foram iguais as dos outros *primers* com exceção da quantidade de MgCl₂, que foi de 1,5 µL (50 mM).

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, pareamento inicial nas respectivas temperaturas de pareamento de cada par de *primer* por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, 1 minuto de pareamento nas respectivas temperaturas de pareamento de cada par de *primer*, e extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto das PCRs foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% a 100 volts por 30 minutos e coradas com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas em transiluminador sob luz UV de 320 nm (Figura 3). O tamanho dos fragmentos foi estimado, por comparação, com o marcador de tamanho molecular 50pb.

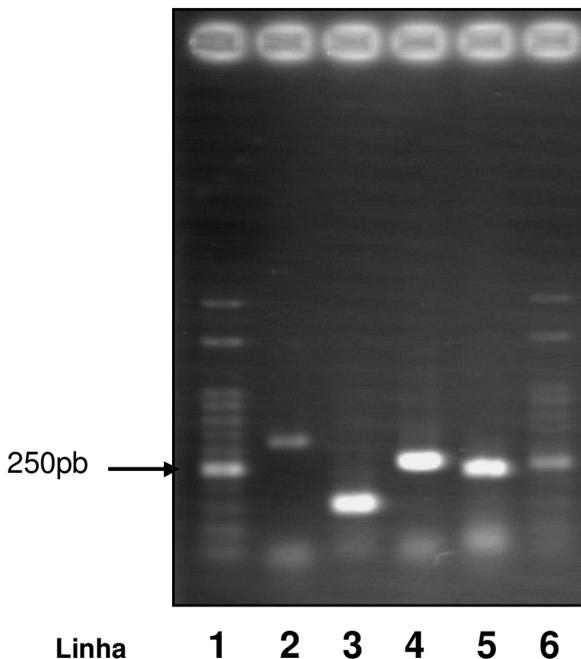


Figura 3. Gel apresentando a padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Linha 1 – Marcador de tamanho molecular 50pb; Linha 2 – Produto da PCR com os *primers* para GAPDH (330pb); Linha 3 – Produto da PCR com os *primers* para *abcbl* (157pb); Linha 4 – Produto da PCR com os *primers* para *abcc1* (260pb); Linha 5 – Produto da PCR com os *primers* para *lrp* (240pb); Linha 6 – Marcador de tamanho molecular 50pb.

2.8 Padronização do número de ciclos

Para padronização do número de ciclos, as PCRs foram realizadas conforme protocolo adotado e cada grupo de reações foi interrompida após 20, 25, 30 e 35 ciclos. Após o término dos ciclos, os produtos das PCRs foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% a 100 volts por 30 minutos e coradas com brometo de etídio. As bandas dos géis foram visualizadas em transiluminador sob luz UV de

320 nm e submetidas a um programa de análise digital (NIH *ImageJ1.40 software*, National Institute of Health *website*) no qual foi avaliada a intensidade média de cada banda (Figura 4).

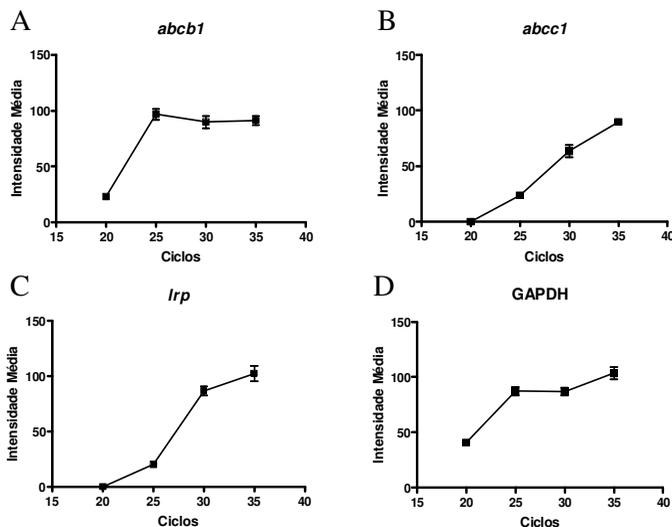


Figura 4. Representações gráficas dos resultados de intensidade média das bandas em função da variação do número de ciclos. Painel A - Intensidade média das bandas para *abcb1*. Painel B - Intensidade média das bandas para *abcc1*. Painel C - Intensidade média das bandas para *lrp*. Painel D - Intensidade média das bandas para GAPDH. Cada ponto representa a Média \pm EPM (n=3).

Dessa forma, foi possível padronizar o 25º ciclo para os *primers abcb1* e GAPDH e o 30º ciclo para os *primers abcc1* e *lrp*, pois nesses ciclos, essas reações apresentaram um aumento linear da intensidade média de suas bandas.

**CAPÍTULO 3: PERFIL DE EXPRESSÃO
DAS PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA A
MÚLTIPLAS DROGAS EM PACIENTES
RECÉM DIAGNOSTICADOS COM
LEUCEMIA AGUDA**

As LAs apresentam características clínicas, prognósticas e de resposta ao tratamento diferentes entre pacientes adultos e crianças (SCHRAPPE et al., 2000; GOKBUGET e HOELZER, 2002). Enquanto a LLA é a leucemia mais comum na infância, nos adultos ela é responsável por apenas 20% dos casos de LA. Atualmente, 60% a 80% dos adultos com LLA podem atingir remissão completa, mas apenas 30% a 40% apresentam sobrevida livre de doença de dois anos (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2005; SWERDLOW et al., 2008). Essas taxas de sobrevida contrastam com os mais de 80% de crianças com LLA que atingem remissão completa (KRAILO et al., 1993; ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2005; SWERDLOW et al., 2008). Assim como na LMA infantil, os casos de LMA em adultos são de difícil tratamento e a maioria dos pacientes recidivam e morrem após dois anos em remissão (SHIPLEY e BUTERA, 2009). O prognóstico para pacientes acima de 50 anos é ainda pior e estes podem apresentar sobrevida livre de doença de apenas 9 a 12 meses, raramente chegam a dois anos em remissão (LEITH et al., 1997; KUENDGEN e GERMING, 2009).

A resistência à quimioterapia é considerada uma das principais responsáveis pelo insucesso no tratamento das LAs (ESTEY, 2001) e representa o maior obstáculo clínico no tratamento de neoplasias hematológicas (COVELLI, 1999). A resistência à quimioterapia frequentemente resulta da superexpressão de proteínas transportadoras de membrana, como a ABCB1, ABCC1 e LRP ou de alterações na regulação da apoptose, com o envolvimento das proteínas da família Bcl-2 (KRISHNA e MAYER, 2000). Estudos têm demonstrado que essas proteínas encontram-se relacionadas com a resistência ao tratamento nas LAs, pior resposta à terapia de indução e uma redução da sobrevida livre de doença (ONG et al., 2000; SUAREZ et al., 2001; TSIMBERIDOU et al., 2002; MAHADEVAN e LIST, 2004; VALERA et al., 2004; KOURTI et al., 2007; LOURENCO et al., 2008; CORTEZ et al., 2009). No entanto, outros estudos não encontraram esse impacto adverso da expressão dessas proteínas nas LAs (DEN BOER et al., 1998; KAKIHARA et al., 1999). Apesar do grande número de trabalhos até agora publicados, a importância clínica das proteínas de resistência a múltiplas drogas em pacientes com LA ainda não está esclarecida e os resultados permanecem controversos.

Acredita-se que possam existir diferenças celulares intrínsecas entre as células blásticas dos adultos e das crianças, o que poderiam explicar os diferentes perfis de sensibilidade a fármacos e prognósticos (STYCZYNSKI et al., 2000). Considerando as peculiaridades entre as

LAs em adultos e crianças, dividimos o presente estudo em duas vertentes. Um trabalho avaliou a importância da ABCB1, ABCC1, LRP e Bcl-2 no diagnóstico e prognóstico das LAs pediátricas e outro em adultos.

**Publicação: *Importance of abcb1 gene expression
in Newly Diagnosed Adult Acute Leukemia***
Submetido à *Annals of Hematology*

Importance of *abcb1* gene expression in Newly Diagnosed Adult Acute Leukemia

Ana Carolina Rabello de Moraes, Marley Aparecida Licínio, Susie Coutinho Liedke, Joanita Ângela Gonzaga Del Moral, Maria Luiza Bazzo, Maria Cláudia Santos da Silva*

Ana Carolina Rabello de Moraes: Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, SC, Brasil.

Marley Aparecida Licínio: Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, SC, Brasil.

Susie Coutinho Liedke: Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, SC, Brasil.

Joanita Ângela Gonzaga Del Moral: Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, SC, Brasil.

Maria Luiza Bazzo: Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, SC, Brasil.

Maria Cláudia Santos da Silva (*Corresponding Author): Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Campus Trindade, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP: 88040-900, Florianópolis – SC, Brasil. Tel.: +55 48 37218146. Fax: +55 48 37219542. E-mail: maclau@ccs.ufsc.br

Abstract

Clinical resistance to chemotherapy in acute leukemia (AL) is often associated with the overexpression of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins or alterations in the expression of members of the bcl-2 family. The aim of the present study was to assess the expression profile of MDR-related proteins ABCB1, ABCC1, LRP, and Bcl-2 in terms of clinical and biological variation in adults with acute leukemia. The levels of MDR gene mRNA expression at diagnosis were analyzed by semi-quantitative PCR and the expression levels of MDR proteins were analyzed by flow cytometry using the mean values as cutoff points in consecutive samples from 29 adults with AL. All proteins studied presented wide variability of expression. ABCB1 and ABCC1 gene expression and protein expression showed no significant correlation. Higher expression levels of the *abcb1* gene were associated with older age ($P = 0.003$) and lower levels of LDH ($P = 0.02$). The present data suggest that an *abcb1* gene overexpression can be associated with a poor prognostic and that the method of choice to evaluate chemotherapy resistance-related proteins is a major variable, which difficult the use of these proteins as reliable markers for clinical MDR.

Keywords: Adult AML. Adult ALL. Multidrug resistance. Antiapoptotic proteins.

Introduction

Clinical resistance to chemotherapy in acute myeloid and lymphoid leukemia (AML and ALL) is often associated with the overexpression of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins [1,2]. Such overexpression leads to lower intracellular drug accumulation and hence reduce cellular toxicity of chemotherapeutic agents [1]. The permeability glycoprotein (ABCB1/Pgp/MDR1) is a well characterized efflux pump of several first-line drugs used in leukemia chemotherapy, such as vinca alkaloids, anthracyclines, and epipodophyllotoxins [1,3]. At the cellular level, the function of ABCB1 has been extensively researched in many types of cancer cells [4,5]. In leukemia patients, cellular drug resistance profiles determined in vitro at the time of presentation showed a strong correlation with the outcome [2,6]. ABCB1 activity and expression represent independent risk factors for treatment failure in acute myeloid leukemia [7] and has been associated with lower complete remission (CR) rates and, in some studies, shorter overall survival for patients treated with standard therapeutic regimens [6,8]. However, other reports found no such correlations [7,9]. Multidrug Resistance-Related Protein (ABCC1/MRP1) was subsequently identified in cell lines displaying a typical MDR phenotype without elevated ABCB1 levels [4]. Several studies have shown that ABCC1 and ABCB1 expression confers in vitro resistance to a wide range of anticancer drugs, including methotrexate [3]. However, the role of ABCC1 in inducing the MDR phenotype in cancer patients is still controversial and its expression at diagnosis was usually not correlated with the outcome in patients with leukemia [6,7,9], although ABCC1 gene expression has been reportedly correlated with clinical response and survival in leukemia cases [2]. Thus, the role of ABCC1 in determining the prognosis for patients with leukemia remains to be understood [4]. Another protein associated with an MDR phenotype that does not belong to the ABC protein family is the lung resistance protein (LRP). It is a human major vault protein (MVP) whose overexpression is correlated with intrinsic resistance to doxorubicin, vincristine, mitoxantrone, etoposide, and platinum compounds [10]. While the exact cellular function of MVP remains to be elucidated, its expression closely reflects the chemoresistance profile of many tumor cell lines and untreated cancers [10,11]. LRP gene expression at diagnosis appeared to be associated with resistance to induction chemotherapy in acute leukemia patients and was strongly

related to poorer event-free survival [12,13]. However, other studies did not detect an adverse impact from LRP expression upon diagnosis [9,14]. Although MDR phenotype is often associated with the efflux of chemotherapeutic agents mediated by membrane transporter proteins, the overexpression of genes encoding anti-apoptotic proteins is also known to promote the survival of leukemic cells by inhibition of apoptotic mechanisms and therefore to therapeutic failure [15]. It has been suggested that the expression of members of the bcl-2 family is involved in the cellular mechanisms contributing to chemotherapeutic resistance in AML [16,17]. Experiments with normal lymphocytes and lymphomas have demonstrated that Bcl-2 overexpression inhibits radiation- and anti-cancer drug-induced apoptosis in short-term assays and promotes long-term survival and continued clonogenic growth [18]. In several studies, high Bcl-2 expression levels correlated with a poor response to chemotherapy and reduced overall survival in AML [19,20]. Despite the overwhelming evidence that drug transporters and anti-apoptotic proteins can confer resistance to a variety of chemotherapy agents in tumor cells in vitro, attempts to use their expression as definitive biomarkers for the identification of drug resistant tumors have achieved mixed success [3]. The aim of the present study was to simultaneously analyze the expression of genes and proteins related to multidrug resistance (ABCB1, ABCC1, and LRP) and apoptosis (Bcl-2) in the blast cells of 29 patients with acute leukemia at diagnosis, and evaluate whether any correlation exists between the expression of these proteins and established prognostic factors.

Patients and methods

Patients and leukemic cells

A total of 29 consecutive patients (16 males and 13 females; median age of 44 years, ranging from 15 to 84 years old) diagnosed with either AML (n=19) or ALL (n=10) were included in the present study. The diagnosis was made by standard morphological analysis and by flow cytometry immunophenotyping. The distribution of patients according to the WHO [21] criteria was as follows: acute promyelocytic leukaemia with t(15;17), 6 cases; AML with minimal differentiation, 1 case; AML without maturation, 1 case; AML with maturation, 5 cases; acute myelomonocytic leukaemia, 1 case; erythroleukemia, 1 case; AML secondary to a myelodysplastic syndrome, 3 cases; AML

secondary to a myeloproliferative neoplasia, 1 case; B-derived ALL, 7 cases, and T-derived ALL, 3 cases. Unfavorable events occurred in 17 patients (59%). Of these, 2 relapsed and 15 died during induction or in clinical remission. In these patients all deaths were associated with treatment complications.

Bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) samples were obtained at diagnosis and before treatment. In all cases, BM or PB samples were collected in EDTA anticoagulant after informed consent was given according to the local Ethics Committee (CEPSH-UFSC/n°238/03) and analyzed as described below. Leukemic cells were isolated by density gradient centrifugation in Ficoll-Hypaque (density 1.077 g/m³; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

All RT-PCR reagents were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Total RNA was isolated using the TRIzol™ Reagent following instructions by the manufacturer. RNA samples were analyzed for RNA integrity by gel electrophoresis. The reverse transcription reaction was performed using 5 µg of total RNA and up to 10 µL of DEPC treated water (0.1% v/v). The mixture was heated for 5 min at 70 °C and quick chilled in ice for 5 min, then 5 µL of first strand buffer, 2 µL of DTT Molecular Grade (0.1 M), 2 µL of random hexamers (100 ng/µL), 0.4 µL of dNTP mix (100 mM each), 0.5 µL of RNaseOUT (40 U/µL), and 0.5 µL of SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/µL) were added to it. The mixture was incubated at 25 °C for 5 min, then heated for 60 min at 37 °C and the reaction was inactivated at 90 °C for 5 min. The cDNAs were stored at -20 °C until the PCR reaction was done. The expression of *abcb1*, *abcc1*, and *lrp* gene was then assessed by RT-PCR in 50 µL volume reaction, containing 1 µg of cDNA, 5 µL of 10X PCR buffer, 0.4 µL of dNTPmix (100 mM each), 1 µL of sense and antisense primers (10 mM each), 0.4 µL of Taq DNA Polymerase (5 U/µl), and 1.5 µL of MgCl₂ (50 mM) for *GAPDH* and *abcc1* or 0.75 µL for *abcb1* and *lrp*. *GAPDH* gene expression served as an endogenous control. Primer sequences, annealing temperatures, and thermal cycles were previously described elsewhere [13]. All RT-PCR reactions were performed in duplicate. The PCR products were visualized on 2% agarose gel with ethidium bromide staining and analyzed densitometrically with NIH ImageJ1.40 software.

The intensity of the bands was quantified under ultraviolet light and normalized according to those for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA.

Detection of ABCB1, ABCC1, and Bcl-2 expression and flow cytometry analysis

Erythrocyte-lysed, freshly obtained BM or PB samples (approximately 1×10^6 cells in 100 μL /test) were analyzed using a three-color direct immunofluorescence technique. The following combinations of monoclonal antibodies (MoAb) were used (FITC, PE, PerCP): --/CD34/CD45; ABCB1/CD34/CD45; ABCC1/CD34/CD45; Bcl-2/CD34/CD45. Each of these 3-color combinations allowed the specific identification of the whole CD34 cell population present in the BM and PB samples analyzed.

Multidrug resistance and apoptosis-related proteins were analyzed with the following MoAb reagents for the detection of intracellular proteins: anti-ABCB1-FITC (clone 17F9; BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA), anti-ABCC1-FITC (clone QCRL-3; BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA), anti-LRP (clone LRP-56; Millipore™, Molsheim, France), and anti-Bcl-2-FITC (clone 100; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). MoAbs directed against surface antigens used for the identification of blast cells, and their discrimination from normal residual cells included CD34-PE and CD45-PerCP from BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

For surface staining, 100 μL of sample per tube were incubated for 15 min with the appropriate combination of MoAb at room temperature (RT) in the dark. Once this incubation period was finished, 1 mL of FACS lysing solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) diluted 1:10 (vol/vol) in distilled water was added in order to lyse erythrocytes. After another 10 min incubation period in the dark (RT), cells were centrifuged (5 min at 540 x g) and the cell pellet washed with 1 mL of PBS. Finally, cells were resuspended in 1 mL of PBS until analysis by flow cytometry. Intracellular detection of ABCB1, ABCC1, and Bcl-2 proteins was performed after staining for surface proteins using a direct immunofluorescence technique. For that the BD Cytotfix/Cytoperm™ kit (San Diego, CA, USA) was used, strictly following manufacturer recommendations. After staining for cytoplasmic antigens, cells were washed and resuspended in 1 mL of PBS until analysis by flow cytometry. Appropriate isotype-matched

negative controls were used for each of the techniques described above. In all cases, data acquisition was performed in a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson), using the CellQuest software (Becton Dickinson). A total of 10,000 PB events were acquired for each 3-color staining. The Infinicyt software program (Cytognos, Salamanca, Spain) was used for data analysis. For each individual apoptosis and MDR-associated marker, antigen expression was analyzed and reported as its relative fluorescence intensity (RFI), calculated as the ratio between the mean fluorescence intensity (MFI) of the tested cells for the corresponding protein and MFI of corresponding controls. For all proteins, the control was based on the MFI of the corresponding blast cell in the isotype-matched negative control tube.

Statistical analysis

To analyze a possible correlation between the relative expression of multidrug resistance proteins and factors such as patient age, white blood cell (WBC) count at diagnosis, immunophenotype, percentage of CD34⁺ blasts, CD34 expression, and lactate dehydrogenase (LDH), patients were divided into two groups using the mean value of the relative expression of the respective genes and proteins as cutoff between low and high expression.

The correlation between the expression values of the genes and proteins studied and between the variables analyzed was determined by the Spearman correlation coefficient. The association between the variables analyzed and protein expression levels was evaluated using the Chi-square test. The level of significance was set to $P \leq 0.05$ for all analyses.

Results

All proteins studied by RT-PCR and flow cytometry presented wide variability of relative expression (Table 1). High gene expression of *abcb1*, *abcc1*, and *lrp* was found in 11 patients (46%), 17 patients (71%) and 16 patients (67%), respectively (n=24). High protein expression of ABCB1, ABCC1, and Bcl-2 was found in 4 patients (22%), 8 patients (44%), and 6 patients (33%), respectively (n=18). High coexpression of *abcb1* and *lrp* genes was found in 1 patient (4%), and a high coexpression of *abcc1* and *lrp* was found in 8 patients (33%). One patient displayed high coexpression of ABCB1 and Bcl-2 (6%), and

another patient presented a high coexpression of ABCC1 and Bcl-2 (6%). High coexpression of the three MDR genes was present in 6 patients (25%), while 3 patients presented a high expression of ABCB1, ABCC1, and Bcl-2 proteins. No one displayed high expression of all genes and proteins studied simultaneously.

Table 1. Mean \pm Standard Deviation (SD) and Range of Relative Expression Values for the Different Drug Resistance Proteins Evaluated by Semi-Quantitative RT-PCR and Flow Cytometry in Acute Leukemias

Method	Protein	Mean \pm SD (range)
RT-PCR	<i>abcb1</i>	0.38 \pm 0.46 (0.00 – 1.32)
	<i>abcc1</i>	0.68 \pm 0.38 (0.00 – 1.09)
	<i>lrp</i>	0.53 \pm 0.40 (0.00 – 1.12)
Flow cytometry	ABCB1	20.17 \pm 8.06 (1.34 – 116.15)
	ABCC1	1.57 \pm 0.16 (0.61 – 3.02)
	Bcl-2	57.90 \pm 16.82 (1.79 – 246.27)

Analysis of relative gene expression and relative protein expression displayed no significant correlation between the two methods of ABCB1 and ABCC1 detection ($P > 0.05$). Significant positive correlations in multidrug resistance genes and protein expression were found between *abcc1* and *lrp* gene expression ($P = 0.009$), ABCB1 and ABCC1 protein expression ($P = 0.048$), ABCB1 and Bcl-2 protein expression ($P = 0.010$) and ABCC1 and Bcl-2 protein expression ($P = 0.007$). The Chi-square test failed to demonstrate any association in the relative expression of proteins.

The analysis of a possible correlation between the relative expression of multidrug resistance proteins and age, white blood cells (WBC) count at diagnosis, immunophenotype, percentage of CD34⁺ blasts, and LDH showed that only *abcb1* gene expression displayed some significant correlation (Table 2). A higher expression of *abcb1* gene was observed in patients over 50 years old with AML and in patients over 60 years old with ALL ($P = 0.003$). A higher expression of *abcb1* gene was also found in patients with low levels of LDH ($P = 0.02$).

Nine of the 17 patients that died or relapsed during induction or while in clinical remission superexpressed *abcb1* gene. Of these 9

patients, 2 coexpressed *lrp* gene with the *abcb1* gene, and 3 patients coexpressed *abcc1* and *lrp* genes with the *abcb1* gene.

Table 2. Level of Significance for the Expression of the Different Drug Resistance Genes and Proteins and Clinical Features of Acute Leukemia

	<i>abcb1</i>	<i>abcc1</i>	<i>lrp</i>	ABCB1	ABCC1	Bcl-2
Age						
Poor prognosis	0.003*	0.204	1.000	0.883	0.805	0.436
Good prognosis	(N=24)	(N=24)	(N=24)	(N=18)	(N=18)	(N=18)
WBC count at diagnosis						
High count	0.351	0.140	1.000	0.388	0.680	0.514
Low count	(N=24)	(N=24)	(N=24)	(N=18)	(N=18)	(N=18)
Immunophenotype						
AML	0.286	0.968	0.214	0.891	0.819	0.718
ALL	(N=24)	(N=24)	(N=24)	(N=18)	(N=18)	(N=18)
Percentage of CD34⁺ Blast						
	0.139	0.755	0.073	0.794	0.165	0.637
	(N=21)	(N=21)	(N=21)	(N=15)	(N=15)	(N=15)
CD34 Expression						
	0.812	0.599	0.900	1.000	0.429	0.421
	(N=21)	(N=21)	(N=21)	(N=15)	(N=15)	(N=15)
LDH						
	0.020*	0.062	0.755	0.651	0.441	0.688
	(N=21)	(N=21)	(N=21)	(N=17)	(N=17)	(N=17)

Age: Poor prognosis is ≥ 50 years of age for AML and ≥ 60 years of age for ALL, Good prognosis < 50 years of age for AML and < 60 years of age for ALL; WBC at diagnosis: High count is $\geq 20,000/\text{mm}^3$ for AML and $\geq 10,000/\text{mm}^3$ for ALL; Low count is $< 20,000/\text{mm}^3$ for AML and $< 10,000/\text{mm}^3$ for ALL. P- value is calculated using the Spearman correlation test. *Significant.

Discussion

Clinical resistance to chemotherapy results from the interaction of numerous biological variables. The MDR phenotype mediated by the overexpression of genes encoding efflux proteins and the overexpression

of certain anti-apoptotic proteins contributes to chemotherapy failure in acute leukemia [2,19]. In this study, we evaluated the gene and protein expression of four chemotherapy resistance related proteins, namely ABCB1, ABCC1, LRP, and Bcl-2 in the leukemic blast cells of 29 adult patients with acute leukemia at the onset of disease and correlated this data to their biological and clinical features. Gene expression was evaluated by semi-quantitative RT-PCR and the results were expressed as a relation between MDR gene and GAPDH expression. Protein expression was evaluated by flow cytometry using specific monoclonal antibodies, and the results were expressed according to relative fluorescence intensity (RFI). The mean value of the relative expression of the genes and proteins was used as cutoff between low and high expression.

Our results found highly variable levels of chemotherapy resistance-related proteins, suggesting that there is no specific pattern for the expression of these proteins in acute leukemia [2,13,19,20]. Despite evaluating the expression of ABCB1 and ABCC1 using two different methodologies, semi-quantitative RT-PCR and flow cytometry, the percentage of patients overexpressing these proteins in our study is within the range found in previous studies [5,12,22-24]. However, the percentage of patients with *abcb1* and *abcc1* gene overexpression was almost two times higher than the percentage of patients overexpressing ABCB1 and ABCC1 proteins. Unlike ABCB1 and ABCC1 proteins, the *lrp* and Bcl-2 overexpression values disagree with the literature. While previous studies found values of *lrp* superexpression that reached 18% to 46%, our results showed an overexpression of 67% [12,22,23]. Regarding the Bcl-2 protein, our results showed an overexpression in 33% of cases, while higher values ranging from 43% to 61% can be found in the literature [19,20]. These differences with the literature may be partially explained by differences in the methods employed, differences in the positivity cutoff values used, and demographic variations.

Our data also display a positive correlation between *abcc1* and *lrp*, in addition to a high coexpression of these genes in 33% of patients. In support of our findings, other studies with cell lines [25] and patients [26,27] also found simultaneous overexpression of these two proteins. The positive correlation between *abcc1* and *lrp* expression can be partially explained by the fact that both the *abcc1* and *lrp* genes are closely positioned on chromosome 16 [28], so it could be suggested that *lrp* activation/amplification could be secondary to *abcc1* activation. In

addition to the correlation between *abcc1* and *lrp* genes, other significant correlations between the studied proteins were demonstrated, suggesting that these proteins presented a joint activation in acute leukemia. However, the mechanisms that underlie the other simultaneous expression of ABC transporters, LRP, and Bcl-2 are still unclear.

Over the past few years, several publications have evaluated the expression of these resistance proteins using different approaches, methodologies, and cutoffs between low and high expression [1,2,6,17,22-24,26]. Therefore, many studies that correlate the expression levels of chemotherapy resistance-related proteins and biological and clinical variables were contradictory. While some studies found a significant correlation between high expression of chemotherapy resistance-related proteins and variables such as age, immunophenotype [24], WBC count at diagnosis [2], CD34 expression [2,24], event-free survival [1], and response to therapy induction [29], these same studies fail to find other correlations already reported by other studies [6,26]. In the present study, *abcb1* gene overexpression was only significantly associated with an advanced age, and low LDH levels, and a great number of patients that died or relapsed showed a *abcb1* gene superexpression, while no relationship was found between ABCB1 protein expression and these biological and clinical features. The most well-characterized therapeutic resistance mechanism in acute leukemia is the one mediated by ABCB1 protein. In a study using RT-PCR to evaluate *abcb1* overexpression, van den Heuvel-Eibrink et al. [2] found a positive association between *abcb1* gene expression and CD34 expression, but failed to establish a correlation between this protein and age. However, Samdani et al. [24] did find an association between ABCB1 protein and age, CD34 expression, AML type, and cytogenetic pattern when evaluating ABCB1 expression by flow cytometry. In another study using a similar flow cytometry methodology but with a different method of determining the cutoff for overexpression, Michieli et al. [23] failed to find any association between ABCB1 protein and age, WBC count and CD34 expression. These, as well as our findings, confirm that the method of choice to evaluate chemotherapy resistance-related proteins is a major variable that affects the results of the analysis, which difficult the use of these proteins as reliable markers for clinical MDR.

In conclusion, these results suggest that an *abcb1* gene overexpression can be associated with a poor prognostic. Also a better understanding of resistance mechanisms and a standardization of

approaches to detect these chemotherapy resistance-related proteins in clinical specimens are necessary to determine the number of ABCB1, ABCC1, LRP, and Bcl-2 molecules needed to confer resistance to the tumor cell.

Acknowledgements

This research was supported by grants and fellowships from Fundação de Apoio à Pesquisa e Tecnologia do Estado de Santa Catarina-FAPESC, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (Brazil). This work is part of the master's thesis of A.C.R. Moraes, who is a graduate student in Pharmacy.

References

1. Campos, L., Guyotat, D., Archimbaud, E., Calmard-Oriol, P., Tsuruo, T., Troncy, J. et al (1992) Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood*;79(2):473-6.
2. Cortez, M.A., Scrideli, C.A., Yunes, J.A., Valera, E.T., Toledo, S.R., Pavoni-Ferreira, P.C. et al (2009) mRNA expression profile of multidrug resistance genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Low expression levels associated with a higher risk of toxic death. *Pediatr Blood Cancer*;53(6):996-1004. DOI 10.1002/pbc.22220
3. Damiani, D., Michelutti, A., Michieli, M., Masolini, P., Stocchi, R., Geromin, A. et al (2002) P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein in de novo adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*;116(3):519-27.
4. Den Boer, M.L., Pieters, R., Kazemier, K.M., Rottier, M.M., Zwaan, C.M., Kaspers, G.J. et al (1998) Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia. *Blood*;91(6):2092-2098.
5. Goellner, S., Steinbach, D., Schenk, T., Gruhn, B., Zintl, F., Ramsay, E. et al (2006) Childhood acute myelogenous leukaemia: association between PRAME, apoptosis- and MDR-

- related gene expression. *Eur J Cancer*;42(16):2807-14. doi:10.1016/j.ejca.2006.06.018
6. Hembruff, S.L., Laberge, M.L., Villeneuve, D.J., Guo, B., Veitch, Z., Cecchetto, M. et al (2008) Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance. *BMC Cancer*;8:318. doi:10.1186/1471-2407-8-318
 7. Hirose, M. (2009) The process behind the expression of mdr-1/P-gp and mrp/MRP in human leukemia/lymphoma. *Anticancer Res*;29(4):1073-7.
 8. Huh, H.J., Park, C.J., Jang, S., Seo, E.J., Chi, H.S., Lee, J.H. et al (2006) Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) mRNA expression in acute leukemia. *J Korean Med Sci*;21(2):253-8. doi: 10.3346/jkms.2006.21.2.253
 9. Izquierdo, M.A., Shoemaker, R.H., Flens, M.J., Scheffer, G.L., Wu, L., Prather, T.R. et al (1996) Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer-cell lines. *Int J Cancer*;65(2):230-7.
 10. Kakihara, T., Tanaka, A., Watanabe, A., Yamamoto, K., Kanto, K., Kataoka, S. et al (1999) Expression of multidrug resistance-related genes does not contribute to risk factors in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int*;41(6):641-7. doi: 10.1046/j.1442-200X.1999.t01-1-01144.x
 11. Karakas, T., Maurer, U., Weidmann, E., Miething, C.C., Hoelzer, D. and Bergmann, L. (1998) High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Ann Oncol*;9(2):159-65.
 12. Kourti, M., Vavatsi, N., Gombakis, N., Sidi, V., Tzimagiorgis, G., Papageorgiou, T. et al (2007) Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*;86(2):166-73. doi: 10.1532/IJH97.E0624
 13. Lauria, F., Raspadori, D., Rondelli, D., Ventura, M.A., Fiacchini, M., Visani, G. et al (1997) High bcl-2 expression in acute myeloid leukemia cells correlates with CD34 positivity and complete remission rate. *Leukemia*;11(12):2075-8.
 14. Leith, C.P., Kopecky, K.J., Chen, I.M., Eijdem, L., Slovak, M.L., McConnell, T.S. et al (1999) Frequency and clinical

- significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*;94(3):1086-99.
15. List, A.F., Spier, C.S., Grogan, T.M., Johnson, C., Roe, D.J., Greer, J.P. et al (1996) Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*;87(6):2464-9.
 16. Mahjoubi, F., Ghalipour, M., Ghavamzadeh, A. and Alimoghaddam, K. (2008) Expression of MRP1 gene in acute leukemia. *Sao Paulo Med J*;126(3):172-9. doi: 10.1590/S1516-31802008000300007
 17. Michieli, M., Damiani, D., Ermacora, A., Masolini, P., Raspadori, D., Visani, G. et al (1999) P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance associated protein in de novo acute non-lymphocytic leukaemias: biological and clinical implications. *Br J Haematol*;104(2):328-35. doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01172.x
 18. Ong, Y.L., McMullin, M.F., Bailie, K.E., Lappin, T.R., Jones, F.G. and Irvine, A.E. (2000) High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*;111(1):182-9. doi: 10.1111/j.1365-2141.2000.02315.x
 19. Samdani, A., Vijapurkar, U., Grimm, M.A., Spier, C.S., Grogan, T.M., Glinsmann-Gibson, B.J. et al (1996) Cytogenetics and P-glycoprotein (PGP) are independent predictors of treatment outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Leuk Res*;20(2):175-80. doi:10.1016/0145-2126(95)00134-4
 20. Sauerbrey, A., Voigt, A., Wittig, S., Hafer, R. and Zintl, F. (2002) Messenger RNA analysis of the multidrug resistance related protein (MRP1) and the lung resistance protein (LRP) in de novo and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*;43(4):875-9. doi: 10.1080/10428190290017024
 21. Scheper, R.J., Broxterman, H.J., Scheffer, G.L., Kaaijk, P., Dalton, W.S., Van Heijningen, T.H. et al (1993) Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res*;53(7):1475-9.

22. Schmitt, C.A., Rosenthal, C.T. and Lowe, S.W. (2000) Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nat Med*;6(9):1029-35. doi:10.1038/79542
23. Slovak, M.L., Ho, J.P., Bhardwaj, G., Kurz, E.U., Deeley, R.G. and Cole, S.P. (1993) Localization of a novel multidrug resistance-associated gene in the HT1080/DR4 and H69AR human tumor cell lines. *Cancer Res*;53(14):3221-5.
24. Slovak, M.L., Ho, J.P., Cole, S.P., Deeley, R.G., Greenberger, L., De Vries, E.G. et al (1995) The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. *Cancer Res*;55(19):4214-9.
25. Suarez, L., Vidriales, B., Garcia-Larana, J., Lopez, A., Martinez, R., Martin-Reina, V. et al (2001) Multiparametric analysis of apoptotic and multi-drug resistance phenotypes according to the blast cell maturation stage in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*;86(12):1287-95.
26. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H. et al (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4 ed., Geneva: WHO Press.
27. Tsimberidou, A.M., Paterakis, G., Androutsos, G., Anagnostopoulos, N., Galanopoulos, A., Kalmantis, T. et al (2002) Evaluation of the clinical relevance of the expression and function of P-glycoprotein, multidrug resistance protein and lung resistance protein in patients with primary acute myelogenous leukemia. *Leuk Res*;26(2):143-54. doi: 10.1016/S0145-2126(01)00106-0
28. Valera, E.T., Scrideli, C.A., Queiroz, R.G., Mori, B.M. and Tone, L.G. (2004) Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J*;122(4):166-71. doi: 10.1590/S1516-31802004000400007
29. Van Den Heuvel-Eibrink, M.M., Van Der Holt, B., Burnett, A.K., Knauf, W.U., Fey, M.F., Verhoef, G.E. et al (2007) CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia

(AML) of older age. *Ann Hematol*;86(5):329-37. doi:
10.1007/s00277-007-0269-7

Publicação: *Expression of Resistance Proteins in
Newly Diagnosed Childhood Acute Leukemia*
Submetido à **Pediatric Blood & Cancer**

Expression of Resistance Proteins in Newly Diagnosed Childhood Acute Leukemia

Ana Carolina Rabello de Moraes¹, Júlio Araújo Zampirolo², Marley Aparecida Licínio¹, Marcos José Machado, PhD¹, Maria Luiza Bazzo, PhD¹, Maria Cláudia Santos da Silva, PhD*¹

¹Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

²Hospital Infantil Joana de Gusmão, Agronômica, CEP 88025-301, Florianópolis, SC, Brasil.

*Corresponding Author:

Maria Cláudia Santos da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Análises Clínicas
Campus Trindade
CEP: 88040-900, Florianópolis – SC, Brasil
Tel.: +55 48 37218146
Fax: +55 48 37219542
E-mail: maclau@ccs.ufsc.br

Abstract word count: 223

Text word count: 3,978

Number of tables: 2

Short running title: Resistance Proteins in Childhood Leukemia

Keywords: Pediatric AML; Pediatric ALL; Multidrug resistance.

ABSTRACT

Background. Leukemias are the most frequent childhood cancers comprising about 28–30% of all cancer cases under the age of 18. Multidrug resistance is one of the main causes of treatment failure. Clinical resistance to chemotherapy results from the interaction of numerous biological variables, such as multidrug resistance (ABCB1, ABCC1, and LRP) and anti-apoptotic proteins (Bcl-2). The aim of the present study was to assess the expression profile of the MDR related proteins ABCB1, ABCC1, LRP, and Bcl-2 in terms of clinical and biological variation in adults with acute leukemia. **Procedure.** The levels of mRNA expression from MDR genes were analyzed by semi-quantitative PCR and the level of MDR proteins expression was analyzed by flow cytometry using the mean values as cutoff points in consecutive samples from 17 children with AL at diagnosis. **Results.** All proteins studied presented wide variability of expression. No significant correlations in multidrug resistance genes and proteins expression were found. Expression levels of the *abcc1* gene were associated with higher CD34 expression ($P = 0.046$). Expression of the LRP protein was observed in children over nine years old ($P = 0.046$) and ABCB1 protein expression was correlated with high WBC counts ($P = 0.02$). **Conclusion.** Our findings demonstrate that ABCB1, ABCC1, and LRP correlate with different prognostic factors and that this correlation is greatly influenced by the detection method.

INTRODUCTION

Leukemias are the most frequent childhood cancers comprising about 28-30% of all cancer cases under the age of 18 [1]. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is diagnosed in 80% and acute myeloid leukemia (AML) in 15% of all leukemias [2, 3]. Current cure rates reach 70-80% long-term survival in ALL and 40-60% in AML, which means that despite significant progress in the cure rate of childhood acute leukemia, approximately 25% of children with ALL and about 50% of children with AML still suffer relapses [1, 4, 5]. Multidrug resistance (MDR), the principal mechanism by which many cancers develop resistance to chemotherapy drugs is a major factor in the failure of many forms of chemotherapy. One of the mechanisms related to the MDR phenotype involves overexpression of energy-dependent efflux pumps or ABC transporters (ATP-binding cassette) [6, 7]. The members of the ABC superfamily are associated with a broad spectrum of physiological functions including detoxification of chemical compounds, defense against xenobiotics, and oxidative reactions [8]. Overexpression of ABC transporters leads to lower intracellular drug accumulation, reducing the cellular toxicity of chemotherapy drugs [6]. Recent studies have revealed that at least 12 ABC transporters of four subfamilies play a role in the MDR of neoplastic cells maintained in culture [9]. Among them, ABCB1 (MDR1, P-gp) and ABCC1 (MRP1) have been extensively related to drug resistance in acute leukemias [7, 10, 11]. Another protein associated with an MDR phenotype that does not belong to the ABC protein family is the lung resistance protein (LRP). LRP gene expression at diagnosis appeared to be associated with resistance to induction chemotherapy in acute leukemia patients and was strongly related to poorer event-free survival [11]. However, some studies did not detect an adverse impact related to ABCB1, ABCC1, and LRP expression upon diagnosis [12, 13]. Although MDR phenotype is often connected with efflux of chemotherapy agents mediated by membrane transporter proteins [14], the overexpression of genes encoding anti-apoptotic proteins is also known to lead to the survival of leukemic cells by inhibition of apoptotic mechanisms, and therefore to therapeutic failure [14, 15]. It has been suggested that the expression of members of the bcl-2 family are involved in cellular mechanisms contributing to chemotherapeutic resistance in AML [16, 17]. However, despite the large number of articles published to date, the clinical importance of drug resistance genes has not been elucidated and the results obtained are controversial [6, 10]. In order to contribute to a better understanding

of the mechanisms related to MDR in childhood leukemia, the aim of the present study was to simultaneously explore the expression of proteins related to apoptosis (bcl-2) and multidrug resistance (ABCB1, ABCC1, and LRP) in blast cells from 17 children with acute leukemia at diagnosis, and evaluate whether any correlation exists between the expression of these proteins and established prognostic factors.

PATIENTS AND METHODS

Patients and leukemic cells

A total of 17 consecutive patients (10 males and 7 females; median age of 6.6 years, ranging from 1 to 14 years old) diagnosed with either AML (n=4) or ALL (n=13) were included in the present study. The diagnosis was made by standard morphological analysis and by flow cytometry immunophenotyping. Distribution of patients according to the WHO [18] criteria was as follows: acute promyelocytic leukemia with t(15;17), 2 cases; AML without maturation, 1 case; AML with maturation, 1 case; B-derived ALL, 12 cases; and T-derived ALL, 1 case. Unfavorable events occurred in 7 patients. Seven patients (41%) died during induction phase of treatment or in clinical remission. In these patients all deaths were associated with treatment complications. None patient relapsed.

Peripheral blood (PB) samples were obtained at diagnosis and before treatment. In all cases, PB samples were collected in EDTA anticoagulant and analyzed as described below after informed consent was given according to the local Ethics Committee (CESH-HIJG/n°075/2008). Leukemic cells were isolated by density gradient centrifugation in Ficoll-Hypaque (density 1.077 g/m³; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

All RT-PCR reagents were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Total RNA was isolated using the TRIzolTM Reagent following instructions from the manufacturer. RNA samples were analyzed for RNA integrity by gel electrophoresis. The reverse transcription reaction was performed using 5 µg of total RNA and up to 10 µL DEPC treated water (0.1% v/v). The mixture was heated for 5 min at 70°C and quickly chilled in ice for 5 min. To the mixture were

added 5 μL of first strand buffer, 2 μL of DTT Molecular Grade (0.1 M), 2 μL of random hexamers (100 ng/ μL), 0.4 μL of dNTP mix (100 mM each), 0.5 μL of RNaseOUT (40 U/ μL), and 0.5 μL of SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/ μL). The mixture was incubated at 25 °C for 5 min, then heated for 60 min at 37 °C, and the reaction was inactivated at 90°C for 5 min. The cDNAs were stored at -20 °C until the PCR reaction was done. The expression of *abcb1*, *abcc1*, and *lrp* genes was then assessed by RT-PCR in 50 μL volume reaction, containing 1 μg of the cDNA, 5 μL of 10X PCR buffer, 0.4 μL of dNTPmix (100 mM each), 1 μL of sense and antisense primers (10 mM each), 0.4 μL of *Taq* DNA Polymerase (5 U/ μL), and 1.5 μL of MgCl_2 (50 mM) for GAPDH and *abcc1* or 0.75 μL for *abcb1* and *lrp*. GAPDH gene expression served as endogenous control. Primer sequences, annealing temperatures, and thermal cycles were previously described elsewhere [11]. All RT-PCR reactions were performed in duplicate. The PCR products were visualized on 2% agarose gel with ethidium bromide staining and analyzed densitometrically with NIH ImageJ1.40 software. Band intensity was quantified under ultraviolet light and normalized according to those for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA.

Detection of ABCB1, ABCC1, LRP, and Bcl-2 expression and flow cytometry analysis

Erythrocyte-lysed, freshly obtained PB samples (approximately 1×10^6 cells in 100 μL /test) were analyzed using a three-color direct immunofluorescence technique. The following combinations of monoclonal antibodies (MoAb) were used (FITC, PE, PerCP): --/CD34/CD45; ABCB1/CD34/CD45; ABCC1/CD34/CD45; LRP/CD34/CD45; Bcl-2/CD34/CD45. Each of these 3-color combinations allowed the specific identification of the whole CD34 cell population present in the PB samples analyzed.

Multidrug resistance and apoptosis-related proteins were analyzed with the following MoAb reagents for the detection of intracellular proteins: anti-ABCB1-FITC (clone 17F9; BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA), anti-ABCC1-FITC (clone QCRL-3; BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA), anti-LRP (clone LRP-56; Millipore™, Molsheim, France), and anti-Bcl-2-FITC (clone 100; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). MoAbs directed against surface antigens used for the identification of blast cells, and their

discrimination from normal residual cells included: CD34-PE and CD45-PerCP from BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

For surface staining, 100 μ L of sample per tube were incubated for 15 min with the appropriate combination of MoAb at room temperature (RT) in the dark. Once this incubation period was finished, 1 mL of FACS lysing solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) diluted 1:10 (vol/vol) in distilled water was added in order to lyse erythrocytes. After another 10 min incubation period in the dark (RT), cells were centrifuged (5 min at 540 g) and the cell pellet washed with 1 mL of PBS. Finally, cells were resuspended in 1 mL of PBS until analyzed by flow cytometry. Intracellular detection of ABCB1, ABCC1, and Bcl-2 proteins was performed after staining for surface proteins using a direct immunofluorescence technique. For that, the BD Cytofix/Cytoperm™ kit (San Diego, CA, USA) was used, strictly following manufacturer recommendations. After staining for cytoplasmic antigens, cells were washed and resuspended in 1 mL of PBS until analysis by flow cytometry. Cytoplasmic expression of LRP was assessed using an indirect immunofluorescence technique after cell fixation/permeabilization (BD Cytofix/Cytoperm™ kit) followed by staining of surface antigens. In this technique, rabbit anti-mouse immunoglobulins conjugated with Alexa-488 (Invitrogen, Oregon, USA) were used as a second layer. After staining, cells were washed with PBS and resuspended in 1 mL of PBS until analysis by flow cytometry. Appropriate isotype-matched negative controls were used for each of the techniques described above. In all cases, data acquisition was performed in a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson), using the CellQuest software program (Becton Dickinson). A total of 10,000 PB events were acquired for each 3-color staining. The Infinicyt software program (Cytognos, Salamanca, Spain) was used for data analysis. For each individual apoptosis and MDR-associated marker, antigen expression was analyzed and reported as its relative fluorescence intensity (RFI), calculated as the ratio between the mean fluorescence intensity (MFI) of the tested cells for the corresponding protein and MFI of corresponding controls. For all proteins, the control was based on the MFI of the corresponding blast cell in the isotype-matched negative control tube.

Statistical analysis

To analyze a possible correlation between the relative expression of multidrug resistance proteins and age, white blood cell

(WBC) count at diagnosis, immunophenotype, percentage of CD34⁺ blasts, CD34 expression, and lactate dehydrogenase (LDH), patients were divided into two groups using the mean value of the relative expression of the respective genes and proteins as cutoff between low and high expression.

The correlation between the expression values of the genes and proteins studied and between the variables analyzed was determined by the Spearman correlation coefficient. The association between the variables analyzed and protein expression levels was evaluated using the Fisher's Exact Test. The level of significance was set to $P \leq 0.05$ in all analyses.

RESULTS

All proteins studied by RT-PCR and flow cytometry presented wide variability of expression (Table I). High gene expression of *abcb1*, *abcc1*, and *lrp* was found in 6 patients (60%), 5 patients (50%), and 6 patients (60%), respectively (n=10). High protein expression of ABCB1, ABCC1, LRP, and Bcl-2 was found in 5 patients (33%; n=15), 5 patients (33%; n=15), 1 patient (20%; n=5) and 7 patients (47%; n=15), respectively. High coexpression of *abcb1* and *lrp* genes was found in 1 patient, and high coexpression of *abcc1* and *lrp* was found in another patient. Two patients presented high coexpression of proteins ABCB1 and ABCC1, one patient presented a high coexpression of proteins ABCB1 and Bcl-2, while another patient presented a high coexpression of proteins ABCC1 and Bcl-2. High coexpression of proteins LRP and Bcl-2 was also found in 1 patient. High coexpression of the three MDR genes was apparent in 3 patients. Three patients presented a high expression of ABCB1, ABCC1, and LRP proteins, but none of the patients presented high coexpression of proteins ABCB1, ABCC1, LRP, and Bcl-2. None of the patients showed a high coexpression of all genes and proteins studied.

Table I. Mean \pm Standard Deviation (SD) and Range of the Relative Expression Values of the Different Drug Resistance Proteins and Genes Evaluated by Semi-Quantitative RT-PCR and Flow Cytometry in Acute Leukemias

Method	Protein	Mean \pm SD (range)
RT-PCR	<i>abcb1</i>	0.85 \pm 0.49 (0.00 – 1.44)
	<i>abcc1</i>	0.84 \pm 0.40 (0.00 – 1.16)
	<i>lrp</i>	0.72 \pm 0.44 (0.00 – 1.12)
Flow cytometry	ABCB1	6.03 \pm 6.51 (1.01 – 19.33)
	ABCC1	1.48 \pm 0.46 (0.94 – 2.69)
	LRP	1.51 \pm 1.49 (0.46 – 4.09)
	Bcl-2	55.00 \pm 41.95 (3.43 – 145.27)

The analysis of relative gene expression of *abcb1*, *abcc1*, and *lrp*, and relative protein expression of ABCB1, ABCC1, and LRP showed no significant correlation between the two detection methods ($P > 0.05$). Also, no significant correlations between multidrug resistance genes and protein expression were found ($P > 0.05$).

The analysis of a possible correlation between the relative expression of multidrug resistance proteins and age, white blood cell (WBC) count at diagnosis, immunophenotype, percentage of CD34⁺ blasts, CD34 expression lactate dehydrogenase (LDH), and vital status (Table II), showed that higher levels of *abcc1* gene expression were found in patients with higher CD34 expression ($P = 0.046$). A higher expression of LRP proteins was observed in patients over the age of 9 years ($P = 0.046$) while a higher expression of ABCB1 proteins was found in patients with WBC counts higher than 50,000/mm³ ($P = 0.02$). Four of the 7 patients that died during induction or while in clinical remission superexpressed ABCC1 protein. Of these 4 patients, 2 coexpressed ABCB1 protein, and one patient coexpressed ABCB1 and Bcl-2 proteins.

Table II. Significance Level for the Expression of the Different Drug Resistance Genes and Proteins and Clinical Features of Acute Leukemia

	<i>abcb1</i>	<i>abcc1</i>	<i>lrp</i>	ABCB1	ABCC1	LRP	Bcl-2
Age							
<9 years old	0.285	0.513	0.789	0.454	0.708	0.046*	0.724
≥9 years old	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=15)	(N=15)	(N=5)	(N=15)
WBC count at diagnosis							
<50,000/mm ³	0.789	0.513	0.285	0.046*	0.425	0.617	0.327
≥50,000/mm ³	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=15)	(N=15)	(N=5)	(N=15)
Immuno-phenotype							
AML	0.066	1.000	0.759	1.000	1.000	1.000	0.080
ALL	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=15)	(N=15)	(N=5)	(N=15)
Percentage of Blasts CD34⁺							
	0.131	0.597	0.666	0.951	0.854	1.000	0.201
	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=15)	(N=15)	(N=5)	(N=15)
CD34 Expression							
	0.886	0.046*	0.378	0.806	0.317	0.272	0.926
	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=15)	(N=15)	(N=5)	(N=15)
LDH							
	0.522	0.347	1.000	0.903	0.221	0.157	0.105
	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=15)	(N=15)	(N=5)	(N=15)

P- value is calculated using the Spearman correlation test; * Significant

DISCUSSION

Although the antineoplastic drugs currently available are usually effective for the treatment of various tumors, they may prove to be relatively ineffective in the treatment of some primary or recurrent neoplasms and the identification of factors that might effectively predict patient response to treatment is a constant challenge in oncology. Multidrug resistance is a major cause of failure for many forms of treatment and cellular resistance to drugs in acute leukemia is a determinant factor in the response to chemotherapy and their detection may be of clinical importance [11,19]. Clinical resistance to chemotherapy results from the interaction of numerous biological variables, and proteins such as ABCB1, ABCC1, LRP, and Bcl-2, play an important role in this resistance. While ABCB1, ABCC1, and LRP

proteins decrease intracellular drug concentration and Bcl-2 proteins influence the apoptotic process [19, 20].

In this study, we evaluated the expression of four chemotherapy resistance related proteins (ABCB1, ABCC1, LRP, and Bcl-2) in the leukemic blast cells of 17 children with childhood acute leukemia at the onset of disease, and we correlated these data to their biological and clinical features. Gene expression was evaluated by semi-quantitative RT-PCR and the results were expressed as a ratio between MDR gene and GAPDH expression. Protein expression was evaluated by flow cytometry using specific monoclonal antibodies, and the results were expressed in relative fluorescence intensity (RFI). The mean value of the relative expression of genes and proteins was used as cutoff between low and high expression.

The rate of superexpression of MDR proteins reported in the literature is widely variable, suggesting that there is no specific pattern for the expression of these proteins in acute leukemia [7, 11, 21]. Studies reported levels of ABCB1 protein expression ranging from 4% to 60% in patients with acute lymphoblastic leukemia upon diagnosis [6, 11, 22, 23]. Available data on the prevalence of ABCC1 protein expression in childhood acute leukemia upon diagnosis are scarce. Valera et al. [11] and Kourti et al. [6] reported levels of ABCC1 protein overexpression upon diagnosis in 16.6% and 49% of children with acute lymphoblastic leukemia, respectively. In relation to the LRP protein, studies reported levels of LRP protein overexpression ranging from 33% to 48% [6, 11, 24]. Similarly, our results also found highly variable levels of MDR proteins. While the percentage of patients overexpressing ABCB1 and ABCC1 proteins are within the range found in previous studies, the percentage of patients that overexpress *abcb1*, *abcc1*, and *lrp* genes are relatively higher (60%, 50% and 60%, respectively) than the values previously reported. In contrast, the LRP protein overexpression found in this study is lower (20%) than in previous studies. These discrepancies can be essentially explained by differences in the methods employed in these studies, the positivity cutoff values used, and sampling characteristics of the patients studied.

The relationships between chemotherapy resistance-related protein expression and prognostic factors are still unclear. Van Grotel et al. [25] reported that CD34 has a poor prognostic impact in pediatric T-lineage acute lymphoblastic leukemia and that CD34 is associated with higher mRNA expression levels of *abcb1* and *abcc1*. However, they also showed that high mRNA expression levels of MDR genes may not

explain the observed association between CD34 expression and poor outcome in T-ALL patients, which may be partially explained by the fact that MDR expression levels may not be directly related to MDR protein function [25]. In our study, we also find an association between *abcc1* gene expression and CD34 expression. Although our data demonstrated that CD34 expression was correlated with a higher *abcc1* gene expression level, this same association was not seen in ABCC1 protein expression. High levels of ABCB1 protein were associated with high WBC values. This finding has not been reported in previous studies with childhood acute leukemia [12, 13, 26]. These results suggest that an ABCB1 protein overexpression and *abcc1* gene overexpression can be associated with a poor prognostic.

We also observed that increased LRP protein expression, assessed by flow cytometry upon diagnosis, was related to older ages in patients. Borg et al. [27] and Jankovicová et al. [28] reported a similar correlation in adults diagnosed with AML whose LRP protein expression was detected by flow cytometry. However, Galimberti et al. [29] demonstrated that there is no correlation between *lrp* positivity by RT-PCR and biological characteristics, including age. Kakihara et al. [13] also found no correlation between the expression of the *lrp* gene, determined by RT-PCR, and variables such as age and WBC upon diagnosis. Our results did not find any correlation between the *lrp* gene expression determined by RT-PCR and older age.

The clinical impact of ABCC1 expression remains controversial. Plasschaert et al. [30] in a study with childhood and adult ALL demonstrated that in children, high expression of ABCC1, ABCC3, and ABCC5 is associated with unfavorable outcomes, whereas ABCC2 and ABCC6 can predict relapse in adults. In addition, the same study reported that relapsed patients showed a higher expression of all *abcc* genes, except *abcc4*, than patients who remained in complete remission. In another study that evaluated ABCC1 levels by semi-quantitative RT-PCR and flow cytometry, Plasschaert et al. [31] showed that increased ABCC1 protein expression upon diagnosis had no impact on the event-free survival of children or adults. Valera et al. [11] reported that the expression of the *abcc1* gene upon diagnosis was not related to a poorer event-free survival. Sauerbrey et al. [24] and Kakihara et al. [13] also did not find a correlation between *abcc1* gene expression upon diagnosis and poorer survival of children diagnosed with ALL. Also, Den Boer et al. [12] showed that ABCC1 proteins are not related to any of the poor-risk indicators and cellular resistance to

MDR and non-MDR-related in childhood leukemia. However, in our study, a higher death incidence was found in patients with high ABCC1 protein expression.

In conclusion, our findings demonstrate that ABCB1, ABCC1, and LRP proteins correlate with clinical/biological features and with prognostic factors in different ways in children with acute leukemia, and also that this correlation is greatly influenced by the detection method.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants and fellowships from Fundação de Apoio à Pesquisa e Tecnologia do Estado de Santa Catarina-FAPESC, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (Brazil). This work is part of the master's thesis of A.C.R. Moraes, who is a graduate student in Pharmacy.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

No potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. Pui C H and Evans W E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354:2:166-78.
2. Pui C H and Crist W M. Treatment of childhood leukemias. *Curr Opin Oncol* 1995;7:1:36-44.
3. Zwaan C M and Kaspers G J. Possibilities for tailored and targeted therapy in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2004;127:3:264-79.
4. Kaspers G J and Creutzig U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia* 2005;19:12:2025-9.
5. Ribeiro R C, Razzouk B I, Pounds S, Hijiya N et al. Successive clinical trials for childhood acute myeloid leukemia at St Jude Children's Research Hospital, from 1980 to 2000. *Leukemia* 2005;19:12:2125-9.
6. Kourti M, Vavatsi N, Gombakis N, Sidi V et al. Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol* 2007;86:2:166-73.

7. Van Den Heuvel-Eibrink M M, Van Der Holt B, Burnett A K, Knauf W U et al. CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age. *Ann Hematol* 2007;86:5:329-37.
8. Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J and Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv* 2004;1:1:27-42.
9. Szakacs G, Paterson J K, Ludwig J A, Booth-Genthe C et al. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:3:219-34.
10. Cortez M A, Scrideli C A, Yunes J A, Valera E T et al. mRNA expression profile of multidrug resistance genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Low expression levels associated with a higher risk of toxic death. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:6:996-1004.
11. Valera E T, Scrideli C A, Queiroz R G, Mori B M et al. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J* 2004;122:4:166-71.
12. Den Boer M L, Pieters R, Kazemier K M, Rottier M M et al. Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia. *Blood* 1998;91:6:2092-2098.
13. Kakihara T, Tanaka A, Watanabe A, Yamamoto K et al. Expression of multidrug resistance-related genes does not contribute to risk factors in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int* 1999;41:6:641-7.
14. Goellner S, Steinbach D, Schenk T, Gruhn B et al. Childhood acute myelogenous leukaemia: association between PRAME, apoptosis- and MDR-related gene expression. *Eur J Cancer* 2006;42:16:2807-14.
15. Notarbartolo M, Cervello M, Poma P, Dusonchet L et al. Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells. *Oncol Rep* 2004;11:1:133-6.
16. Ong Y L, McMullin M F, Bailie K E, Lappin T R et al. High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000;111:1:182-9.

17. Suarez L, Vidriales B, Garcia-Larana J, Lopez A et al. Multiparametric analysis of apoptotic and multi-drug resistance phenotypes according to the blast cell maturation stage in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2001;86:12:1287-95.
18. Swerdlow S H, Campo E, Harris N L, Jaffe E S et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Geneva: WHO Press; 2008. 439p.
19. Styczynski J, Wysocki M, Debski R, Czyzewski K et al. Predictive value of multidrug resistance proteins and cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:11:875-93.
20. List a F, Spier C S, Grogan T M, Johnson C et al. Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 1996;87:6:2464-9.
21. Karakas T, Maurer U, Weidmann E, Miething C C et al. High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Ann Oncol* 1998;9:2:159-65.
22. Kanerva J, Tiirikainen M I, Maki-pernaa A, Riikonen P et al. Initial P-glycoprotein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: no evidence of prognostic impact in follow-up. *Pediatr Hematol Oncol* 2001;18:1:27-36.
23. Dhooge C, De Moerloose B, Laureys G, Ferster A et al. Expression of the multidrug transporter P-glycoprotein is highly correlated with clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: results of a long-term prospective study. *Leuk Lymphoma* 2002;43:2:309-14.
24. Sauerbrey A, Voigt A, Wittig S, Hafer R et al. Messenger RNA analysis of the multidrug resistance related protein (MRP1) and the lung resistance protein (LRP) in de novo and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002;43:4:875-9.
25. Van Grotel M, Van Den Heuvel-Eibrink M M, Van Wering E R, Van Noesel M M et al. CD34 expression is associated with poor survival in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2008;51:6:737-40.
26. Tafuri A, Gregorj C, Petrucci M T, Ricciardi M R et al. MDR1 protein expression is an independent predictor of complete

- remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100:3:974-81.
27. Borg a G, Burgess R, Green L M, Scheper R J et al. Overexpression of lung-resistance protein and increased P-glycoprotein function in acute myeloid leukaemia cells predict a poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *Br J Haematol* 1998;103:4:1083-91.
 28. Jankovicova K, Krejsek J, Kopecky O, Voglova J et al. [Multidrug resistance markers monitoring in acute myeloid leukemia cells]. *Cas Lek Cesk* 2004;143:7:471-5.
 29. Galimberti S, Testi R, Guerrini F, Fazzi R et al. The clinical relevance of the expression of several multidrug-resistant-related genes in patients with primary acute myeloid leukemia. *J Chemother* 2003;15:4:374-9.
 30. Plasschaert S L, De Bont E S, Boezen M, Vander Kolk D M et al. Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11:24 Pt 1:8661-8668.
 31. Plasschaert S L, Vellenga E, De Bont E S, Van Der Kolk D M et al. High functional P-glycoprotein activity is more often present in T-cell acute lymphoblastic leukaemic cells in adults than in children. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1:85-95.

CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO GERAL

Apesar de serem acometidos pela mesma doença, adultos e crianças com LA apresentam diferentes características clínicas, prognósticas e resposta ao tratamento. Em geral, crianças com LLA apresentam uma maior sobrevida do que os adultos, pois elas possuem uma maior tolerância à quimioterapia, o que possibilita a utilização de protocolos de tratamento com doses mais intensivas (SCHRAPPE et al., 2000; GOKBUGET e HOELZER, 2002). Acredita-se que possam existir diferenças celulares intrínsecas entre as células blásticas da LLA em adultos e em crianças, o que poderia explicar os diferentes perfis de sensibilidade a fármacos (STYCZYNSKI et al., 2000). Essa teoria é sustentada por estudos que sugerem que a transformação maligna das duas doenças origina-se em diferentes estágios do compartimento das *stem cell* linfóides (GREAVES, 1993; GREAVES, 1999).

Ao contrário da LLA em crianças, a LMA pediátrica é caracterizada pelo difícil tratamento (SHAH e AGARWAL, 2008). Apesar das recentes inovações no diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes com LMA infantil, aproximadamente um terço dessas crianças recidivam (RUBNITZ, 2008; SHAH e AGARWAL, 2008). Da mesma forma que na LMA infantil, a LMA em adultos também é de difícil tratamento. Apesar dos índices de remissão ser de 50% a 85% após a terapia de indução, a maioria desses pacientes recidivam e morrem após dois anos em remissão (SHIPLEY e BUTERA, 2009). O prognóstico para pacientes acima de 50 anos é ainda pior, podendo atingir índices de remissão após quimioterapia de 30% a 50% e uma sobrevida livre de doença de apenas 9 a 12 meses, sendo que raramente chegam a dois anos em remissão (LEITH et al., 1997; KUENDGEN e GERMING, 2009). Uma explicação para essa pior sobrevida é que, ao contrário dos pacientes com LMA mais jovens, os pacientes idosos com LMA são frequentemente mais resistentes à quimioterapia (RUBNITZ, 2008; BURNETT et al., 2009). Enquanto a resistência a múltiplas drogas ocorre em 33% dos pacientes com LMA com menos de 56 anos, essa frequência sobe para 57% em indivíduos com mais de 75 anos (KUENDGEN e GERMING, 2009). Uma possível explicação para essa maior resistência intrínseca e, conseqüentemente, um pior prognóstico dos pacientes idosos é a de que os blastos leucêmicos na LMA em idosos parecem ser biologicamente diferentes dos presentes em indivíduos mais jovens com LMA (LEITH et al., 1997).

Apesar das diferenças intrínsecas entre as células leucêmicas dos adultos e crianças com LA, os resultados mostraram semelhantes

índices de superexpressão dos genes e das proteínas de resistência entre os dois grupos de pacientes. Além disso, foi observada uma ampla variabilidade nos níveis de expressão das proteínas de resistência, o que sugere que não há um padrão específico de expressão dessas proteínas nas LAs e entre adultos e crianças. Vários mecanismos podem estar implicados no fenótipo MDR e as bombas de efluxo são frequentemente apontadas como uma das principais causas de resistência ao tratamento quimioterápico. A superexpressão de proteínas de resistência, como a ABCB1, ABCC1 e LRP vem sendo investigada como marcadores prognóstico (SCHAICH et al., 2005). No entanto, provavelmente devido às diferentes características biológicas entre as células blásticas dos pacientes adultos ou crianças com LMA e LLA essas proteínas parecem influenciar de forma diferenciada o desfecho da quimioterapia e não há um consenso quanto ao seu papel na resistência à quimioterapia.

A maioria dos estudos realizados em adultos com LMA demonstra que a proteína ABCB1 influencia na taxa de remissão da doença (PIRKER et al., 1991; CAMPOS et al., 1992; ZOCHBAUER et al., 1994; MARIE, 2001; SVIRNOVSKI et al., 2009). Schaich et al. (2005) relataram em seu estudo que a expressão de ABCB1 em adultos com LMA é um fator prognóstico independente para a determinação do desfecho da terapia de indução e que a probabilidade desses pacientes em atingir a remissão completa é significativamente menor em pacientes que expressam ABCB1. Além disso, outros grupos demonstraram que a expressão de ABCB1 possui uma correlação com aberrações citogenéticas de alto risco e que essa proteína influencia na sobrevida dos pacientes adultos com LMA de uma forma independente dessa correlação (SAMDANI et al., 1996; WUCHTER et al., 1999; SCHAICH et al., 2005). Assim como nos casos de LMA, a expressão de ABCB1 em adultos com LLA parece ser um fator preditor independente para a remissão completa (TAFURI et al., 2002). Além disso, um fenótipo ou genótipo ABCB1 positivo é mais frequentemente encontrado em pacientes com LLA de pior prognóstico e acredita-se que essa proteína confere um maior risco de resistência ao tratamento primário e maiores chances de recidiva desses pacientes (BASSAN et al., 2004).

A LMA em crianças é uma doença de baixa incidência (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2005; SWERDLOW et al., 2008) e, até agora, poucos dados existem a respeito da relevância clínica da ABCB1 na LMA infantil. Estudos em crianças com LMA não encontraram uma associação entre a expressão do gene *abcb1* e o prognóstico desses pacientes, motivo que se questiona a relevância clínica da ABCB1

(STEINBACH et al., 2003). A importância clínica da ABCB1 na LLA infantil também permanece controversa. Enquanto alguns estudos não encontram relação entre a proteína ABCB1 e os indicadores de pior prognóstico na LLA infantil (DEN BOER et al., 1998), outros trabalhos encontram tal correlação (PUI e CRIST, 1995; DHOOGHE et al., 1999).

Em nosso estudo, observou-se que a superexpressão gênica de *abcb1* está correlacionada com o aumento da idade e com altas concentrações de LDH, dois fatores de mau prognóstico nas LAs. Além disso, indivíduos adultos com LMA que foram a óbito ou recidivaram apresentaram uma maior expressão gênica de *abcb1*. Já nos pacientes pediátricos com LA, a expressão de ABCB1 está associada apenas com uma leucocitose acima de $50.000/\text{mm}^3$ ao diagnóstico. Curiosamente, enquanto nos pacientes adultos foi unicamente a expressão gênica de *abcb1* quem esteve correlacionada com fatores de pior prognóstico, nos pacientes pediátricos apenas a expressão da proteína ABCB1 esteve relacionada a algum fator prognóstico. Esses dados sugerem que, ao determinar o perfil de expressão de ABCB1 nos pacientes com LA, a determinação da expressão gênica por RT-PCR seja a mais recomendada para indivíduos adultos, enquanto que a detecção fenotípica por citometria de fluxo pareça trazer mais informações quanto ao prognóstico dos pacientes com LA infantil.

O impacto da expressão da ABCC1 e LRP no prognóstico de indivíduos com LA é ainda mais controverso do que o da ABCB1. Estudos em indivíduos adultos com LMA demonstraram que a ABCC1 é um fator prognóstico independente (SCHAICH et al., 2005) e que indivíduos que expressam essa proteína apresentam um menor tempo de remissão (LAUPEZE et al., 2002; SCHAICH et al., 2005). Um estudo com um subgrupo de pacientes adultos com LMA e uma inversão do cromossoma 16, cromossoma onde está localizado o gene *abcc1*, demonstraram que esses pacientes apresentam uma maior sobrevida global e sobrevida livre de doença (KUSS et al., 1994). Apesar de encontrar uma influência da ABCC1 na sobrevida livre de doença, Schaich et al. (2005) não conseguiu demonstrar o papel dessa proteína na taxa de remissão dos pacientes. Filipits et al. (1997) também constataram que, apesar da ABCC1 ser superexpressa em 26% dos pacientes adultos LMA, esta não era capaz de prever a resposta à terapia de indução e a sobrevida dos pacientes (FILIPITS et al., 1997). Da mesma forma que a ABCC1, a influência da expressão de LRP como fator prognóstico ainda não está esclarecida nas LMAs em adultos. Enquanto alguns autores não encontram correlação entre a expressão

dessa proteína e o desfecho do paciente (SCHAICH et al., 2005), outros trabalhos demonstram que há uma associação entre essa proteína e um pior prognóstico em adultos com LMA (LIST et al., 1996; FILIPITS et al., 1998). Já nas LLAs em adultos, a expressão de ABCC1 não parece estar relacionada com qualquer parâmetro clínico ou biológico (MICHIELI et al., 1999; DAMIANI et al., 2002). No entanto, Plasschaert et al. (2005) demonstraram que a expressão de ABCC2 e ABCC6 parecem ser melhores preditores de recidiva em adultos com LLA. Além disso, uma superexpressão de LRP parece ser um fator prognóstico independente em adultos com LLA, estando associada a uma menor sobrevida e um maior risco de recidiva (OH et al., 2003).

Da mesma maneira que nas LLAs em adultos, a expressão de ABCC1 nas LLAs pediátricas não parece estar correlacionada com o prognóstico dos pacientes ou com fatores prognósticos desfavoráveis, como imunofenótipo, leucometria e idade (SAUERBREY et al., 2002; TAFURI et al., 2002; PLASSCHAERT et al., 2003; SWERTS et al., 2006). Valera et al. (2004) não encontraram relação entre a sobrevida livre de doença e os níveis de expressão do gene *abcc1* ao diagnóstico. Beck et al. (1995) relataram que não há diferenças significativas entre os níveis de expressão de ABCC1 ao diagnóstico e na primeira recidiva. No entanto, essa expressão parece aumentar significativamente após múltiplas recidivas (BECK et al., 1995). Os dados a respeito da relevância clínica da LRP em crianças com LLA infantil são limitados. Muitos estudos não encontraram diferenças entre os níveis de expressão de LRP ao diagnóstico e na primeira recidiva (VOLM et al., 1997; OGRETMEN, BARREDO e SAFA, 2000; SAUERBREY et al., 2002). No entanto, a expressão de LRP é significativamente maior em casos de múltiplas recidivas (DEN BOER et al., 1998). Além disso, a expressão LRP não parece diferir entre os grupos de risco identificados pela leucometria, sexo ou idade (DEN BOER et al., 1998; KAKIHARA et al., 1999; SAUERBREY et al., 2002). Apesar disso, Valera et al. (2004) relataram que um aumento na expressão de LRP ao diagnóstico parece estar fortemente relacionado com uma menor sobrevida livre de doença. Sauerbrey et al. (2002) demonstraram que crianças com LLA e uma alta expressão do gene *lrp* apresentavam uma menor tendência a permanecer na primeira remissão clínica. Devido à raridade da doença, o papel da expressão de ABCC1 e LRP nas LMAs infantis ainda permanece desconhecido e nenhum dado foi encontrado na bibliografia consultada.

Em nosso estudo, tanto a expressão de ABCC1 quanto a de LRP não apresentaram correlação com fatores de mau prognóstico para

pacientes adultos com LA. No entanto, na LA infantil a expressão gênica de *abcc1* apresentou correlação com a expressão de CD34, enquanto uma elevada expressão da proteína ABCC1 correlacionou-se com uma maior taxa de óbitos e recidivas. Já a expressão de LRP apresentou uma maior expressão em crianças com mais de nove anos. Esses dados sugerem que, diferentemente dos casos de LAs em adultos, em que apenas a expressão gênica de *abcb1* apresentou correlação com os fatores de pior prognóstico, na LA pediátrica é a expressão conjunta das proteínas de resistência que parece influenciar no prognóstico dos pacientes. Além disso, nesse estudo, a determinação de expressão fenotípica das proteínas de resistência na LA infantil apresentou uma maior importância do que a determinação da expressão gênica por RT-PCR semiquantitativa. Outro fato que pode ser destacado é que, apesar de vários trabalhos indicarem uma associação entre a expressão de Bcl-2, uma resistência à quimioterapia e um pior prognóstico nos indivíduos com LA (CAMPOS et al., 1993; LAURIA et al., 1997; DEL POETA et al., 2003; MOON et al., 2009), nossos resultados não encontraram qualquer correlação entre a expressão de Bcl-2 e os fatores de mau prognóstico estudados.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO

A compilação de evidências obtidas nesse estudo nos permite concluir:

1. A extração de RNA total pelo método isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio é a que fornece amostras de RNA total de melhor qualidade;
2. São necessárias pelo menos 2×10^6 células blásticas de paciente com leucemia aguda para ter uma quantidade suficiente de RNA total;
3. Para as condições de RT-PCR utilizadas, o ciclo em que ocorreu o aumento linear da intensidade média das bandas foi o 25º ciclo para os *primers abcb1* e GAPDH e o 30º ciclo para os *primers abcc1* e *lrp*;
4. Houve uma ampla variabilidade nos níveis de expressão dos genes e das proteínas de resistência, o que sugere a inexistência de um padrão específico de expressão dessas proteínas nas LAs;
5. Não houve correlação entre os níveis de expressão de ABCB1, ABCC1 e LRP encontrados pelo método de RT-PCR semi-quantitativo e pela citometria de fluxo;
6. Nos pacientes adultos com LA, houve correlação significativa entre a expressão dos genes *abcb1* e *lrp* e a expressão das proteínas ABCB1 e ABCC1, ABCB1 e Bcl-2, e ABCC1 e Bcl-2;
7. Nos pacientes pediátricos com LA, não houve correlação significativa entre os níveis de expressão dos genes e proteínas;
8. Nos pacientes adultos com LA, houve correlação positiva entre a expressão do gene *abcb1* e a idade dos pacientes, a concentração de LDH e o *status* vital;
9. Nos pacientes pediátricos com LA, houve correlação positiva entre a expressão do gene *abcc1* e a expressão de CD34, entre a expressão da proteína LRP e a idade, entre a expressão da proteína ABCB1 e a leucometria ao diagnóstico e entre a expressão da proteína ABCC1 e o *status* vital.

Esses resultados sugerem que a análise da expressão gênica de *abcb1* está mais relacionada com um pior prognóstico nos pacientes adultos com LA, enquanto que nos pacientes com LA infantil é a expressão conjunta das proteínas ABCB1, ABCC1 e LRP que parecem estar relacionadas com um pior prognóstico. Além disso, os resultados também indicam que a determinação do perfil de expressão da ABCB1,

ABCC1 e LRP pelo método do RT-PCR semiquantitativo é mais significativa nos casos de LA em adultos e a determinação do perfil de expressão dessas proteínas por citometria de fluxo é mais significativa nas LAs em crianças.

REFERÊNCIAS

AMBUDKAR, S. V.; DEY, S.; HRYCYNA, C. A.; RAMACHANDRA, M.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.39, p.361-98, 1999.

BACCARANI, M.; CORBELLI, G.; AMADORI, S.; DRENTHE-SCHONK, A.; WILLEMZE, R.; MELONI, G.; CARDOZO, P. L.; HAANEN, C.; MANDELLI, F.; TURA, S. Adolescent and adult acute lymphoblastic leukemia: prognostic features and outcome of therapy. A study of 293 patients. **Blood**, v.60, n.3, p.677-84, 1982.

BAIN, B. J. **Diagnóstico em Leucemias**. 2. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

BAKOS, E.; HEGEDUS, T.; HOLLO, Z.; WELKER, E.; TUSNADY, G. E.; ZAMAN, G. J.; FLENS, M. J.; VARADI, A.; SARKADI, B. Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. **J Biol Chem**, v.271, n.21, p.12322-6, 1996.

BALLATORI, N.; HAMMOND, C. L.; CUNNINGHAM, J. B.; KRANCE, S. M.; MARCHAN, R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.204, n.3, p.238-55, 2005.

BASSAN, R.; GATTA, G.; TONDINI, C.; WILLEMZE, R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.50, n.3, p.223-61, 2004.

BECK, J.; HANDGRETINGER, R.; DOPFER, R.; KLINGEBIEL, T.; NIETHAMMER, D.; GEKELER, V. Expression of *mdr1*, *mrp*, topoisomerase II α/β , and cyclin A in primary or relapsed states of acute lymphoblastic leukaemias. **Br J Haematol**, v.89, n.2, p.356-63, 1995.

BENE, M. C.; BERNIER, M.; CASASNOVAS, R. O.; CASTOLDI, G.; DOEKHARAN, D.; VAN DER HOLT, B.; KNAPP, W.; LEMEZ, P.; LUDWIG, W. D.; MATUTES, E.; ORFAO, A.; SCHOCH, C.; SPERLING, C.; VAN'T VEER, M. B. Acute myeloid leukaemia M0:

haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. **Br J Haematol**, v.113, n.3, p.737-45, 2001.

BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, v.33, n.4, p.451-8, 1976.

_____ Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br J Haematol**, v.51, n.2, p.189-199, 1982.

_____ Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). **Br J Haematol**, v.78, n.3, p.325-9, 1991.

BIENZ, M.; LUDWIG, M.; LEIBUNDGUT, E. O.; MUELLER, B. U.; RATSCHILLER, D.; SOLENTHALER, M.; FEY, M. F.; PABST, T. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. **Clin Cancer Res**, v.11, n.4, p.1416-24, 2005.

BORG, A. G.; BURGESS, R.; GREEN, L. M.; SCHEPER, R. J.; YIN, J. A. Overexpression of lung-resistance protein and increased P-glycoprotein function in acute myeloid leukaemia cells predict a poor response to chemotherapy and reduced patient survival. **Br J Haematol**, v.103, n.4, p.1083-91, 1998.

BORST, P. Genetic mechanisms of drug resistance. A review. **Acta Oncol**, v.30, n.1, p.87-105, 1991.

BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJNHOLDS, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. **J Natl Cancer Inst**, v.92, n.16, p.1295-1302, 2000.

BORST, P.; ZELCER, N.; VAN DE WETERING, K.; POOLMAN, B. On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins. **FEBS Lett**, v.580, n.4, p.1085-93, 2006.

BRADBURY, D. A.; RUSSELL, N. H. Comparative quantitative expression of bcl-2 by normal and leukaemic myeloid cells. **Br J Haematol**, v.91, n.2, p.374-379, 1995.

BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.; KASPER, D. L.; HAUSER, S.; LONGO, D.; JAMERSON, J. L. **Harrison Medicina Interna**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2002.

BUDA, G.; ORCIUOLO, E.; MAGGINI, V.; GALIMBERTI, S.; BARALE, R.; ROSSI, A. M.; PETRINI, M. MDR1 pump: more than a drug transporter comment on "Regulatory polymorphisms of multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with the development of childhood acute lymphoblastic leukaemia" by Hattori et al. [Leuk. Res. (in press)]. **Leuk Res**, v.32, n.2, p.359-60, 2008.

BURGER, H.; NOOTER, K.; SONNEVELD, P.; VAN WINGERDEN, K. E.; ZAMAN, G. J.; STOTER, G. High expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chronic and prolymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, v.88, n.2, p.348-356, 1994.

BURNETT, A. K.; MILLIGAN, D.; GOLDSTONE, A.; PRENTICE, A.; MCMULLIN, M. F.; DENNIS, M.; SELLWOOD, E.; PALLIS, M.; RUSSELL, N.; HILLS, R. K.; WHEATLEY, K. The impact of dose escalation and resistance modulation in older patients with acute myeloid leukaemia and high risk myelodysplastic syndrome: the results of the LRF AML14 trial. **Br J Haematol**, v.145, n.3, p.318-32, 2009.

CAIROLI, R.; BEGHINI, A.; GRILLO, G.; NADALI, G.; ELICE, F.; RIPAMONTI, C. B.; COLAPIETRO, P.; NICHELATTI, M.; PEZZETTI, L.; LUNGI, M.; CUNEO, A.; VIOLA, A.; FERRARA, F.; LAZZARINO, M.; RODEGHIERO, F.; PIZZOLO, G.; LARIZZA, L.; MORRA, E. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. **Blood**, v.107, n.9, p.3463-8, 2006.

CAMPOS, L.; GUYOTAT, D.; ARCHIMBAUD, E.; CALMARD-ORIOU, P.; TSURUO, T.; TRONCY, J.; TREILLE, D.; FIERE, D. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. **Blood**, v.79, n.2, p.473-6, 1992.

CAMPOS, L.; ROUAULT, J. P.; SABIDO, O.; ORIOL, P.; ROUBI, N.; VASSELON, C.; ARCHIMBAUD, E.; MAGAUD, J. P.; GUYOTAT, D. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. **Blood**, v.81, n.11, p.3091-6, 1993.

CAMPOS, L.; SABIDO, O.; VIALLET, A.; VASSELON, C.; GUYOTAT, D. Expression of apoptosis-controlling proteins in acute leukemia cells. **Leuk Lymphoma**, v.33, n.5-6, p.499-509, 1999.

CHESSELLS, J. M.; HALL, E.; PRENTICE, H. G.; DURRANT, J.; BAILEY, C. C.; RICHARDS, S. M. The impact of age on outcome in lymphoblastic leukaemia; MRC UKALL X and XA compared: a report from the MRC Paediatric and Adult Working Parties. **Leukemia**, v.12, n.4, p.463-73, 1998.

CHUGANI, D. C.; KEDERSHA, N. L.; ROME, L. H. Vault immunofluorescence in the brain: new insights regarding the origin of microglia. **J Neurosci**, v.11, n.1, p.256-68, 1991.

COLE, S. P.; DEELEY, R. G. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. **Trends Pharmacol Sci**, v.27, n.8, p.438-46, 2006.

CONRADT, B. Genetic control of programmed cell death during animal development. **Annu Rev Genet**, v.43, p.493-523, 2009.

CONSOLI, U.; SANTONOCITO, A.; STAGNO, F.; FIUMARA, P.; PRIVITERA, A.; PARISI, G.; GIUSTOLISI, G. M.; PAVONE, B.; PALUMBO, G. A.; DI RAIMONDO, F.; MILONE, G.; GUGLIELMO, P.; GIUSTOLISI, R. Multidrug resistance mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, v.116, n.4, p.774-80, 2002.

CORTEZ, M. A.; SCRIDELI, C. A.; YUNES, J. A.; VALERA, E. T.; TOLEDO, S. R.; PAVONI-FERREIRA, P. C.; LEE, M. L.; PETRILLI, A. S.; BRANDALISE, S. R.; TONE, L. G. mRNA expression profile of multidrug resistance genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Low expression levels associated with a higher risk of toxic death. **Pediatr Blood Cancer**, v.53, n.6, p.996-1004, 2009.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.9, p.647-56, 2002.

COULTAS, L.; STRASSER, A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. **Semin Cancer Biol**, v.13, n.2, p.115-23, 2003.

COUTURE, L.; NASH, J. A.; TURGEON, J. The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. **Pharmacol Rev**, v.58, n.2, p.244-58, 2006.

COVELLI, A. Modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies. **Ann Oncol**, v.10 Suppl 6, p.53-59, 1999.

DAMIANI, D.; MICHELUTTI, A.; MICIELI, M.; MASOLINI, P.; STOCCHI, R.; GEROMIN, A.; ERMACORA, A.; RUSSO, D.; FANIN, R.; BACCARANI, M. P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein in de novo adult acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v.116, n.3, p.519-27, 2002.

DEAN, M.; ALLIKMETS, R. Complete characterization of the human ABC gene family. **J Bioenerg Biomembr**, v.33, n.6, p.475-9, 2001.

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **J Lipid Res**, v.42, n.7, p.1007-17, 2001.

DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). **FEBS Lett**, v.580, n.4, p.1103-11, 2006.

DEELEY, R. G.; WESTLAKE, C.; COLE, S. P. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. **Physiol Rev**, v.86, n.3, p.849-99, 2006.

DEL POETA, G.; BRUNO, A.; DEL PRINCIPE, M. I.; VENDITTI, A.; MAURILLO, L.; BUCCISANO, F.; STASI, R.; NERI, B.; LUCIANO, F.; SINISCALCHI, A.; DE FABRITIIS, P.; AMADORI, S. Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development

of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia. **Curr Cancer Drug Targets**, v.8, n.3, p.207-22, 2008.

DEL POETA, G.; VENDITTI, A.; DEL PRINCIPE, M. I.; MAURILLO, L.; BUCCISANO, F.; TAMBURINI, A.; COX, M. C.; FRANCHI, A.; BRUNO, A.; MAZZONE, C.; PANETTA, P.; SUPPO, G.; MASI, M.; AMADORI, S. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). **Blood**, v.101, n.6, p.2125-31, 2003.

DEN BOER, M. L.; PIETERS, R.; KAZEMIER, K. M.; ROTTIER, M. M.; ZWAAN, C. M.; KASPERS, G. J.; JANKA-SCHAUB, G.; HENZE, G.; CREUTZIG, U.; SCHEPER, R. J.; VEERMAN, A. J. Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia. **Blood**, v.91, n.6, p.2092-2098, 1998.

DHOOGHE, C.; DE MOERLOOSE, B.; LAUREYS, G.; KINT, J.; FERSTER, A.; DE BACQUER, D.; PHILIPPE, J.; BENOIT, Y. P-glycoprotein is an independent prognostic factor predicting relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of a 6-year prospective study. **Br J Haematol**, v.105, n.3, p.676-83, 1999.

DUHEM, C.; RIES, F.; DICATO, M. What Does Multidrug Resistance (MDR) Expression Mean in the Clinic? **Oncologist**, v.1, n.3, p.151-158, 1996.

DURDUX, M.; GRUNWALD, D.; GAUTIER, T.; RONOT, X.; BOUTONNAT, J. Fluorescence-based assessment of LRP activity: a comparative study. **Anticancer Res**, v.24, n.2B, p.725-32, 2004.

EJENDAL, K. F.; HRYCYNA, C. A. Differential sensitivities of the human ATP-binding cassette transporters ABCG2 and P-glycoprotein to cyclosporin A. **Mol Pharmacol**, v.67, n.3, p.902-11, 2005.

ENDICOTT, J. A.; LING, V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. **Annu Rev Biochem**, v.58, p.137-71, 1989.

ESTEY, E. H. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. **Cancer**, v.92, n.5, p.1059-1073, 2001.

FALINI, B.; NICOLETTI, I.; MARTELLI, M. F.; MECUCCI, C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. **Blood**, v.109, n.3, p.874-85, 2007.

FILIPITS, M.; POHL, G.; STRANZL, T.; SUCHOMEL, R. W.; SCHEPER, R. J.; JAGER, U.; GEISSLER, K.; LECHNER, K.; PIRKER, R. Expression of the lung resistance protein predicts poor outcome in de novo acute myeloid leukemia. **Blood**, v.91, n.5, p.1508-13, 1998.

FILIPITS, M.; SUCHOMEL, R. W.; ZOCHBAUER, S.; BRUNNER, R.; LECHNER, K.; PIRKER, R. Multidrug resistance-associated protein in acute myeloid leukemia: No impact on treatment outcome. **Clin Cancer Res**, v.3, n.8, p.1419-25, 1997.

FLENS, M. J.; IZQUIERDO, M. A.; SCHEFFER, G. L.; FRITZ, J. M.; MEIJER, C. J.; SCHEPER, R. J.; ZAMAN, G. J. Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. **Cancer Res**, v.54, n.17, p.4557-63, 1994.

FOJO, A. T.; UEDA, K.; SLAMON, D. J.; POPLACK, D. G.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, n.1, p.265-9, 1987.

FROHLING, S.; SCHLENK, R. F.; BREITRUCK, J.; BENNER, A.; KREITMEIER, S.; TOBIS, K.; DOHNER, H.; DOHNER, K. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. **Blood**, v.100, n.13, p.4372-80, 2002.

GERSTEIN, A. S. **Molecular Biology. Problem Solver: A Laboratory Guide**. New York: Wiley Liss, 2001.

GOELLNER, S.; STEINBACH, D.; SCHENK, T.; GRUHN, B.; ZINTL, F.; RAMSAY, E.; SALUZ, H. P. Childhood acute myelogenous leukaemia: association between PRAME, apoptosis- and MDR-related gene expression. **Eur J Cancer**, v.42, n.16, p.2807-14, 2006.

GOKBUGET, N.; HOELZER, D. Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults. **Rev Clin Exp Hematol**, v.6, n.2, p.114-41; discussion 200-2, 2002.

GOL B, J.; ZAGOZDZON, R.; KAMINSKI, R.; KOZAR, K.; GRYSKA, K.; IZYCKI, D.; MACKIEWICZ, A.; STOKLOSA, T.; GIERMASZ, A.; LASEK, W.; JAKOBISIAK, M. Potentiated antitumor effectiveness of combined chemo-immunotherapy with interleukin-12 and 5-fluorouracil of L1210 leukemia in vivo. **Leukemia**, v.15, n.4, p.613-620, 2001.

GOLDIE, J. H. Drug resistance in cancer: a perspective. **Cancer Metastasis Rev**, v.20, n.1-2, p.63-8, 2001.

GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annu Rev Biochem**, v.62, p.385-427, 1993.

GRAFF, C. L.; POLLACK, G. M. Drug transport at the blood-brain barrier and the choroid plexus. **Curr Drug Metab**, v.5, n.1, p.95-108, 2004.

GREAVES, M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. **Eur J Cancer**, v.35, n.14, p.1941-53, 1999.

GREAVES, M. F. Stem cell origins of leukaemia and curability. **Br J Cancer**, v.67, n.3, p.413-23, 1993.

GUERCI, A.; MERLIN, J. L.; MISSOUM, N.; FELDMANN, L.; MARCHAL, S.; WITZ, F.; ROSE, C.; GUERCI, O. Predictive value for treatment outcome in acute myeloid leukemia of cellular daunorubicin accumulation and P-glycoprotein expression simultaneously determined by flow cytometry. **Blood**, v.85, n.8, p.2147-53, 1995.

GUIMARÃES, J. R. Q. **Manual de Oncologia**. 1. São Paulo: BBS Editora, 2004.

HAFERLACH, T.; KERN, W.; SCHNITTGER, S.; SCHOCH, C. Modern diagnostics in acute leukemias. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.56, n.2, p.223-234, 2005.

HAIMEUR, A.; CONSEIL, G.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Mutations of charged amino acids in or near the transmembrane helices of the second membrane spanning domain differentially affect the substrate specificity and transport activity of the multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1). **Mol Pharmacol**, v.65, n.6, p.1375-85, 2004.

HAMMOND, C. L.; MARCHAN, R.; KRANCE, S. M.; BALLATORI, N. Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. **J Biol Chem**, v.282, n.19, p.14337-47, 2007.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57-70, 2000.

HEMBRUFF, S. L.; LABERGE, M. L.; VILLENEUVE, D. J.; GUO, B.; VEITCH, Z.; CECCHETTO, M.; PARISENTI, A. M. Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance. **BMC Cancer**, v.8, p.318, 2008.

HERR, I.; DEBATIN, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v.98, n.9, p.2603-14, 2001.

HIROSE, M. The process behind the expression of mdr-1/P-gp and mrp/MRP in human leukemia/lymphoma. **Anticancer Res**, v.29, n.4, p.1073-7, 2009.

HUANG, Y.; SADEE, W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. **Cancer Lett**, v.239, n.2, p.168-82, 2006.

HUH, H. J.; PARK, C. J.; JANG, S.; SEO, E. J.; CHI, H. S.; LEE, J. H.; LEE, K. H.; SEO, J. J.; MOON, H. N.; GHIM, T. Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug

resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) mRNA expression in acute leukemia. **J Korean Med Sci**, v.21, n.2, p.253-8, 2006.

INCA Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

ISHIKAWA, T.; BAO, J. J.; YAMANE, Y.; AKIMARU, K.; FRINDRICH, K.; WRIGHT, C. D.; KUO, M. T. Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. **J Biol Chem**, v.271, n.25, p.14981-14988, 1996.

IZQUIERDO, M. A.; SCHEFFER, G. L.; SCHROEIJERS, A. B.; DE JONG, M. C.; SCHEPER, R. J. Vault-related resistance to anticancer drugs determined by the expression of the major vault protein LRP. **Cytotechnology**, v.27, n.1-3, p.137-48, 1998.

JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** Lion: IARC Press, 2001.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nat Rev Cancer**, v.4, n.4, p.253-265, 2004.

KAKIHARA, T.; TANAKA, A.; WATANABE, A.; YAMAMOTO, K.; KANTO, K.; KATAOKA, S.; OGAWA, A.; ASAMI, K.; UCHIYAMA, M. Expression of multidrug resistance-related genes does not contribute to risk factors in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Int**, v.41, n.6, p.641-7, 1999.

KANNAN, K.; JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, v.7, n.3, p.153-163, 2000.

KARAKAS, T.; MAURER, U.; WEIDMANN, E.; MIETHING, C. C.; HOELZER, D.; BERGMANN, L. High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. **Ann Oncol**, v.9, n.2, p.159-65, 1998.

KARDOS, G.; ZWAAN, C. M.; KASPERS, G. J.; DE-GRAAF, S. S.; DE BONT, E. S.; POSTMA, A.; BOKKERINK, J. P.; WEENING, R. S.; VAN DER DOES-VAN DEN BERG, A.; VAN WERING, E. R.; KORBIJN, C.; HAHLEN, K. Treatment strategy and results in children treated on three Dutch Childhood Oncology Group acute myeloid leukemia trials. **Leukemia**, v.19, n.12, p.2063-71, 2005.

KASPERS, G. J.; CREUTZIG, U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. **Leukemia**, v.19, n.12, p.2025-9, 2005.

KAST, C.; GROS, P. Topology mapping of the amino-terminal half of multidrug resistance-associated protein by epitope insertion and immunofluorescence. **J Biol Chem**, v.272, n.42, p.26479-87, 1997.

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Exp Cell Res**, v.256, n.1, p.42-49, 2000.

KEBRIAIEI, P.; ANASTASI, J.; LARSON, R. A. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and classification. **Best Pract Res Clin Hematology**, v.15, n.4, p.597-621, 2003.

KELEKAR, A.; THOMPSON, C. B. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. **Trends Cell Biol**, v.8, n.8, p.324-30, 1998.

KLIGERMAN, J. Fundamentos para uma Política Nacional de Prevenção e Controle do Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, p.3-7, 2002.

KLUCK, R. M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D. R.; NEWMAYER, D. D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v.275, n.5303, p.1132-6, 1997.

KOURTI, M.; VAVATSI, N.; GOMBAKIS, N.; SIDI, V.; TZIMAGIORGIS, G.; PAPAGEORGIOU, T.; KOLIOUSKAS, D.; ATHANASSIADOU, F. Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical

outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Int J Hematol**, v.86, n.2, p.166-73, 2007.

KRAILO, M. D.; BERNSTEIN, L.; SULLIVAN-HALLEY, J.; HAMMOND, G. D. Patterns of enrollment on cooperative group studies. An analysis of trends from the Los Angeles County Cancer Surveillance Program. **Cancer**, v.71, n.10 Suppl, p.3325-30, 1993.

KRISHNA, R.; MAYER, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. **Eur J Pharm Sci**, v.11, n.4, p.265-283, 2000.

KRUH, G. D. Introduction to resistance to anticancer agents. **Oncogene**, v.22, n.47, p.7262-4, 2003.

KUENDGEN, A.; GERMING, U. Emerging treatment strategies for acute myeloid leukemia (AML) in the elderly. **Cancer Treat Rev**, v.35, n.2, p.97-120, 2009.

KUMTA, S. M.; ZHU, Q. S.; LEE, K. M.; GRIFFITH, J.; CHOW, L. T.; LEUNG, P. C. Clinical significance of P-glycoprotein immunohistochemistry and doxorubicin binding assay in patients with osteosarcoma. **Int Orthop**, v.25, n.5, p.279-82, 2001.

KUO, M. T. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v.11, n.1, p.99-133, 2009.

KUO, M. T.; BAO, J.; FURUICHI, M.; YAMANE, Y.; GOMI, A.; SAVARAJ, N.; MASUZAWA, T.; ISHIKAWA, T. Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues. **Biochem Pharmacol**, v.55, n.5, p.605-615, 1998.

KUSENDA, J. Bcl-2 family proteins and leukemia. Minireview. **Neoplasma**, v.45, n.3, p.117-122, 1998.

KUSS, B. J.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P.; WILLMAN, C. L.; KOPECKY, K. J.; WOLMAN, S. R.; EYRE, H. J.; LANE, S. A.;

NANCARROW, J. K.; WHITMORE, S. A.; ET AL. Deletion of gene for multidrug resistance in acute myeloid leukaemia with inversion in chromosome 16: prognostic implications. **Lancet**, v.343, n.8912, p.1531-4, 1994.

LAUPEZE, B.; AMIOT, L.; DRENOU, B.; BERNARD, M.; BRANGER, B.; GROSSET, J. M.; LAMY, T.; FAUCHET, R.; FARDEL, O. High multidrug resistance protein activity in acute myeloid leukaemias is associated with poor response to chemotherapy and reduced patient survival. **Br J Haematol**, v.116, n.4, p.834-8, 2002.

LAURIA, F.; RASPADORI, D.; RONDELLI, D.; VENTURA, M. A.; FIACCHINI, M.; VISANI, G.; FORCONI, F.; TURA, S. High bcl-2 expression in acute myeloid leukemia cells correlates with CD34 positivity and complete remission rate. **Leukemia**, v.11, n.12, p.2075-8, 1997.

LAUTIER, D.; CANITROT, Y.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. **Biochem Pharmacol**, v.52, n.7, p.967-77, 1996.

LEGRAND, O.; ZITTOUN, R.; MARIE, J. P. Role of MRP1 in multidrug resistance in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v.13, n.4, p.578-584, 1999.

LEITH, C. P.; KOPECKY, K. J.; CHEN, I. M.; EIJDENS, L.; SLOVAK, M. L.; MCCONNELL, T. S.; HEAD, D. R.; WEICK, J.; GREVER, M. R.; APPELBAUM, F. R.; WILLMAN, C. L. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. **Blood**, v.94, n.3, p.1086-99, 1999.

LEITH, C. P.; KOPECKY, K. J.; GODWIN, J.; MCCONNELL, T.; SLOVAK, M. L.; CHEN, I. M.; HEAD, D. R.; APPELBAUM, F. R.; WILLMAN, C. L. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. **Blood**, v.89, n.9, p.3323-9, 1997.

LEONESSA, F.; CLARKE, R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v.10, n.1, p.43-73, 2003.

LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.204, n.3, p.216-37, 2005.

LEVI, F.; LUCCHINI, F.; NEGRI, E.; BARBUI, T.; LA VECCHIA, C. Trends in mortality from leukemia in subsequent age groups. **Leukemia**, v.14, n.11, p.1980-5, 2000.

LIST, A. F.; SPIER, C. S.; GROGAN, T. M.; JOHNSON, C.; ROE, D. J.; GREER, J. P.; WOLFF, S. N.; BROXTERMAN, H. J.; SCHEFFER, G. L.; SCHEPER, R. J.; DALTON, W. S. Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. **Blood**, v.87, n.6, p.2464-9, 1996.

LOCKHART, A. C.; TIRONA, R. G.; KIM, R. B. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy. **Mol Cancer Ther**, v.2, n.7, p.685-98, 2003.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. E. **Molecular Cell Biology**. 4. New York: W. H. FREEMAN, 2000.

LOE, D. W.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. **Eur J Cancer**, v.32A, n.6, p.945-57, 1996.

LOURENCO, J. J.; MAIA, R. C.; SCHEINER, M. A.; VASCONCELOS, F. C.; MOREIRA, M. A. Genomic variation at the MDR1 promoter and P-glycoprotein expression and activity in AML patients. **Leuk Res**, v.32, n.6, p.976-9, 2008.

LU, C.; SHERVINGTON, A. Chemoresistance in gliomas. **Mol Cell Biochem**, v.312, n.1-2, p.71-80, 2008.

LUQMANI, Y. A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. **Med Princ Pract**, v.14 Suppl 1, p.35-48, 2005.

MAHADEVAN, D.; LIST, A. F. Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies. **Blood**, v.104, n.7, p.1940-51, 2004.

MAHJOUBI, F.; GOLALIPOUR, M.; GHAVAMZADEH, A.; ALIMOGHADDAM, K. Expression of MRP1 gene in acute leukemia. **Sao Paulo Med J**, v.126, n.3, p.172-9, 2008.

MARIE, J. P. Drug resistance in hematologic malignancies. **Curr Opin Oncol**, v.13, n.6, p.463-9, 2001.

MARTINEZ, A.; SAN MIGUEL, J. F.; VALVERDE, B.; BAREZ, A.; MORO, M. J.; GARCIA-MARCOS, M. A.; PEREZ-SIMON, J. A.; VIDRIALES, B.; ORFAO, A. Functional expression of MDR-1 in acute myeloid leukemia: correlation with the clinical-biological, immunophenotypical, and prognostic disease characteristics. **Ann Hematol**, v.75, n.3, p.81-86, 1997.

MAUNG, Z. T.; MACLEAN, F. R.; REID, M. M.; PEARSON, A. D.; PROCTOR, S. J.; HAMILTON, P. J.; HALL, A. G. The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukaemia. **Br J Haematol**, v.88, n.1, p.105-9, 1994.

MENENDEZ, P.; VARGAS, A.; BUENO, C.; BARRENA, S.; ALMEIDA, J.; DE SANTIAGO, M.; LOPEZ, A.; ROA, S.; SAN MIGUEL, J. F.; ORFAO, A. Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. **Leukemia**, v.18, n.3, p.491-498, 2004.

MICHELIELI, M.; DAMIANI, D.; ERMACORA, A.; MASOLINI, P.; RASPADORI, D.; VISANI, G.; SCHEPER, R. J.; BACCARANI, M. P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance associated protein in de novo acute non-lymphocytic leukaemias: biological and clinical implications. **Br J Haematol**, v.104, n.2, p.328-35, 1999.

MOON, J. H.; SOHN, S. K.; LEE, M. H.; JANG, J. H.; KIM, K.; JUNG, C. W.; KIM, D. H. BCL2 gene polymorphism could predict the

treatment outcomes in acute myeloid leukemia patients. **Leuk Res**, v.34, n.2, p.166-72, 2009.

MOSSINK, M. H.; VAN ZON, A.; SCHEPER, R. J.; SONNEVELD, P.; WIEMER, E. A. Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? **Oncogene**, v.22, n.47, p.7458-67, 2003.

MULLER, M.; MEIJER, C.; ZAMAN, G. J.; BORST, P.; SCHEPER, R. J.; MULDER, N. H.; DE VRIES, E. G.; JANSEN, P. L. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.26, p.13033-7, 1994.

MUSTO, P.; MELILLO, L.; LOMBARDI, G.; MATERA, R.; DI GIORGIO, G.; CAROTENUTO, M. High risk of early resistant relapse for leukaemic patients with presence of multidrug resistance associated P-glycoprotein positive cells in complete remission. **Br J Haematol**, v.77, n.1, p.50-3, 1991.

NCCN. **NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Myeloid Leukemia** Disponível em:
<http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp>.
Acesso em: 12 de fevereiro de 2010.

NOTARBARTOLO, M.; CERVELLO, M.; POMA, P.; DUSONCHET, L.; MELI, M.; D'ALESSANDRO, N. Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells. **Oncol Rep**, v.11, n.1, p.133-6, 2004.

OGRETMEN, B.; BARREDO, J. C.; SAFA, A. R. Increased expression of lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein messenger RNA in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, v.22, n.1, p.45-9, 2000.

OH, E. J.; KAHNG, J.; KIM, Y.; KIM, M.; LIM, J.; KANG, C. S.; MIN, W. S.; CHO, B.; LEE, A.; LEE, K. Y.; KIM, W. I.; SHIM, S. I.; HAN, K. Expression of functional markers in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**, v.27, n.10, p.903-8, 2003.

ONG, Y. L.; MCMULLIN, M. F.; BAILIE, K. E.; LAPPIN, T. R.; JONES, F. G.; IRVINE, A. E. High bax expression is a good prognostic

indicator in acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**, v.111, n.1, p.182-9, 2000.

OZBEN, T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. **FEBS Lett**, v.580, n.12, p.2903-9, 2006.

PASCHKA, P.; MARCUCCI, G.; RUPPERT, A. S.; MROZEK, K.; CHEN, H.; KITTLES, R. A.; VUKOSAVLJEVIC, T.; PERROTTI, D.; VARDIMAN, J. W.; CARROLL, A. J.; KOLITZ, J. E.; LARSON, R. A.; BLOOMFIELD, C. D. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. **J Clin Oncol**, v.24, n.24, p.3904-11, 2006.

PATEL, T.; GORES, G. J. Apoptosis and hepatobiliary disease. **Hepatology**, v.21, n.6, p.1725-41, 1995.

PEJOVIC, T.; SCHWARTZ, P. E. Leukemias. **Clin Obstet Gynecol**, v.45, n.3, p.866-78, 2002.

PENSON, R. T.; OLIVA, E.; SKATES, S. J.; GLYPTIS, T.; FULLER, A. F., JR.; GOODMAN, A.; SEIDEN, M. V. Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples. **Gynecol Oncol**, v.93, n.1, p.98-106, 2004.

PERENTESIS, J. P. Why is age such an important independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia? **Leukemia**, v.11 Suppl 4, p.S4-7, 1997.

PIRKER, R.; WALLNER, J.; GEISSLER, K.; LINKESCH, W.; HAAS, O. A.; BETTELHEIM, P.; HOPFNER, M.; SCHERRER, R.; VALENT, P.; HAVELEC, L.; ET AL. MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. **J Natl Cancer Inst**, v.83, n.10, p.708-12, 1991.

PLASSCHAERT, S. L.; DE BONT, E. S.; BOEZEN, M.; VANDER KOLK, D. M.; DAENEN, S. M.; FABER, K. N.; KAMPS, W. A.; DE VRIES, E. G.; VELLENGA, E. Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute

lymphoblastic leukemia. **Clin Cancer Res**, v.11, n.24 Pt 1, p.8661-8668, 2005.

PLASSCHAERT, S. L.; VELLENGA, E.; DE BONT, E. S.; VAN DER KOLK, D. M.; VEERMAN, A. J.; SLUITER, W. J.; DAENEN, S. M.; DE VRIES, E. G.; KAMPS, W. A. High functional P-glycoprotein activity is more often present in T-cell acute lymphoblastic leukaemic cells in adults than in children. **Leuk Lymphoma**, v.44, n.1, p.85-95, 2003.

PUI, C. H.; CRIST, W. M. Treatment of childhood leukemias. **Curr Opin Oncol**, v.7, n.1, p.36-44, 1995.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v.339, n.9, p.605-615, 1998.

_____ Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v.354, n.2, p.166-78, 2006.

REED, C. J. Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. **Semin Hematol**, v.37, n.4 Suppl 7, p.9-16, 2000.

RIBEIRO, R. C.; RAZZOUK, B. I.; POUNDS, S.; HIJIYA, N.; PUI, C. H.; RUBNITZ, J. E. Successive clinical trials for childhood acute myeloid leukemia at St Jude Children's Research Hospital, from 1980 to 2000. **Leukemia**, v.19, n.12, p.2125-9, 2005.

ROME, L.; KEDERSHA, N.; CHUGANI, D. Unlocking vaults: organelles in search of a function. **Trends Cell Biol**, v.1, n.2-3, p.47-50, 1991.

RUBNITZ, J. E. Childhood acute myeloid leukemia. **Curr Treat Options Oncol**, v.9, n.1, p.95-105, 2008.

RUVOLO, P. P.; DENG, X.; MAY, W. S. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. **Leukemia**, v.15, n.4, p.515-522, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning A Laboratory Manual**. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMDANI, A.; VIJAPURKAR, U.; GRIMM, M. A.; SPIER, C. S.; GROGAN, T. M.; GLINSMANN-GIBSON, B. J.; LIST, A. F. Cytogenetics and P-glycoprotein (PGP) are independent predictors of treatment outcome in acute myeloid leukemia (AML). **Leuk Res**, v.20, n.2, p.175-80, 1996.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**, v.45, n.3, p.528-537, 2000.

SAUERBREY, A.; VOIGT, A.; WITTIG, S.; HAFER, R.; ZINTL, F. Messenger RNA analysis of the multidrug resistance related protein (MRP1) and the lung resistance protein (LRP) in de novo and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v.43, n.4, p.875-9, 2002.

SCHAICH, M.; SOUCEK, S.; THIEDE, C.; EHNINGER, G.; ILLMER, T. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**, v.128, n.3, p.324-32, 2005.

SCHEFFER, G. L.; WIJNGAARD, P. L.; FLENS, M. J.; IZQUIERDO, M. A.; SLOVAK, M. L.; PINEDO, H. M.; MEIJER, C. J.; CLEVERS, H. C.; SCHEPER, R. J. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. **Nat Med**, v.1, n.6, p.578-82, 1995.

SCHEPER, R. J.; BROXTERMAN, H. J.; SCHEFFER, G. L.; KAAIJK, P.; DALTON, W. S.; VAN HEIJNINGEN, T. H.; VAN KALKEN, C. K.; SLOVAK, M. L.; DE VRIES, E. G.; VAN DER VALK, P.; ET AL. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. **Cancer Res**, v.53, n.7, p.1475-9, 1993.

SCHMITT, C. A.; ROSENTHAL, C. T.; LOWE, S. W. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. **Nat Med**, v.6, n.9, p.1029-35, 2000.

SCHNEIDER, E.; COWAN, K. H.; BADER, H.; TOOMEY, S.; SCHWARTZ, G. N.; KARP, J. E.; BURKE, P. J.; KAUFMANN, S. H.

Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed acute leukemia. **Blood**, v.85, n.1, p.186-193, 1995.

SCHNITTGER, S.; KOHL, T. M.; HAFERLACH, T.; KERN, W.; HIDDEMANN, W.; SPIEKERMANN, K.; SCHOCH, C. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. **Blood**, v.107, n.5, p.1791-9, 2006.

SCHRAPPE, M.; CAMITTA, B.; PUI, C. H.; EDEN, T.; GAYNON, P.; GUSTAFSSON, G.; JANKA-SCHAUB, G. E.; KAMPS, W.; MASERA, G.; SALLAN, S.; TSUCHIDA, M.; VILMER, E. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v.14, n.12, p.2193-4, 2000.

SCHULZE-BERGKAMEN, H.; KRAMMER, P. H. Apoptosis in cancer--implications for therapy. **Semin Oncol**, v.31, n.1, p.90-119, 2004.

SCOTTO, K. W.; JOHNSON, R. A. Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target. **Mol Interv**, v.1, n.2, p.117-25, 2001.

SHAH, M.; AGARWAL, B. Recent advances in management of acute myeloid leukemia (AML). **Indian J Pediatr**, v.75, n.8, p.831-7, 2008.

SHIKAMI, M.; MIWA, H.; NISHII, K.; TAKAHASHI, T.; SEKINE, T.; MAHMUD, N.; NISHIKAWA, M.; SHIKU, H.; KAMADA, N.; KITA, K. Low BCL-2 expression in acute leukemia with t(8;21) chromosomal abnormality. **Leukemia**, v.13, n.3, p.358-368, 1999.

SHIOZAKI, E. N.; SHI, Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. **Trends Biochem Sci**, v.29, n.9, p.486-94, 2004.

SHIPLEY, J. L.; BUTERA, J. N. Acute myelogenous leukemia. **Exp Hematol**, v.37, n.6, p.649-58, 2009.

SONNEVELD, P. Multidrug resistance in haematological malignancies. **J Intern Med**, v.247, n.5, p.521-534, 2000.

SONNEVELD, P.; LIST, A. F. Chemotherapy resistance in acute myeloid leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, v.14, n.1, p.211-233, 2001.

STEINBACH, D.; FURCHTBAR, S.; SELL, W.; LENGEMANN, J.; HERMANN, J.; ZINTL, F.; SAUERBREY, A. Contrary to adult patients, expression of the multidrug resistance gene (MDR1) fails to define a poor prognostic group in childhood AML. **Leukemia**, v.17, n.2, p.470-1, 2003.

STILLER, C. A.; BENJAMIN, S.; CARTWRIGHT, R. A.; CLOUGH, J. V.; GORST, D. W.; KROLL, M. E.; ROSS, J. R.; WHEATLEY, K.; WHITTAKER, J. A.; TAYLOR, P. R.; PROCTOR, S. J. Patterns of care and survival for adolescents and young adults with acute leukaemia--a population-based study. **Br J Cancer**, v.79, n.3-4, p.658-65, 1999.

STRASSER, A.; HARRIS, A. W.; JACKS, T.; CORY, S. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. **Cell**, v.79, n.2, p.329-39, 1994.

STYCZYNSKI, J.; PIETERS, R.; HUISMANS, D. R.; SCHUURHUIS, G. J.; WYSOCKI, M.; VEERMAN, A. J. In vitro drug resistance profiles of adult versus childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v.110, n.4, p.813-8, 2000.

SUAREZ, L.; VIDRIALES, B.; GARCIA-LARANA, J.; LOPEZ, A.; MARTINEZ, R.; MARTIN-REINA, V.; TORMO, M.; GONZALEZ-SAN MIGUEL, J. D.; LAVILLA, E.; GARCIA-BOYERO, R.; ORFAO, A.; SAN MIGUEL, J. F. Multiparametric analysis of apoptotic and multi-drug resistance phenotypes according to the blast cell maturation stage in elderly patients with acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v.86, n.12, p.1287-95, 2001.

SVIRNOVSKI, A. I.; SHMAN, T. V.; SERHIYENKA, T. F.; SAVITSKI, V. P.; SMOLNIKOVA, V. V.; FEDASENKA, U. U. ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells. **Hematology**, v.14, n.4, p.204-12, 2009.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4. Geneva: WHO Press, 2008.

SWERTS, K.; DE MOERLOOSE, B.; DHOOGHE, C.; LAUREYS, G.; BENOIT, Y.; PHILIPPE, J. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Eur J Cancer**, v.42, n.3, p.295-309, 2006.

TAFURI, A.; GREGORJ, C.; PETRUCCI, M. T.; RICCIARDI, M. R.; MANCINI, M.; CIMINO, G.; MECUCCI, C.; TEDESCHI, A.; FIORITONI, G.; FERRARA, F.; DI RAIMONDO, F.; GALLO, E.; LISO, V.; FABBIANO, F.; CASCAVILLA, N.; PIZZOLO, G.; CAMERA, A.; PANE, F.; LANZA, F.; CILLONI, D.; ANNINO, L.; VITALE, A.; VEGNA, M. L.; VIGNETTI, M.; FOA, R.; MANDELLI, F. MDR1 protein expression is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.100, n.3, p.974-81, 2002.

TAYLOR, P. R.; REID, M. M.; BOWN, N.; HAMILTON, P. J.; PROCTOR, S. J. Acute lymphoblastic leukemia in patients aged 60 years and over: a population-based study of incidence and outcome. **Blood**, v.80, n.7, p.1813-7, 1992.

TESTA, U.; RICCIONI, R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v.92, n.1, p.81-94, 2007.

TOTHOVA, E.; FRICOVA, M.; STECOVA, N.; KAFKOVA, A.; ELBERTOVA, A. High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. **Neoplasma**, v.49, n.3, p.141-144, 2002.

TSIMBERIDOU, A. M.; PATERAKIS, G.; ANDROUTSOS, G.; ANAGNOSTOPOULOS, N.; GALANOPOULOS, A.; KALMANTIS, T.; MELETIS, J.; ROMBOS, Y.; SAGRIOTIS, A.; SYMEONIDIS, A.; TINIAKOU, M.; ZOUMBOS, N.; YATAGANAS, X. Evaluation of the clinical relevance of the expression and function of P-glycoprotein, multidrug resistance protein and lung resistance protein in patients with

primary acute myelogenous leukemia. **Leuk Res**, v.26, n.2, p.143-54, 2002.

TSURUO, T. Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. **Jpn J Cancer Res**, v.79, n.3, p.285-96, 1988.

VALERA, E. T.; SCRIDELI, C. A.; QUEIROZ, R. G.; MORI, B. M.; TONE, L. G. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Sao Paulo Med J**, v.122, n.4, p.166-71, 2004.

VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; SONNEVELD, P.; PIETERS, R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. **Int J Clin Pharmacol Ther**, v.38, n.3, p.94-110, 2000.

VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; VAN DER HOLT, B.; BURNETT, A. K.; KNAUF, W. U.; FEY, M. F.; VERHOEF, G. E.; VELLENGA, E.; OSSENKOPPELE, G. J.; LOWENBERG, B.; SONNEVELD, P. CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age. **Ann Hematol**, v.86, n.5, p.329-37, 2007.

VAN DER DEEN, M.; DE VRIES, E. G.; TIMENS, W.; SCHEPER, R. J.; TIMMER-BOSSCHA, H.; POSTMA, D. S. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. **Respir Res**, v.6, p.59, 2005.

VERHAAK, R. G.; GOUDSWAARD, C. S.; VAN PUTTEN, W.; BIJL, M. A.; SANDERS, M. A.; HUGENS, W.; UITTERLINDEN, A. G.; ERPELINCK, C. A.; DELWEL, R.; LOWENBERG, B.; VALK, P. J. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. **Blood**, v.106, n.12, p.3747-54, 2005.

VOLM, M.; STAMMLER, G.; ZINTL, F.; KOOMAGI, R.; SAUERBREY, A. Expression of lung resistance-related protein (LRP)

in initial and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia.

Anticancer Drugs, v.8, n.7, p.662-5, 1997.

WANG, Z. Y.; CHEN, Z. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. **Lancet Oncol**, v.1, p.101-6, 2000.

WEINBERG, R. A. **Uma célula renegada: como o câncer começa**. Rio de Janeiro: Rocco, 2000.

WHO. **Cancer** Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2010.

WOOD, P.; BURGESS, R.; MACGREGOR, A.; YIN, J. A. P-glycoprotein expression on acute myeloid leukaemia blast cells at diagnosis predicts response to chemotherapy and survival. **Br J Haematol**, v.87, n.3, p.509-14, 1994.

WUCHTER, C.; KARAWAJEW, L.; RUPPERT, V.; BUCHNER, T.; SCHOCH, C.; HAFERLACH, T.; RATEI, R.; DORKEN, B.; LUDWIG, W. D. Clinical significance of CD95, Bcl-2 and Bax expression and CD95 function in adult de novo acute myeloid leukemia in context of P-glycoprotein function, maturation stage, and cytogenetics. **Leukemia**, v.13, n.12, p.1943-1953, 1999.

WUCHTER, C.; LEONID, K.; RUPPERT, V.; SCHRAPPE, M.; BUCHNER, T.; SCHOCH, C.; HAFERLACH, T.; HARBOTT, J.; RATEI, R.; DORKEN, B.; LUDWIG, W. D. Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia. **Haematologica**, v.85, n.7, p.711-21, 2000.

YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C. N.; IBRADO, A. M.; CAI, J.; PENG, T. I.; JONES, D. P.; WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, v.275, n.5303, p.1129-32, 1997.

ZAGO, M.; FALCÃO, R.; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2005.

ZAMAN, G. J.; LANKELMA, J.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J.; DEKKER, H.; PAULUSMA, C.; OUDE ELFERINK, R. P.; BAAS, F.; BORST, P. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, n.17, p.7690-7694, 1995.

ZHANG, D. W.; COLE, S. P.; DEELEY, R. G. Identification of a nonconserved amino acid residue in multidrug resistance protein 1 important for determining substrate specificity: evidence for functional interaction between transmembrane helices 14 and 17. **J Biol Chem**, v.276, n.37, p.34966-74, 2001.

ZOCHBAUER, S.; GSUR, A.; BRUNNER, R.; KYRLE, P. A.; LECHNER, K.; PIRKER, R. P-glycoprotein expression as unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v.8, n.6, p.974-7, 1994.

ZWAAN, C. M.; KASPERS, G. J. Possibilities for tailored and targeted therapy in paediatric acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**, v.127, n.3, p.264-79, 2004.

***Anexo 1: Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo
Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos –
CEPSH/UFSC***



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARNA
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE CEP: 88040-900 - FLORIANÓPOLIS - SC
TELEFONE (048) 234-1755 - FAX (048) 234-4069

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

Parecer Consubstanciado

Projeto n: 238/03

Título do Projeto: ESTUDO DOS MECANISMOS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS EM LEUCEMIAS AGUDAS.

Pesquisador Responsável: Maria Cláudia Santos Silva

Instituição onde será realizado o estudo: HU-UFSC

Data de Apresentação ao CEP SH: 14/11/2003

Análise de pendência:

Faltava cronograma e orçamento

Pendências atendidas.

Comentários frente à Resolução CNS 196/96 e complementares: TCLE deve ser claro e acessível ao participante da pesquisa.

Parecer do CEP SH:

- Aprovado
- Aprovado "ad referendum"
- Aprovado e encaminhado ao CONEP
- Com pendências
- Não Aprovado

Data da Reunião

Florianópolis, 29 de março de 2004


Washington Portela de Souza
Sub-Coordenador CEP SH

Fonte: CONEP/ANVS - Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS.

***Anexo 2: Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo
Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil
Joana de Gusmão – CESH/HIJG***



Hospital Infantil Joana de Gusmão
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER N° 081/2008

NOME DO PROJETO: INVESTIGAÇÃO DE PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA EM LEUCEMIAS LINFÓIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS

PESQUISADOR: Júlio Araújo Zampirolo

ORIENTADORA: Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL: HIJG

DATA DO PARECER: 02/12/2008

REGISTRO NO CEP: 075/2008

GRUPO E ÁREA TEMÁTICA: Grupo III - 4.01

DOCUMENTOS SOLICITADOS	SITUAÇÃO
1.FOLHA DE ROSTO	Ver comentário
2.PROJETO DE PESQUISA	OK
3.CURRÍCULO DO PESQUISADOR	OK
4.CARTÁ DE ENCAMINHAMENTO AO CEP	OK
5.TERMO DE COMPROMISSO ÉTICO	OK
6.CONCORDÂNCIA DO SERVIÇO	OK
7.DECLARAÇÃO ASSINADA PELA DIREÇÃO DO HIJG	OK
8. SUMÁRIO DO PROJETO	OK
9. FÓRMULÁRIO DE AVALIAÇÃO ECONÔMICO FINANCEIRA	ISENTO
10. DECLARAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO E RELATÓRIO FINAL	OK
Comentário: Modificar campos 5 e 6 e Preencher unitermos (campo 8)	

OBJETIVOS

Objetivo geral: Estudar a expressão de proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MDR1/Pg-P, MRP e LRP) como alvo de diagnóstico, avaliação de prognóstico e evolução da doença.

Objetivos específicos:

- Analisar a marcação imunofenotípica por citometria de fluxo das amostras de

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152
Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina
Fone: (48) 32519092

Registro aprovação no CONEP, conforme Carta Circular n° 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.

e-mail: cep@hjg.usc.br

pacientes atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital Infantil Joana de Gusmão para caracterização diagnóstica de LLA.

- Investigar a expressão das proteínas de resistência (MDR1/P-gp, MRP, LRP) nos blastos dos pacientes diagnosticados com LLA, no momento do diagnóstico.
- Avaliar a expressão dos genes MDR1/P-gp, MRP e LRP nos blastos dos pacientes diagnosticados de LLA, no momento do diagnóstico.

SUMÁRIO DO PROJETO

Trata-se de uma pesquisa prospectiva, exploratória, que será desenvolvida no Laboratório de Oncologia Experimental e Hematopatias e no Laboratório de Biologia Molecular da UFSC, além da possível participação do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas, com financiamento assegurado pela CNPq. Serão incluídas 100 amostras de sangue de crianças com LLA, atendidas no HIJG, onde serão realizadas as seguintes análises: obtenção de células blásticas, imunofenotipagem, reação transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase.

JUSTIFICATIVA

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma desordem maligna resultante da proliferação clonal de células progenitoras linfóides T ou B. O fato de 20% das crianças com LLA atingem a remissão clínica após a fase inicial de quimioterapia e sofrem recaídas da doença, e que dificilmente são curadas, sugere que os critérios atualmente adotados na classificação da LLA não são suficientes para avaliar a resposta ao tratamento e a evolução clínica; e há necessidade de investigação de novos alvos de diagnóstico, avaliação de prognóstico e evolução da doença.

METODOLOGIA

1. DELINEAMENTO – Estudo prospectivo, exploratório, experimental
2. CÁLCULO E TAMANHO DA AMOSTRA – Por conveniência – 100 pacientes
3. PARTICIPANTES DE GRUPOS ESPECIAIS – Menores de 18 anos
4. RECRUTAMENTO – Pacientes atendidos no HIJG
5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO / EXCLUSÃO – Os critérios de inclusão estão descritos no projeto. – Ver comentário 1
6. PONDERAÇÃO ENTRE RISCOS – BENEFÍCIOS – A pesquisa não implica em riscos físicos

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152
Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina
Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.

e-mail: cep@hijg.saude.sc.gov.br

adicionais aos participantes

- 7.USO DE PLACEBO OU WASH-OUT - Não se aplica
- 8.MONITORAMENTO E SEGURANÇA DOS DADOS – Não descritos – Ver comentário 2
- 11.AVALIAÇÃO DOS DADOS - OK
- 12.PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE – Ver comentário 3
- 13.PREOCUPAÇÃO COM OS ASPECTOS ÉTICOS - Sim
- 14.CRONOGRAMA - OK
15. PROTOCOLO DE PESQUISA – Não apresentado
- 16.ORÇAMENTO – Pesquisa com financiamento da CNPq

Comentários:

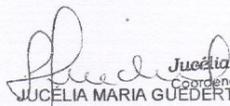
1. Deve ser considerado como critério de exclusão a não aceitação, por parte de pais, responsáveis ou crianças maiores, em participar da pesquisa.
2. Gostaríamos de saber como será realizado o descarte do material excedente. Lembramos que segundo a Resol 196/96, todos os dados coletados referentes à pesquisa deverão ser armazenados em local seguro, sob a tutela do pesquisador, por um período de cinco anos, e após, incinerados.
3. Sugerimos que os protocolos de pesquisa e as lâminas sejam identificados pelos números de registro, ou iniciais, ou códigos, para manter a confidencialidade dos dados e resguardar a privacidade da criança doente.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE) - Adequado

PARECER FINAL

APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

- Informamos que o presente parecer foi analisado e aprovado em reunião deste comitê, na data de 02/12/2008
- Conforme Resolução 196/92, capítulo III.2.h, o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios periódicos sobre o andamento da pesquisa e relatório final. No *site*: www.saude.sc.gov.br/hjlg/CEP.htm, está disponibilizado modelo. Seu primeiro relatório está previsto para JUNHO DE 2009.


JUCÉLIA MARIA GUEDERT
 Coordenadora do CEP-HJLG

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - HJLG.

CEP- HJLG - Rua Rui Barbosa, 152
 Bairro Agrônômica, Florianópolis, Santa Catarina
 Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular n° 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.

e-mail: cep@hjlsc.saude.sc.gov.br

Anexo 3: Síndromes Mielodisplásicas: Aspectos Moleculares, Laboratoriais e a Classificação OMS 2008

Artigo Publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Síndromes mielodisplásicas: Aspectos moleculares, laboratoriais e a classificação OMS 2008

Myelodysplastic syndrome: Molecular and laboratorial aspects and the 2008 WHO classification

Ana Carolina R. Moraes¹

Marley A. Lício²

Listiane Pagnussat²

Joanita A. G. Del Moral³

Maria Cláudia Santos-Silva⁴

As síndromes mielodisplásicas (SMDs) são caracterizadas por uma desordem clonal de células primordiais (stem cell) e hematopoese ineficaz que levam à displasia de uma ou mais linhagens celulares da medula óssea, citopenias periféricas e instabilidade genética, as quais aumentam o risco de transformação à leucemia mieloide aguda. Esse grupo heterogêneo de doenças hematopoéticas pode surgir como doença primária, que possui etiologia variada e não completamente definida, ou secundária ao tratamento quimioterápico ou radioterápico para outras neoplasias. O surgimento e aprimoramento de tecnologias de diagnóstico geraram uma melhor compreensão dos processos envolvidos na gênese e evolução das SMDs, o que possibilitou o desenvolvimento de marcadores de diagnóstico e acompanhamentos cada vez mais precoces e específicos. No ano de 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) redefiniu os critérios para classificação das SMDs, dividindo-as em sete subgrupos. Nessa classificação foram incluídos novos aspectos imunofenotípicos, genéticos, citomorfológicos e moleculares, o que tornou o domínio e o acesso a tecnologias de ponta imprescindíveis para a realização do diagnóstico das SMDs. Apesar dos avanços tecnológicos, alguns pontos, como as bases moleculares da transformação de SMD para LMA, ainda não estão bem esclarecidos, fazendo necessária a continuação de estudos nessa área. Diante disso, essa revisão busca compilar dados atuais dos aspectos moleculares e laboratoriais das SMDs. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.

Palavras-chave: Síndrome mielodisplásica; Classificação OMS 2008; imunofenotipagem.

Introdução

As síndromes mielodisplásicas (SMDs) constituem um grupo heterogêneo de doenças hematopoéticas que acometem indivíduos de todas as idades, sobretudo adultos.^{1,4} As SMDs são originadas no microambiente medular, a partir de uma mutação somática das células progenitoras hema-

topoéticas (stem cell),^{3,5} o que leva a uma desordem nas vias de sinalização intracelular, resultando em um aumento da apoptose nessas células.^{6,7} Dessa forma, essa hemopatia caracteriza-se por hematopoese ineficaz, com displasia de uma ou mais linhagens celulares da medula óssea (MO), citopenias periféricas,^{2,3} aumento do número de mieloblastos no sangue periférico (SP) e/ou MO^{8,9} e instabilidade genética.^{2,3,5}

¹Farmacêutica-Bioquímica.

²Aluna do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

³Professora do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal de Santa Catarina.

⁴Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis-SC.

Correspondência: Maria Cláudia Santos-Silva
Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário - HU/Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Universitário – Trindade
88040-970 – Florianópolis-SC – Brasil
Tel.: (+55 48) 3721-8146 / Fax: (+55 48) 3721-9542
E-mail: maclau@ccs.ufsc.br

A presença da instabilidade genética aumenta o risco de a SMD evoluir para leucemia mieloblástica aguda (LMA),¹⁰⁻¹² ou, em raros casos, para leucemia linfoblástica aguda (LLA).^{11,13}

Quanto à sua etiologia, a SMD pode ser classificada como SMD primária ou *de novo* e secundária. A doença primária não possui uma etiologia totalmente elucidada, sabe-se que ela pode advir de infecções virais, exposição ao benzeno, radiações ionizantes,^{6,8,14} e, mais raramente, de anormalidades congênitas.^{14,15} Alguns trabalhos relatam que mutações em genes que participam da via de sinalização celular e defeitos nos mecanismos de reparo de DNA são fatores de risco para o desenvolvimento de SMD *de novo*.^{12,16}

A SMD secundária (SMD-t) é resultante do tratamento quimioterápico, principalmente com agentes alquilantes, ou radioterápico,^{6,15} e apresenta um curso clínico mais agressivo que a SMD *de novo*. O seu desenvolvimento, geralmente, ocorre de quatro a sete anos após a exposição inicial ao agente e corresponde a, aproximadamente, 10% do total de casos de SMD.^{6,17}

Na SMD, os sintomas clínicos comumente encontrados são fadiga, palidez, fraqueza^{6,18} e dispnéia.¹⁸ Além disso, podem-se observar infecções devido à leucopenia.¹⁸ Outros achados comuns, como púrpura e complicações hemorrágicas, são resultados da plaquetopenia e disfunção plaquetária presentes na maioria dos indivíduos com SMD.¹⁹ Como visto, os sinais e sintomas são inespecíficos, sendo assim o diagnóstico laboratorial é determinante.

Com o advento dos novos métodos de diagnóstico laboratorial, como a citometria de fluxo, o diagnóstico de SMD tornou-se mais evidente. Além disso, acredita-se que as melhorias na assistência médica geriátrica, associadas ao aumento da longevidade da população, também são responsáveis pelo aumento do número de novos casos de SMD.^{12,18}

A incidência mundial de SMD é de 3 a 5/100.000 habitantes/ano e cresce exponencialmente com o avanço da idade, chegando a mais de 20/100.000 habitantes/ano na faixa etária superior a 70 anos.¹⁴ No Brasil, a incidência de SMD ainda é desconhecida e a realização de estudos epidemiológicos se faz necessária.

Aspectos moleculares

Como visto anteriormente, a hematopoese ineficaz na SMD deve-se a um microambiente medular anormal que induz à morte precoce das células progenitoras hematopoéticas (CPH), por apoptose.^{6,7,20} Fisiologicamente, o processo de apoptose celular ocorre por duas vias de sinalização denominadas de vias intrínseca e extrínseca da apoptose, as quais são reguladas por fatores anti e pró-apoptóticos.⁶ A via intrínseca de sinalização celular da apoptose envolve a desregulação mitocondrial. Na SMD, a apoptose é marcada pelo acúmulo de ferro na forma de ferritina nas mitocôndrias dos sideroblastos,^{6,7} consequentemente leva à formação de

espécies reativas de oxigênio, as quais alteram o potencial da membrana mitocondrial, culminando na liberação de citocromo-c e posterior ativação da via das caspases, o que acarreta a morte celular pela via intrínseca.⁶

Vários tipos de mutações, como monossomias ou deleções, são observadas na maioria dos pacientes com SMD, acarretando uma proliferação clonal da CPH na MO, as quais conferem vantagem proliferativa a essas células.^{12,16}

A SMD pode evoluir para LMA.^{6,12} Normalmente, a diferenciação entre SMD e LMA não apresenta dificuldades. No entanto, em algumas situações, é a diferenciação entre elas pode ser desafiadora, principalmente nos casos em que, ao diagnóstico, o paciente apresenta uma porcentagem de mieloblastos em SP e/ou MO entre 15% e 19%, uma história subclínica de SMD²¹ ou um quadro de LMA *de novo* com displasia de múltiplas linhagens.^{8,22} Outro desafio é determinar o momento em que um indivíduo com SMD evoluiu para um quadro de LMA e deve, portanto, ter seu tratamento alterado. O processo pelo qual essa evolução ocorre é ainda muito controverso e alguns critérios podem ser utilizados no diagnóstico diferencial (Tabela 1).^{6,10}

Assim como a SMD, a LMA é uma doença clonal que apresenta hiperplasticidade medular devido ao aumento da proliferação celular e redução da produção de células normais. No entanto, na LMA geralmente observa-se a redução das três linhagens celulares (eritroide, granulocítica e plaquetária),⁶ enquanto na SMD existe a diminuição de uma, duas ou três linhagens.²⁶ Na SMD existe uma desordem na diferenciação celular e aumento da morte celular (apoptose), enquanto na LMA ocorre um bloqueio na diferenciação e morte celular reduzida.⁶ Outra característica que distingue a SMD da LMA é a presença de alterações cromossômicas específicas, como as translocações do tipo t(15; 17), t(8; 21) e t(16; 16) que são vistas quase exclusivamente em casos de LMA. Já as aberrações inv(3), del(5q), del(5), del(7q) e/ou del(7) são vistas em ambas as neoplasias. Vale ressaltar que os casos de SMD que apresentam as alterações genéticas acima citadas, frequentemente evoluem para LMA em um curto período de tempo.^{6,12,14}

Devido à heterogeneidade da patogênese da SMD, o seu curso clínico e prognóstico são altamente variáveis.

Tabela 1. Diferenças entre SMD e LMA⁶

	SMD	LMA
Alterações cromossômicas	Deleção do cromossoma 5 e/ou 7	t(8;21); t(16;16); t(15;17)
Morfologia	Displasia de núcleo e citoplasma	Normal, em alguns casos bestonete de Auer
Apoptose	Alta	Baixa
Diferenciação celular	Desordem	Bloqueio

O Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) das SMDs recebeu aceitação internacional para a estimativa do prognóstico de pacientes com SMD. No entanto, esse escore não é suficiente para auxiliar na escolha da intervenção terapêutica. Por isso, seria de grande auxílio no tratamento do paciente com SMD o estabelecimento de novos marcadores moleculares que reflitam claramente a progressão da doença.

Como visto, a regulação da apoptose é de extrema importância na patogênese e progressão das malignidades hematológicas. Devido a isto, muitos grupos têm pesquisado a utilização de proteínas reguladores da apoptose como novos marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico de SMD.²³⁻²⁶ Um estudo com 42 pacientes avaliou a expressão das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) em indivíduos com SMD e LMA secundária à SMD como marcador de diferenciação entre SMD e LMA *de novo* e marcador de evolução de SMD para LMA. Nesse trabalho, constatou-se que indivíduos com SMD e com LMA *de novo* apresentam um significativo aumento na expressão de survivina, cIAP1, NAIP e XIAP quando comparados com amostras controles de indivíduos normais. Ainda nesse estudo, foi observado que na SMD o aumento da expressão de cIAP1 é significativamente maior e da XIAP significativamente menor do que na LMA *de novo*, e que pacientes com LMA secundária à SMD possuíam baixa expressão de XIAP, quando comparados com indivíduos com a LMA *de novo*.²⁶ Gianelli e cols.²⁵ avaliaram a expressão da survivina em indivíduos com SMD como um marcador de prognóstico. Esse estudo demonstrou que a alta expressão de survivina está relacionada com uma SMD de baixo risco, enquanto na SMD de alto risco os níveis de expressão diminuem.

Os membros da família Bcl-2 são importantes reguladores da via da apoptose, apresentando tanto funções pró-apoptóticas quanto antiapoptóticas.²⁷ A desregulação dos membros dessa família já foi demonstrada numa variedade de neoplasias hematológicas.^{28,29} Um estudo comparou a expressão de membros pró-apoptóticos (Bax e Bad) e antiapoptóticos (Bcl-2 e Bcl-X_L) da família Bcl-2 em progenitores CD34⁺ na SMD constatando que, no seu estágio inicial, a SMD apresenta maiores níveis de Bax/Bad do que de Bcl-2/Bcl-X_L. Nesse mesmo trabalho, evidenciou-se uma significativa diminuição dos membros pró-apoptóticos em relação aos antiapoptóticos durante a progressão da doença.³⁰

Além das proteínas relacionadas à regulação das vias da apoptose, outras proteínas estão sendo investigadas como possíveis marcadores de prognóstico e progressão da SMD. A Bmi-1 é uma proteína necessária para a regulação da renovação de células hematopoéticas em adultos. Grupos demonstraram que a superexpressão do gene *Bmi1* pode estar relacionada com a proliferação de células neoplásicas^{31,34} e progressão de malignidades hematopoéticas.³⁵⁻³⁸ Mihara *et al.*,³⁴ em um estudo com 51 pacientes recém-diagnosticados com SMD ou LMA secundária à SMD, demonstraram que a positividade de Bmi-1 em células CD34⁺ correlaciona-se positivamente com o IPSS, sugerindo que a positividade dessa proteína em células CD34⁺ seja um preditor de progressão e prognóstico da SMD. O prognóstico desfavorável apresentado pelos pacientes com LMA secundária à SMD torna o diagnóstico diferencial dessa ainda mais imprevisível. Esse prognóstico desfavorável pode estar relacionado às proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR)^{39,40} e estudos têm avaliado a possível utilização dessas protei-

Tabela 2. Alterações hematológicas periféricas observadas na SMD³

Série Eritroide	Série granulocítica	Série Monocítica	Série megacariocítica
Hb ^a <11g/d	N ^b <1.500/mm ³	MC >1.000/mm ³	P ^d <100.000/mm ³
reticulocitopenia	Hipogranulação	Presença de promonócitos	
VCM ^c >100 fl	Pseudo-Pelger-Huet	Vacuolizações Citoplasmáticas	
Anisocitose	Fragmentação da cromatina		
Pecilocitose	Presença de mieloblastos		
Anisocromia Policromasia Pontilhado basófilo Eritroblastos			

^a Hb= hemoglobina. ^b N= neutrófilos. ^c M= monócitos. ^d P=plaquetas
VCM= volume celular médio

Tabela 3. Alterações morfológicas observadas nas células de linhagem eritroide e mielóide na MO de pacientes com SMD^{2,3,18}

Série eritroide	Série granulocítica	Série monocítica
Assincronismo maturativo núcleo/citoplasmático	Assincronismo maturativo núcleo/citoplasmático	Presença de promonócitos
Formas megaloblastóides	Formas megaloblastóides	Vacuolizações citoplasmáticas
Falhas de hemoglobulinização	Disgranulações	Presença de atípicas
Mitoses anômalas	Formas imaturas bizarras	Presença de formas aberrantes
Vacuolização citoplasmática	Presença de atípicas	
Presença de formas aberrantes	Mieloblastos com ou sem bastonete de Auer	
Sideroblastos anelares		

Tabela 4. Anormalidades fenotípicas observadas em células hematopoéticas na SMD por citometria de fluxo^{2,3,46,51}

Progenitores mielóides CD34+
Aumento da contagem absoluta e relativa de células CD34+
Expressão de CD11b e/ou CD15
Perda da expressão de CD13, CD33 ou HLA-DR
Expressão de antígenos linfóides (CD5, CD7, CD19 ou CD56)
Diminuição da expressão de CD45
Aumento ou diminuição anormal da intensidade de CD34
Diminuição anormal da expressão de CD33
Aumento da expressão CD2++
Progenitores linfóides B CD34+ (CD34+/CD10+)
Diminuição da contagem absoluta e relativa de células CD34+/CD10+
Série Neutrófila
Hipogranularidade evidenciada pelo SSC
Diminuição da expressão de CD45
Padrão de relação CD13/CD16 anormal
Razão HLA-DR/CD11b anormal
Padrão de relação CD11b/CD16 anormal
Assincronismo maturativo
Perda da expressão de CD13 ou CD33
Expressão de CD34 ou CD56+
Expressão de antígenos linfóides
Monócitos
Anormalidade na relação da expressão entre HLA-DR, CD11b, CD13, CD14 e CD33
Perda da expressão de CD13, CD14, CD16 ou CD33
Expressão de CD34 ou CD56
Expressão de antígenos linfóides (com exceção do CD4)
Série Eritroide
Expressão do CD34
Expressão anormal de CD45, CD71, CD117, CD235a e/ou Glicoforina A
Série Megacariocítica
Aumento da contagem absoluta e relativa de células megacariocíticas

nas de resistência como marcadores de diagnóstico das SMDs.⁴¹⁻⁴³ Um estudo que avaliou a expressão de três proteínas de resistência (glicoproteína-P - P-gp, proteína de resistência a múltiplas drogas - MRP e a *lung resistance protein* - LRP), relatou que a expressão de P-gp e LRP são mais frequentes em pacientes com SMD quando comparados aos portadores de LMA *de novo*.⁴⁵ No entanto, em outro trabalho, Suárez e cols⁴¹ demonstraram que não houve diferença significativa na expressão de P-gp, MRP e LRP entre pacientes com SMD e LMA *de novo*.

Esses resultados refletem a discordância entre os trabalhos encontrados na literatura. Muitos autores atribuem esses resultados contraditórios às diferenças metodológicas existentes.^{42,46}

Tabela 5. Critérios de diagnóstico de SMD^{a,2,3}

Grupo A - Primeiros critérios hematológicos avaliados
Citopenia constante em uma ou mais linhagens: eritróide (hemoglobina <11 g/dL); neutrófila (neutrófilos <1.500/mm ³ megacariocítica (plaquetas <100.000 /mm ³)
Exclusão de todas as outras doenças hematopoéticas
Grupo B - Critérios decisivos para SMD
Displasia em, pelo menos, 10% de todas as células de uma das seguintes linhagens da medula óssea: eritróide e/ou neutrófila e/ou megacariocítica; ou > 15% de sideroblastos
Presença de 5-19% de blastos na medula óssea
Alterações cromossômicas típicas de SMD ^b
Grupo C - Cocrítérios para pacientes que obedecem "A", mas não "B"
Anormalidade fenotípica das células da medula óssea indicativa de uma população monoclonal da série eritróide e/ou mielóide
Alterações moleculares na via de sinalização celular
Perda parcial ou total dos antígenos de maturação e/ou presença de células imaturas no SP

^aO diagnóstico de SMD é estabelecido quando são preenchidos os dois critérios do grupo "A" e, pelo menos, um critério do grupo "B"; ^bAs alterações cromossômicas mais frequentes envolvem os cromossomos: 5, 7, 8 e 20

Aspectos laboratoriais no diagnóstico de SMD

O diagnóstico das SMDs é baseado nos resultados do hemograma completo, mielograma, imunofenotipagem e citogenética.

Na avaliação das alterações hematológicas periféricas deve-se considerar a presença de citopenia(s) sustentada(s) por 4-8 semanas, além de alterações nas séries eritróide, granulocítica, monocitária e/ou megacariocítica, como pode ser observado na Tabela 2.

Na maioria dos pacientes com SMD, a MO apresenta-se hiperclular e se podem observar células displásicas (Tabela 3). As displasias só devem ser consideradas quando presentes em 10% ou mais das células de uma ou mais séries hematopoéticas.

A imunofenotipagem realizada por citometria de fluxo tem sido utilizada para detectar expressões anormais de antígenos celulares relacionados à linhagem e maturação das diversas séries hemopoéticas e para verificar aumento de marcadores pró-apoptóticos nessas células. Além disso, é utilizada para detectar a expressão de células CD34+ e CD45⁺.^{3,47} Recentemente, vários trabalhos mostram a importância das características imunofenotípicas, quali e quantitativas das células progenitoras hematopoéticas CD34+, células mielóides e monócitos maduros, analisadas por citometria de fluxo.^{2,48}

A perda parcial ou total de um antígeno em 10% ou mais das células em uma população de interesse, bem como a parada maturativa, a assincronia na expressão da maturação

de dois antígenos e a presença de expressões aberrantes são alterações específicas da SMD.^{49,50} Como na SMD a linhagem mais acometida é a mielóide, é de extrema importância a investigação das marcações de mieloblastos, como os anticorpos HLA-DR, CD33, CD13, CD11b, CD117, CD15, CD16 e CD45.^{3,47,49} Na SMD, podem ser observadas alterações fenotípicas características nas células da série mielóide e eritróide, como pode ser visto na Tabela 4.

O estudo das alterações cromossômicas na SMD auxilia no diagnóstico, na classificação, na escolha terapêutica e no prognóstico.^{32,53,54} As anomalias cromossômicas em SMD são clonais, não ocorrem ao acaso e constituem-se, em geral, na perda de material genético, o que sugere a inativação de genes supressores tumorais necessários para o desenvolvimento de células mielóides normais. As alterações cromossômicas mais frequentes na SMD envolvem os cromossomos 5, 7, 8, 11, 13, 17, 20, 21 e X.^{52,53} Com base na citogenética, as alterações cromossômicas da SMD podem ser divididas em cariótipo normal, perdas isoladas, translocações balanceadas e cariótipos complexos (três ou mais anomalias).^{52,53} As deleções ou monossomias representam

as alterações genéticas mais frequentes na SMD. O grupo de cariótipo complexo apresenta um acúmulo de alterações progressivas e maior agressividade,^{32,55} o que torna necessária a repetição periódica do cariótipo, pois cerca de 30% dos pacientes desenvolvem alterações adicionais com o passar do tempo e 12% dos casos com cariótipo normal ao diagnóstico adquirem anomalias subsequentes, apresentando um prognóstico desfavorável quando comparados com indivíduos que permanecem com cariótipo inmutável.⁵⁵

Segundo o Consenso de Valent e cols.,² o diagnóstico inicial de SMD deve ser estabelecido após análise de critérios pertencentes a dois grupos (A e B), no qual serão classificados como SMD aqueles casos que preencherem os dois critérios do grupo "A", e pelo menos, um critério do grupo "B" (Tabela 5).^{2,3}

Para o diagnóstico de SMD deve-se excluir a presença de doenças não clonais que possuam características semelhantes às observadas na SMD.³ Portanto, faz parte da investigação laboratorial a dosagem de vitamina B12, ácido fólico, hormônios tireoidianos, ferro sérico, ferritina; determinação da capacidade latente de ligação de ferro; pesquisa de Coombs

Tabela 6. Classificação da OMS para SMD¹⁴

Subgrupo	Achados em Sangue periférico	Achados em Medula óssea
Citopenias refratárias com displasia de única linhagem (CRDU): Anemia refratária (AR); Neutropenia refratária (NR); Trombocitopenia refratária (TR)	Citopenia única ou bicitopenia ^a Blastos ausentes ou raros (< 1%) ^b	Displasia de única linhagem: ≥ 10% das células em uma linhagem mielóide < 5% de blastos < 15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	Anemia Ausência de blastos	Displasia apenas na linhagem eritróide < 5% de blastos ≥ 15% de sideroblastos em anel
Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRDM)	Citopenia(s) Blastos ausentes ou raros (< 1%) ^a Ausência de bastonete de Auer Monócitos < 1.000/mm ³	Displasia em ≥ 10% das células em duas ou mais linhagens mielóides < 5% de blastos. Ausência de bastonete de Auer 15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com excesso de blastos-1 (AREB-1)	Citopenia(s) < 5% de blastos ^b Ausência de bastonete de Auer Monócitos < 1.000/mm ³	Displasia de única ou múltiplas linhagens 5 a 9% de blastos ^b Ausência de bastonete de Auer
Anemia refratária com excesso de blastos-2 (AREB-2)	Citopenia(s) 5 a 19% de blastos Bastonete de Auer presente ou não ^c < 1x10 ⁹ /L de monócitos	Displasia de única ou múltiplas linhagens 5 a 19% de blastos Bastonete de Auer presente ou não ^c
Síndrome mielodisplásica - não classificável (SMD-NC)	Citopenias ≤ 1% de blastos ^b	Displasia em < 10% das células em uma ou mais linhagem mielóide quando acompanhada de anormalidades citogenéticas presuntivas de SMD ^d < 5% de blastos
Síndrome mielodisplásica associada com del(5q) isolada	Anemia Contagem de plaquetas normal ou elevada Blastos ausentes ou raros (< 1%)	Normo a hiperplasticidade megacariocítica núcleo hipobulbado < 5% de blastos Anormalidade citogenética: del(5q) isolada

^a Bicitopenia pode ser observada ocasionalmente. Casos com pancitopenia devem ser classificados com SMD-NC

^b Se a porcentagem de mieloblastos na MO for < 5%, mas existirem 2 a 4% de mieloblastos no SP, deve-se classificar como AREB-1.

^c Casos de CRDU e CRDM com 1% de mieloblastos no SP devem ser classificados como MDS-NC.

^d Casos com bastonete de Auer e < 5% de mieloblastos no SP e < 10% na MO devem ser classificados como AREB-2

^e Mais frequentes: -7 ou del(7q), -5 ou del(5q), t(17q) ou t(17p), del(11q), del(12p) ou t(12p), -13 ou t(13q), t(11;16)(q23;p13.3).

direto, deficiência de CD55 e CD59, disfunções metabólicas por insuficiência hepática ou renal; e sorologia para hepatite B e C, Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e fator antinuclear (FAN).^{3,56} São considerados fatores de exclusão absolutos a exposição recente a agentes tóxicos ou compostos citostáticos, a deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico e o uso recente de fatores de crescimento hematopoético.^{6,56}

Classificação dos subtipos de SMD-OMS 2008

A primeira classificação para SMD foi proposta pelo Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB). Posteriormente, houve uma reavaliação dessa classificação e, no ano de 2001, foi instituída a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), que utiliza dados imunofenotípicos, genéticos, clínicos, citomorfológicos e citotóxicos para dividir a SMD em oito subgrupos.^{2,3} No ano de 2008, a classificação da OMS foi reformulada, abrangendo, atualmente, sete subgrupos como mostra a Tabela 6.¹⁴

Nas SMDs existem fatores clínicos e laboratoriais que podem ser utilizados para determinação do prognóstico. Os principais fatores prognósticos avaliados são: idade, porcentagem de blastos medulares, número de linhagens com citopenia periférica, número de linhagens hematopoéticas displásicas, níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH), imunofenotipagem, expressão gênica molecular, dependência transfusional e citogenética.^{9,57}

Considerações finais

Devido às características heterogêneas da SMD, o seu diagnóstico nem sempre é simples e exige do profissional de saúde, além dos conhecimentos sobre características laboratoriais, critérios diagnósticos e avaliação de prognóstico: o conhecimento na área de biologia molecular. O domínio e o acesso a tecnologias de ponta são atualmente imprescindíveis, uma vez que, segundo a OMS, o diagnóstico e classificação das SMDs não são possíveis sem uma correta avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo, e citogenética por biologia molecular.

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDSs) are characterized by a stem cell clonal disorder and ineffective hematopoiesis which causes dysplasia in one or more bone marrow hematopoietic cell lineages, peripheral cytopenia and genetic instability with enhanced risk to transform into acute myeloid leukemia (AML). This heterogeneous group of hematopoietic diseases can develop as primary diseases, which possess a variable and not completely defined etiology, or as secondary to chemotherapy or radiotherapy for other neoplasias. The evolution of diagnostic tests has improved comprehension of the process involved in the genesis and evolution of MDSs, making the development of earlier and more specific tests for diagnosis and

follow ups possible. In 2008, the World Health Organization (WHO) redefined the criteria for the classification of MDSs, dividing them into seven subgroups. This classification included new immunophenotypic, genetic, cytomorphologic and molecular features, which are essential for the diagnosis of MDSs and for a better comprehension of the disease. Despite technological advances, some details, such as the molecular basis of the transformation of MDS to AML, are still not completely understood, which makes further studies in this field necessary. Hence, the objective of this review is to make a compilation of recent molecular and laboratory aspects of MDS. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.

Key words: Myelodysplastic syndrome; WHO Classification 2008; immunophenotyping.

Referências Bibliográficas

- Souto EX. Tratamento de suporte e queilação de ferro em pacientes com síndromes mielodisplásicas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2006;28(3):204-209.
- Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Gemming U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. Leuk Res. 2007;31(6):727-36.
- Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. Leuk Res. 2008;32(1):5-17.
- Lopes LF, Lorand-Metze I, Mendes WL, Seber A, Melo LM. Síndrome mielodisplásica na infância. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2006; 28(3):226-37.
- Steensma DP, Bennett JM. The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc. 2006;81(1):104-30.
- Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JC, Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. Nat Rev Cancer. 2007;7(2):118-29.
- Malcovati L, Cazzola M. Myelodysplastic/myeloproliferative disorders. Haematologica. 2008;93(1):4-6.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2001, Lion: IARC Press. 352.
- Varma N, Varma S. Proliferative indices, cytogenetics, immunophenotype and other prognostic parameters in myelodysplastic syndromes. Indian J Pathol Microbiol. 2008; 51 (1):97-101.
- Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. Haematologica. 2007;92(6):744-52.
- Vidal DO, Lopes LF, Valera ET. Drug resistance and methylation in myelodysplastic syndrome. Curr Pharm Biotechnol. 2007;8 (2):77-81.
- Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia – a review. Br J Haematol. 2008;140 (2):123-32.
- Disperati P, Ichim CV, Tkachuk D, Chun K, Schuh AC, Wells RA. Progression of myelodysplasia to acute lymphoblastic leukaemia: implications for disease biology. Leuk Res. 2006;30(2):233-9.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4 ed. 2008. Geneva: WHO Press. 439.

15. Bortolheiro TC. Classificação morfológica das síndromes mielodisplásicas: da classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) à classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2006;28(3):194-7.
16. Chauffaille MLLF. Alterações moleculares em síndrome mielodisplásica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2006;28(3):188-93.
17. Pinheiro RF, Chauffaille MLLF. Síndrome mielodisplásica secundária à quimio ou radioterapia: SMD relacionada ao tratamento. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2006;28(3):201-3.
18. Catenacci DV, Schiller GJ. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. *Cancer.* 2007;109(9):1703-14.
19. Kantarjian H, Giles F, List A, Lyons R, Sekeres MA, Pierce S, et al. The incidence and impact of thrombocytopenia in myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2007;109(9):1705-14.
20. Economopoulou C, Pappa V, Kotsioti F, Papageorgiou S, Kapsimali V, Papasteriadi C, et al. Analysis of apoptosis regulatory genes expression in the bone marrow (BM) of adult de novo myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Res.* 2008; 32(1):61-9.
21. Larson RA. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20(1):29-37.
22. Thirman MJ, Larson RA. Therapy-related myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1996;10(2):293-320.
23. Badran A, Yoshida A, Wanu Y, Mutoh M, Imamura S, Yamashita T, et al. Expression of the anti-apoptotic gene survivin in myelodysplastic syndrome. *Int J Oncol.* 2003;22(1):59-64.
24. Mihara K, Chowdhury M, Nakaju N, Hidani S, Ihara A, Hyodo H, et al. Bmi-1 is useful as a novel molecular marker for predicting progression of myelodysplastic syndrome and patient prognosis. *Blood.* 2006;107(1):305-8.
25. Gianelli U, Fracchiolla NS, Cortezzelli A, Pellegrini C, Savi F, Moro A, et al. Survivin expression in "low-risk" and "high-risk" myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* 2007;86(3):185-9.
26. Yamamoto K, Abe S, Nakagawa Y, Suzuki K, Hasegawa M, Inoue M, et al. Expression of IAP family proteins in myelodysplastic syndromes transforming to overt leukemia. *Leuk Res.* 2004;28(11):1203-11.
27. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):47-59.
28. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985; 228(4706):1440-3.
29. Delia D, Aiello A, Soligo D, Fontanella E, Melani C, Pezzella F, et al. bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. *Blood.* 1992;79(5):1291-8.
30. Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, Mijovic A, Devereux S, Pagliuca A. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood.* 2000;96(12):3932-8.
31. Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, Kebutsek P, Itahana K, Van Lohuizen M, et al. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2002; 62(16):4736-45.
32. Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, Liu J, Tanger E, Saremaslani P, et al. Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature.* 2004;428(6980):337-41.
33. Raaphorst FM, Meijer CJ, Fieret E, Blokzijl T, Mommers E, Buerger H, et al. Poorly differentiated breast carcinoma is associated with increased expression of the human polycomb group EZH2 gene. *Neoplasia.* 2003;5(6):481-8.
34. Vonlanthen S, Heighway J, Altermatt HJ, Gugger M, Kappeler A, Borner MM, et al. The bmi-1 oncogene is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br J Cancer.* 2001;84(10):1372-6.
35. Beà S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernández L, Hernández S, et al. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res.* 2001;61(6):2409-12.
36. Dukers DF, van Galen JC, Giroth C, Jansen P, Sewalt RG, Ome AP, et al. Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *Am J Pathol.* 2004;164(3):873-81.
37. Vvan Kernenade FJ, Raaphorst FM, Blokzijl T, Fieret E, Hamer KM, Satijn DP, et al. Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2001;97(12):3896-901.
38. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenys ML, Dayaram T, Owens BM, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity.* 2004;21(6):853-63.
39. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(16):1293-302.
40. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *NNat Rev Cancer.* 2004;4(4):253-65.
41. Suárez L, Vidriales MB, García-Laraña J, Sanz G, Moreno MJ, López A, et al. CD34+ cells from acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and normal bone marrow display different apoptosis and drug resistance-associated phenotypes. *Clin Cancer Res.* 2004;10(22):7599-606.
42. Sonneveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies. *J Intern Med.* 2000;247(5):521-34.
43. Covelli A. Modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies. *Ann Oncol.* 1999;10 Suppl 6:53-9.
44. Poulain S, Lepellet P, Preudhomme C, Cambier N, Cornillon J, Wartel E, et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2000; 110(3):591-8.
45. Lepellet P, Poulain S, Grardel N, Preudhomme C, Cosson A, Fenaux P. Expression of lung resistance protein and correlation with other drug resistance proteins and outcome in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 1998;29(5-6):547-51.
46. Valera ET, Scrideli CA, Queiroz RG, Mori BM, Tone LG. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J.* 2004;122(4):166-71.
47. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2006; 108(3):1037-44.
48. Matarraz S, López A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores J, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia.* 2008;22(6):1175-83.
49. Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R, Travaglio E, Pascutto C, Maffioli M, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 2006;20(4):549-55.
50. Kussick SJ, Fromm JR, Rossini A, Li Y, Chang A, Norwood TH, et al. Four-color flow cytometry shows strong concordance with

- bone marrow morphology and cytogenetics in the evaluation for myelodysplasia. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(2):170-81.
51. Orfao A, Ortuño F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A.* 2004;58(1):62-71.
 52. Olney HJ, Le Beau MM. Evaluation of recurring cytogenetic abnormalities in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2007;31(4):427-34.
 53. Korgaonkar S, Babu VR, Kerketta L, Ghosh K. Chromosomal breakage in myelodysplastic syndrome. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2008;9(1):151-4.
 54. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, *et al.* Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood.* 2003;102(1):43-52.
 55. Swolin B, Rödger S, Westin J. Therapy-related patterns of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome post polycythemia vera: single center experience and review of literature. *Ann Hematol.* 2008;87(6):467-74.
 56. Magalhães SMM. Síndromes mielodisplásicas: diagnóstico de exclusão. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2006;28(3):175-177.
 57. Apa AG, Gutz CNRM. Fatores prognósticos nas síndromes mielodisplásicas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2006;28(3):198-200.

Suporte Financeiro: CNPq (MCT/CNPq 15/2007) e Capes.

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Recebido: 16/12/2008

Aceito: 20/01/2009

