

Ana Carolina Rabello de Moraes

**Estudo da Associação de Genes e Proteínas de Resistência a Múltiplos Fármacos (*abcb1/ABCB1*, *abcc1/ABCC1* e *lrp/LRP*) com Marcadores Moleculares em Pacientes Portadores de Leucemias Agudas**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutor em Farmácia na Área de Concentração de Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moraes, Ana Carolina Rabello de  
Estudo da Associação de Genes e Proteínas de Resistência  
a Múltiplos Fármacos (abcbl/ABCBl, abcc1/ABCC1 e lrp/LRP)  
com Marcadores Moleculares em Pacientes Portadores de  
Leucemias Agudas / Ana Carolina Rabello de Moraes ;  
orientadora, Maria Cláudia Santos da Silva - Florianópolis,  
SC, 2013.  
218 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Leucemia aguda. 3. Resistência a  
múltiplos fármacos. I. Silva, Maria Cláudia Santos da. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia. III. Título.

**“Estudo da Associação de Genes e Proteínas de Resistência a Múltiplos Fármacos (*abcb1/ABCB1*, *abcc1/ABCC1* e *lrp/LRP*) com Marcadores Moleculares em Pacientes Portadores de Leucemias Agudas”**

**POR**

**Ana Carolina Rabello de Moraes**

**Tese julgada e aprovada em sua forma final pela Orientadora e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**

---

**Profa. Dra. Almeriane Maria Weffort Santos (UFPR – Membro Titular)**

---

**Profa. Dra. Primavera Borelli (USP – Membro Titular)**

---

**Profa. Dra. Daniela Ferraz Pereira Leite (Triplix-Pharma – Membro Titular)**

---

**Profa. Dra. Thaís Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)**

---

**Prof. Dr. Celso Spada (UFSC – Membro Titular)**

---

**Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC – Orientadora)**

**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da**  
**UFSC**

**Florianópolis, 15 de abril de 2013**



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Josué e Maria Cristina, por serem o “arco estável que me arremessou, como uma flecha viva, na senda do infinito”.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Cláudia Santos da Silva, pelos conhecimentos, pelas oportunidades, pela dedicação, pelo apoio incondicional e pela amizade sincera. Por tudo isso, eu agradeço de coração.

Aos pacientes que, mesmo em um momento difícil de suas vidas, concordaram em participar desse estudo.

Ao Serviço de Oncohematologia e ao Serviço de Análises Clínicas do HU/UFSC, pelo encaminhamento das amostras e pela estrutura necessária à realização deste trabalho. Um agradecimento especial à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Joanita Ângela Gonzaga Del Moral pela disposição e contribuição em relação aos dados clínicos, e à funcionária Christiane Coelho pelo auxílio constante no recebimento e processamento das amostras.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luiza Bazzo, pelo apoio, amizade e por permitir o uso das instalações e dos equipamentos do seu laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia e a UFSC que ofereceram condições para mais uma etapa da minha formação.

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo suporte financeiro.

À Letícia Muraro Wildner pela amizade constante, as conversas instigantes e o auxílio irrestrito. Já sinto falta dos nossos almoços diários.

Um muito obrigada ao Arthur Schweitzer Ferreira por todas as PCRs feitas, os gelzinhos corridos e as horas gastas entre prontuários. Alguns dias, você realmente salvou a minha vida.

Por fim, um agradecimento mais que especial ao pessoal do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias e do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias, por seu companheirismo, amizade, cumplicidade e ajuda. Vocês com certeza encheram de cores cada um dos meus dias.



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

(Dalai Lama)



## RESUMO

Menos de 45% dos portadores de leucemias agudas (LAs) sobrevivem cinco anos após o diagnóstico. O insucesso no tratamento relaciona-se, principalmente, à resistência à quimioterapia. O mecanismo mais comumente implicado na resistência a múltiplos fármacos (MDR) é a expressão de proteínas de membrana capazes de transportar para fora da célula moléculas citotóxicas, mantendo as concentrações intracelulares de quimioterápicos abaixo das desejadas. O objetivo deste trabalho foi investigar a expressão de *abcb1*/ABCB1, *abcc1*/ABCC1 e *lrp*/LRP como marcadores moleculares de diagnóstico diferencial, estratificação de prognóstico e detecção de doença residual mínima em portadores de LA atendidos pelo Serviço de Oncohematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC). Para tanto, foram coletadas amostras de 75 portadores de LA. A análise da transcrição dos genes *mdr* foi verificada por RT-PCR semiquantitativo e a expressão das proteínas MDR foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados mostram que nos casos de LA, a expressão de ABCB1 e a atividade da LDH correlacionaram-se positivamente ( $P=0,001$ ), a presença do marcador CD34 associou-se com a maior transcrição de *abcc1* ( $P=0,006$ ), e a maior transcrição de *lrp* associou-se com a ausência do marcador CD56 ( $P=0,029$ ) e com a ausência de transcrição de *survivina* ( $P=0,029$ ). Nos portadores de leucemia mieloide aguda (LMA), a transcrição de *abcc1* e a idade dos pacientes correlacionaram-se positivamente ( $P=0,029$ ), a ausência da transcrição de *survivina* associou-se com a maior transcrição de *lrp* ( $P=0,040$ ), e a maior expressão de LRP associou-se com o diagnóstico de LMA ( $P=0,025$ ). Nos portadores leucemia promielocítica aguda (LPA), as expressões de *abcc1* e de LRP correlacionaram-se positivamente com o percentual de blastos leucêmicos ao diagnóstico ( $P=0,019$  e  $P=0,001$ , respectivamente), e a expressão de ABCC1 correlacionou-se positivamente com a atividade da LDH ( $P=0,019$ ). Nos casos de leucemia linfóide aguda (LLA) B, as expressões de ABCB1 e de *abcc1* correlacionaram-se positivamente com a atividade da LDH ( $P=0,007$  e  $P=0,017$ , respectivamente), a expressão de ABCC1 correlacionou-se negativamente com a contagem de leucócitos ao diagnóstico ( $P=0,006$ ), e a expressão de LRP correlacionou-se positivamente com o número de leucócitos ao diagnóstico ( $P=0,001$ ) e associou-se com a presença da  $t(9;22)(q34;q11.2)$  ( $P=0,012$ ). Nos casos de LLA-T, a transcrição de *abcb1* e a contagem de leucócitos correlacionaram-se positivamente ( $P=0,007$ ). Os pacientes com

diagnóstico de LA que não entraram em remissão após a terapia de indução expressaram mais *abcb1* do que aqueles que apresentaram remissão completa (P=0,004). Os portadores de LMA que não responderam à terapia de indução expressaram mais *abcb1* e ABCC1 do que os que apresentaram remissão (P=0,005 e P=0,017, respectivamente). Além disso, os casos de LMA expressaram menos *abcc1* após indução (P=0,016) e os de LPA expressaram mais LRP após a indução (P=0,025). Os resultados mostram que a análise de transcrição dos genes *mdr* fornece informações de prognóstico diferentes da análise das proteínas MDR. Diante disso, o presente estudo recomenda que no momento do diagnóstico dos portadores de LA seja realizada a avaliação simultânea da expressão dos genes *abcb1*, *abcc1* e *lrp* e das proteínas ABCB1, ABCC1 e LRP de resistência à quimioterapia.

**Palavras-chave:** Resistência a múltiplos fármacos; Leucemia aguda; ABCB1; ABCC1; LRP.

## ABSTRACT

Less than 45% of patients with acute leukemia (ALs) survive five years after diagnosis. The failure in treatments relate primarily to chemotherapy resistance. The mechanism most commonly implicated in the multidrug resistance (MDR) is the expression of membrane proteins capable of carrying cytotoxic molecules out of the cell, which keeps intracellular concentrations of the chemotherapics below those desired. The aim of this study was to investigate the expression of *abcb1*/ABCB1, *abcc1*/ABCC1 and *lrp*/LRP as molecular markers for differential diagnosis, prognostic stratification and minimal residual disease detection in patients with AL treated by Oncohematology Service do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC). For this purpose, samples were collected from 75 patients with AL. Analysis of *mdr* genes transcription was assessed by semi-quantitative RT-PCR and MDR proteins expression was evaluated by flow cytometry. The results showed that in AL cases, ABCB1 expression and LDH activity were positively correlated (P=0.001), the presence of CD34 marker was associated with increased *abcc1* transcription (P=0.006), and higher LRP expression was associated with the absence of CD56 marker (P=0.029) and with the absence of *survivin* transcription (P=0.029). In patients with acute myeloid leukemia (AML), the *abcc1* transcription and the patients age were positively correlated (P=0.029), the absence of *survivin* transcription was associated with a bigger *lrp* transcription (P=0.040), and bigger LRP expression was associated with AML diagnosis (P=0.025). In patients with acute promyelocytic leukemia (APL), *abcc1* and LRP expressions were positively correlated with the percentage of blasts at diagnosis (P=0.019 and P=0.001, respectively), and ABCC1 expression was positively correlated with LDH activity (P = 0.019). In B acute lymphoid leukemia (ALL) cases, ABCB1 and *abcc1* expressions were positively correlated with LDH activity (P=0.007 and P=0.017, respectively), ABCC1 expression was negatively correlated with the white blood cell count at diagnosis (P=0.006), and LRP expression was positively correlated with the white blood cell count at diagnosis (P=0.001) and with the presence of t(9; 22)(q34; q11.2) (P=0.012). In T-ALL cases, ABCB1 expression and the white blood cell count at diagnosis were positively correlated (P = 0.007). Patients diagnosed with AL who had achieved remission after induction therapy expressed more ABCB1 than those who had had complete remission (P=0.004). The AML patients who have not responded to induction therapy

expressed more *abcb1* and ABCC1 than those who had achieved remission (P=0.005 and P=0.017, respectively). Additionally, AML cases expressed less *abcc1* after induction therapy (P=0.016) and APL cases expressed more LRP after induction (P=0.025). The results showed that *mdr* genes expression analysis and MDR proteins analysis provide different prognostic informations. Thus, the present study recommends that at the moment of AL patients diagnosis a simultaneous evaluation of *mdr* genes *abcb1*, *abcc1* and *lrp* and MDR proteins expression ABCB1, ABCC1 and LRP should be held.

**Keywords:** Multidrug Resistance; Acute Leukemia; ABCB1; ABCC1; LRP.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias de transdução de sinal do receptor FLT3.....	36
Figura 2 – Vias de sinalização ativadas pela JAK2 e JAK2V617F.....	38
Figura 3 – Funções da survivina na mitose e apoptose. ....	42
Figura 4 – Localização celular das bombas de efluxo de fármacos. ....	46
Figura 5 – Estrutura da proteína de resistência a múltiplos fármacos 1 (ABCB1/Glicoproteína-P/Pgp/MDR1).....	50
Figura 6 – Estrutura da proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1 (ABCC1/MRP1).....	54
Figura 7 – Possíveis mecanismos de interação entre ABCC1 e GSH. ...	56
Figura 8 – Estrutura geral da <i>Vault</i> . ....	58
Figura 9 – Fluxograma do processamento das amostras de SP ou MO.	62
Figura 10 – Gel de agarose 2% representativo dos controles positivos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de <i>abcb1</i> (K562-LUCENA), <i>abcc1</i> (Jurkat), <i>lrp</i> (Jurkat) e <i>survivina</i> (K562). ....	68
Figura 11 – Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção da mutação <i>FLT3-DIT</i> . ....	73
Figura 12 – Gel de poliacrilamida 20% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção da mutação <i>FLT3-D835</i> . ....	75
Figura 13 – Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção da mutação <i>JAK2V617F</i> . ....	76
Figura 14 – Dot-plots e histogramas representativos da análise da expressão das proteínas ABCB1, ABCC1 e LRP por citometria de fluxo. ....	79
Figura 15 – Distribuição dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda segundo o gênero.....	81
Figura 16 – Distribuição dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda segundo o subtipo de leucemia aguda. ....	82
Figura 17 – Distribuição dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda segundo óbito. ....	85
Figura 18 – Curva de sobrevida dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda. ....	86



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1– Estratificação de risco para as Leucemias mieloides agudas e Leucemias linfoides agudas baseada nas anormalidades citogenéticas. ....	34
Quadro 2– Fatores de prognóstico em indivíduos com diagnóstico de leucemia aguda. ....	43
Quadro 3– Comparação de estudos que avaliaram a importância da expressão de <i>abcb1</i> /ABCB1, <i>abcc1</i> /ABCC1 e <i>lrp</i> /LRP no prognóstico dos portadores de leucemia aguda. ....	48
Quadro 4– Lista de fármacos que são transportados pela ABCB1. ....	51
Quadro 5– Sequência dos <i>primers</i> para a detecção de <i>abcb1</i> , <i>abcc1</i> , <i>lrp</i> e <i>survivina</i> . ....	66
Quadro 6– Condições de reação para a detecção de <i>abcb1</i> , <i>abcc1</i> , <i>lrp</i> e <i>survivina</i> . ....	67
Quadro 7– Sequência dos <i>primers</i> para a pesquisa das translocações cromossômicas. ....	69
Quadro 8– Tamanho esperado dos produtos de PCR para a pesquisa das translocações cromossômicas, segundo o par de <i>primers</i> utilizado. ....	71



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo da terapia de indução.....	83
Tabela 2 – Mediana da transcrição de <i>abcb1</i> , <i>abcc1</i> e <i>lrp</i> nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.....	87
Tabela 3 – Associação entre a transcrição de <i>abcb1</i> e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.....	90
Tabela 4 – Associação entre a transcrição de <i>abcc1</i> e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.....	92
Tabela 5 – Associação entre a transcrição de <i>lrp</i> e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.....	94
Tabela 6 – Mediana da transcrição de <i>abcb1</i> , <i>abcc1</i> e <i>lrp</i> nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda antes e depois do primeiro ciclo de terapia de indução.....	97
Tabela 7 – Mediana da expressão de ABCB1, ABCC1 e LRP nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e ao diagnóstico diferencial..	99
Tabela 8 – Associação entre a expressão de ABCB1 e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.....	101
Tabela 9 – Associação entre a expressão de ABCC1 e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme	

resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.....103

Tabela 10– Associação entre a expressão de LRP e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.....106

Tabela 11– Mediana da expressão de ABCB1, ABCC1 e LRP nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda antes e depois do primeiro ciclo de terapia de indução.....108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCB1	Proteína de resistência a múltiplos fármacos 1/MDR1/Glicoproteína-P/Pgp (do inglês, <i>Multidrug resistance 1/P-glycoprotein</i> )
ABCC1	Proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1/MRP1 (do inglês, <i>Multidrug resistance-related protein 1</i> )
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Proteína cinase B (do inglês, <i>Protein kinase B</i> )
APC	Aloficocianina
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	Proteína-2 de linfoma de células B (do inglês, <i>B-cell lymphoma protein-2</i> )
bcr1	Sítio de ponto de quebra 1 (do inglês, <i>breakpoint cluster region 1</i> )
bcr3	Sítio de ponto de quebra 3 (do inglês, <i>breakpoint cluster region 3</i> )
cDNA	DNA complementar
CEBPA	Proteína ligante ao amplificador CCAAT isoforma alfa (Do inglês, <i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i> )
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do ingles, <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DRM	Doença residual mínima
DTT	Dicloro-difenil-tricloroetano
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês, <i>Epidermal growth factor</i> )
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Américo-Britânico (do inglês, <i>French-American-British Cooperative Group</i> )
FISH	Hibridização <i>in situ</i> com fluorescência (do inglês, <i>Fluorescence in situ hybridization</i> )

FITC	Isotiocianeto de fluoresceína
FLT3	Tirosina cinase 3 semelhante a FMS (do inglês, <i>FMS-like tyrosine kinase 3, Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3</i> ou <i>fetal liver kinase-2</i> )
FLT3-D835	Mutação pontual no gene <i>FLT3</i>
FLT3-DIT	Mutação do tipo duplicação interna em <i>tandem</i> no gene <i>FLT3</i>
FSC	Dispersão frontal (do inglês, <i>forward scatter</i> )
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutathiona reduzida
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)1-piperazinil-etanosulfônico (do inglês, <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> )
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês, <i>human leukocyte antigen</i> )
HU-UFSC	Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina
IFM	Intensidade de fluorescência média
IFR	Intensidade de fluorescência relativa
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JAK2	Janus cinase 2 (do inglês, <i>Janus kinase 2</i> )
JAK2V617	Mutação no gene <i>JAK2</i>
F	
LA	Leucemia aguda
LAFM	Leucemia aguda de fenótipo misto
LBA	Leucemia bifenotípica aguda
LDH	Lactato desidrogenase
LLA	Leucemia linfoide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPA	LMA promielocítica com t(15;17)(q22;q12)
LRP	Proteína associada à resistência pulmonar/Principal proteína do grupo <i>vault/MVP</i> (do inglês, <i>Lung resistance protein/ Major vault protein</i> )
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês, <i>Mitogen-activated kinase protein</i> )

MDR	Resistência a múltiplos fármacos (do inglês, <i>Multidrug resistance</i> )
MFP	Mielofibrose primária
NMP	Neoplasia mieloproliferativa
NMR	Ressonância magnética nuclear (do inglês, <i>Nuclear magnetic resonance</i> )
MO	Medula óssea
NPM1	Nucleofosmina 1 (do inglês, <i>Nucleophosmin 1</i> )
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i> )
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína clorofílica peridinina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês, <i>Phosphatidylinositol -3-kinase</i> )
PV	Policitemia vera
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês, <i>Real-time polymerase chain reaction</i> )
qRT-PCR	Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês, <i>Real-time reverse transcription – polymerase chain reaction</i> )
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA <sub>r</sub>	Ácido ribonucléico ribossomal
RPMI 1640	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i> (do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute medium 1640</i> )
RT-PCR	Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Reverse transcription – polymerase chain reaction</i> )
SNC	Sistema nervoso central
SP	Sangue periférico
SSC	Dispersão lateral (do inglês, <i>side scatter</i> )
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês, <i>Signal transducers and activators of transcription</i> )

SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TE	Trombocitemia essencial
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$ (do inglês, <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
UV	Ultravioleta
Vault	Organelas localizadas principalmente em vesículas citoplasmáticas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>267</b>
1.1	OBJETIVOS .....	29
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>29</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>31</b>
2.1	LEUCEMIAS AGUDAS .....	31
2.2	BOMBAS DE EFLUXO DE FÁRMACOS .....	45
<b>2.2.1</b>	<b>Proteína de Resistência a Múltiplos Fármacos 1 (ABCB1/Glicoproteína-P/Pgp/MDR1)</b> .....	<b>49</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Proteína Associada à Resistência a Múltiplos Fármacos 1 (ABCC1/MRP1)</b> .....	<b>53</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Proteína Associada à Resistência Pulmonar (LRP)</b> .....	<b>58</b>
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>61</b>
3.1	CASUÍSTICA .....	61
3.2	REAGENTES .....	63
3.3	CONTROLES DOS ENSAIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR .....	63
3.4	EXTRAÇÃO DE RNA.....	64
3.5	SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR .....	65
3.6	DETECÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE <i>ABCB1</i> , <i>ABCC1</i> , <i>LRP</i> E <i>SURVIVINA</i> POR TRANSCRIÇÃO REVERSA - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE SEMIQUANTITATIVA (RT-PCR SEMIQUANTITATIVA) .....	66
3.7	PESQUISA DAS TRANSLOCAÇÕES T(8;21)(Q22;Q22), T(9;22)(Q34;Q11), T(15;17)(Q22;Q21) E INV(16)(P13;Q22) .....	68
3.8	EXTRAÇÃO DE DNA .....	72
3.9	PESQUISA DE MUTAÇÕES NO GENE <i>FLT3</i> .....	72
<b>3.9.1</b>	<b>Detecção da Mutação no Gene <i>FLT3</i> do Tipo DIT</b> .....	<b>72</b>
<b>3.9.2</b>	<b>Detecção da Mutação no Gene <i>FLT3</i> do Tipo D835</b> .....	<b>74</b>
3.10	DETECÇÃO DA MUTAÇÃO <i>JAK2V617F</i> .....	75
3.11	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA.....	76
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	80
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>81</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	81
4.2	TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>MDR</i> .....	86
4.3	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS <i>MDR</i> .....	98
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>109</b>

5.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES.....	109
5.2	RELAÇÃO DO PERFIL <i>MDR/MDR</i> COM OS FATORES DE PROGNÓSTICO .....	120
5.2.1	<b>Relação do Perfil de Expressão de <i>abcb1/ABCB1</i> com os Fatores de Prognóstico .....</b>	<b>120</b>
5.2.2	<b>Relação do Perfil de Expressão de <i>abcc1/ABCC1</i> com os Fatores de Prognóstico .....</b>	<b>122</b>
5.2.3	<b>Relação do Perfil de Expressão de <i>lrp/LRP</i> com os Fatores de Prognóstico.....</b>	<b>124</b>
5.3	RELAÇÃO DO PERFIL <i>MDR/MDR</i> COM O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DOS PACIENTES .....	126
5.4	RELAÇÃO DO PERFIL <i>MDR/MDR</i> COM A RESPOSTA À TERAPIA DE INDUÇÃO.....	127
5.4.1	<b>Relação do Perfil de Expressão de <i>abcb1/ABCB1</i> com a Resposta à Terapia de Indução .....</b>	<b>127</b>
5.4.2	<b>Relação do Perfil de Expressão de <i>abcc1/ABCC1</i> com a Resposta à Terapia de Indução .....</b>	<b>129</b>
5.4.3	<b>Relação do Perfil de Expressão de <i>lrp/LRP</i> com a Resposta à Terapia de Indução.....</b>	<b>130</b>
5.5	RELAÇÃO DO PERFIL <i>MDR/MDR</i> COM A OCORRÊNCIA DE ÓBITOS.....	130
5.6	O PERFIL <i>MDR/MDR</i> COMO FERRAMENTA DE DETECÇÃO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA .....	131
5.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	132
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>137</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>139</b>
	<b>APÊNDICE A – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo.....</b>	<b>185</b>
	<b>APÊNDICE B – Perfil <i>mdr/MDR</i> dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo no momento do diagnóstico e após o primeiro ciclo de terapia de indução .....</b>	<b>201</b>
	<b>ANEXO A – Aprovações do projeto de pesquisa pelo comitê de ética de pesquisa em seres humanos – CEPESH/UFSC..</b>	<b>207</b>
	<b>ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) .....</b>	<b>209</b>
	<b>ANEXO C – Protocolo de tratamento para as leucemias mieloides agudas (LMAS).....</b>	<b>211</b>

**ANEXO D – Protocolo de tratamento para as leucemias  
linfoides agudas (LLAS)..... 213**



## 1 INTRODUÇÃO

A modulação da homeostase nos organismos multicelulares requer a combinação de diferentes sistemas regulatórios altamente eficientes para controlar os mais diversos processos fisiológicos, incluindo a proliferação e a diferenciação celular. A existência de processos de controle e sinalização é fundamental para manter a identidade e a integridade do organismo. Quando esses mecanismos de controle são subvertidos, ocorre o câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Atualmente, mais de 12 milhões de pessoas por ano são diagnosticadas com câncer no mundo (FERLAY et al., 2010). No Brasil, são esperados para 2013, aproximadamente, 518 mil casos novos de câncer (INCA, 2011). As neoplasias malignas estão entre as principais causas de mortalidade no mundo, sendo responsável pela morte de 7,6 milhões de pessoas no ano de 2008, o que representa, aproximadamente, 13% dos óbitos mundiais (FERLAY et al., 2010). Estima-se que em 2030 o câncer será responsável pela morte de 17 milhões de pessoas (INCA, 2011). Em 2007, o Sistema de Informações sobre Mortalidade notificou que desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda causa mais frequente de morte na população, o que representa quase 17% dos óbitos de causa conhecida no Brasil (INCA, 2007).

As leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada, sobrevivência e diferenciação anormal de células hematopoiéticas na medula óssea (MO) (SWERDLOW et al., 2008; CORNELL; PALMER, 2012). Para o ano de 2008, foi estimado cerca de 350 mil novos casos e 257 mil óbitos por leucemia no mundo (FERLAY et al., 2010). Para o Brasil, as estimativas para 2013 são de 8.510 novos casos de leucemia, o que corresponde a um risco estimado de 5 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres. Para o estado de Santa Catarina, são esperados 300 novos casos de leucemia, sendo 20 novos casos só para a cidade de Florianópolis (INCA, 2011).

Os custos financeiros para o diagnóstico e o tratamento das neoplasias são cada vez mais elevados, 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; BRASIL, 2005). 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 Sistema Único de Saúde (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 (BASSAN et al., 2004; JURCIC; SOIGNET; MASLAK, 2007; KRUG et al., 2011; BURNETT, 2012; CORNELL; PALMER, 2012). Por ser um grupo heterogêneo de doenças, as LAs se diferem quanto à resposta ao tratamento. Os índices de remissão e sobrevida livre de doença dependem de vários fatores, incluindo idade, leucemotria, superexpressão de proteínas antiapoptóticas, como a survivina, e alterações citogenéticas e submicroscópicas, como a presença das mutações nos genes que codificam a proteína tirosina-cinase 3 semelhante a FMS (*FLT3*) e a proteína janus cinase 2 (*JAK2*).

Atualmente, os protocolos de tratamento permitem a remissão hematológica completa após a terapia de indução em mais de 50% dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda (LA). No entanto, a grande maioria dos pacientes apresenta recidiva e morre alguns anos após o diagnóstico (SHIPLEY; BUTERA, 2009; PULTE; GONDOS; BRENNER, 2010; HARRISON, 2011; ROBOZ, 2011; CORNELL; PALMER, 2012; NARAYANAN; SHAMI, 2012). De fato, apesar dos avanços no tratamento das LAs, projeções mostram que apenas 21,4% e 27,5% dos pacientes adultos diagnosticados com leucemia mieloblástica aguda (LMA) e leucemia linfoblástica aguda (LLA), respectivamente, irão sobreviver por cinco ou mais anos após o diagnóstico (PULTE; GONDOS; BRENNER, 2010; TOFT et al., 2012).

Grande parte do insucesso do tratamento das LAs se deve à refratariedade à quimioterapia, que resulta muitas vezes da superexpressão de uma classe de proteínas transportadoras de membrana, as quais levam à diminuição da concentração intracelular de fármacos e ocasionam o fenômeno denominado de resistência a múltiplos fármacos (MDR) (ABUTALIB; WETZLER; STOCK, 2009; FORAN, 2010). Vários trabalhos demonstraram que a expressão dessas proteínas de resistência correlaciona-se com fatores de mau prognóstico, com a resposta ao tratamento e com a ocorrência de recidiva em portadores de LA (SAMDANI et al., 1996; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; SHMAN et al., 2008; EL-SHARNOUBY et al., 2010; PALLIS et al., 2011; CHAUHAN et al., 2012). No entanto, muitos estudos não encontram associação entre a expressão dessas proteínas MDR e o prognóstico ou desfecho do paciente portador de LA (LEITH et al., 1999; MICHIELI et al., 1999; CORTEZ et al., 2009; ROCKOVA et al., 2011; MAHJOUBI; AKBARI, 2012). Muitos desses

resultados discordantes têm sido atribuídos a variações étnicas, demográficas e metodológicas (VALERA et al., 2004).

Diante desse cenário, neste estudo avaliou-se a expressão de três proteínas MDR, a proteína de resistência a múltiplos fármacos 1 (ABCB1/Pgp/MDR1), a proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1 (ABCC1/MRP1) e a proteína associada à resistência pulmonar (LRP), por duas metodologias diferentes em uma população de portadores de LA e analisou-se a sua associação com fatores de prognóstico estabelecidos pela literatura e com a resposta à quimioterapia de indução, com o intuito de investigar o papel dessas proteínas MDR no diagnóstico, no prognóstico e na resposta à terapia desses pacientes.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a expressão dos genes e proteínas de resistência a múltiplos fármacos (*abcb1*/ABCB1, *abcc1*/ABCC1 e *lrp*/LRP) como marcadores moleculares de diagnóstico diferencial, estratificação de prognóstico e detecção de doença residual mínima em pacientes portadores de leucemias agudas (LAs) atendidos pelo Serviço de Oncohematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC).

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer o perfil laboratorial dos pacientes com LA atendidos pelo Serviço de Oncohematologia do HU-UFSC no momento do diagnóstico, usando como parâmetros a leucometria, o percentual de blastos, a presença dos marcadores CD34 e CD56, a atividade de lactato desidrogenase (LDH) e as anormalidades citogenéticas e genéticas submicroscópicas);
- Investigar, por transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) semiquantitativa, o perfil de transcrição dos genes de resistência a múltiplos fármacos (*abcb1*, *abcc1* e *lrp*) nas células mononucleares de pacientes com diagnóstico de LA antes da primeira terapia e durante o tratamento quimioterápico;
- Investigar, por citometria de fluxo, o perfil de expressão das proteínas de resistência a múltiplos fármacos (ABCB1, ABCC1 e

LRP) nos blastos leucêmicos dos pacientes com diagnóstico de LA antes da primeira terapia e durante o tratamento quimioterápico;

- Investigar, por reação em cadeia da polimerase (PCR), a frequência das mutações *FLT3-DIT*, *FLT3-D835* e *JAK2V617F* no momento do diagnóstico nos pacientes portadores de LA;
- Investigar o perfil de transcrição do gene *survivina* nos pacientes portadores de LA;
- Determinar a mediana de sobrevida dos pacientes com diagnóstico de LA atendidos pelo serviço de oncohematologia do HU-UFSC;
- Correlacionar a intensidade de expressão dos genes e das proteínas de resistência a múltiplos fármacos com os fatores de prognóstico (idade, leucometria, percentual de blastos, LDH, expressão de CD34, de CD56 e de *survivina*, presença das mutações *FLT3-DIT* e *FLT3-D835*, e das translocações t(8;21)(q22;q22) e t(9;22)(q34;q11.2));
- Analisar a expressão dos genes e das proteínas de resistência a múltiplos fármacos como ferramenta de diagnóstico diferencial entre os subtipos de LA;
- Verificar a associação entre a expressão dos genes e das proteínas de resistência a múltiplos fármacos e a resposta clínica dos pacientes com diagnóstico de LA;
- Analisar a expressão dos genes e das proteínas de resistência a múltiplos fármacos como instrumento para detecção de doença residual mínima nos pacientes com diagnóstico de LA.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 LEUCEMIAS AGUDAS

As leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada, sobrevivência e diferenciação anormal de células hematopoiéticas na medula óssea (MO), que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos (SWERDLOW et al., 2008; CORNELL; PALMER, 2012).

A tumorigênese é um processo de múltiplos passos, em que cada passo reflete uma alteração genética que acomete a célula. Cada mudança genética sucessiva confere à célula um ou outro tipo de vantagem de proliferação em relação às células normais, o que a permite ignorar os circuitos regulatórios da proliferação celular normal e da homeostasia. Com isso, ocorre a conversão progressiva de uma célula normal em uma célula neoplásica (HANAHAN; WEINBERG, 2000; BITTERMAN; POLUNOVSKY, 2012; DANG, 2012; DAWSON; KOUZARIDES, 2012).

Acredita-se que os diversos genótipos das células leucêmicas representam a manifestação de quatro alterações essenciais na fisiologia celular que, coletivamente, ditam a proliferação maligna. Esses fatores são: i) autossuficiência dos sinais de crescimento; ii) insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento; iii) evasão da morte celular programada (apoptose); e iv) potencial de replicação ilimitado (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Recentemente, sugeriu-se que dois fatores adicionais também estão envolvidos na patogênese do câncer: a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição pelo sistema imunológico, principalmente a mediada por linfócitos T e B, macrófagos e células *natural killer* (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A transformação leucêmica origina-se a partir de uma mutação somática em uma célula primordial (*stem cell*) e 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 (SHIPLEY; BUTERA, 2009; CORNELL; PALMER, 2012; NARAYANAN; SHAMI, 2012). Dessa forma, as leucemias podem ser divididas em linfóides e mielóides; e em agudas e crônicas (SWERDLOW et al., 2008; CORNELL; PALMER, 2012).

As LAs se caracterizam pelo acúmulo de células imaturas (blastos) incapazes de se diferenciar devido a um bloqueio de maturação (WANG; CHEN, 2000; CORNELL; PALMER, 2012). Quando esse

bloqueio maturativo ocorre na linhagem mieloide dá origem às leucemias mieloides agudas (LMAs) e, quando afeta a linhagem linfóide, origina as leucemias linfóides agudas (LLAs). Em alguns casos raros, podem coexistir duas populações de blastos de diferentes linhagens, ou os blastos existentes podem apresentar marcadores específicos de mais de uma linhagem. Historicamente, há uma dificuldade de como definir este tipo de leucemia aguda de fenótipo misto (LAFM), mas, atualmente, se aceita a denominação de Leucemia Aguda Bilineal para o primeiro caso e Leucemia Bifenotípica Aguda (LBA) para a segunda situação (SWERDLOW et al., 2008; BENE; PORWIT, 2012).

Durante os últimos 20 anos, o diagnóstico das LAs deixou de se basear apenas no uso de análises citomorfológicas das células neoplásicas para abranger diferentes métodos e critérios de diagnóstico (HAFERLACH et al., 2005). O diagnóstico das LAs é dado pela avaliação conjunta das características clínicas e laboratoriais apresentadas pelo indivíduo no momento do diagnóstico (KEBRIAIEI; ANASTASI; LARSON, 2003; SWERDLOW et al., 2008).

As manifestações clínicas das LAs são variáveis e a sintomatologia geralmente está associada aos órgãos envolvidos e a não funcionalidade das células leucêmicas (CORNELL; PALMER, 2012). A proliferação descontrolada de células leucêmicas e a infiltração da MO resultam na inibição da produção das células hematopoiéticas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Como consequência, os indivíduos portadores de LA frequentemente apresentam sintomas como: fadiga, astenia e palidez, em virtude da anemia; sangramento gengival e outras manifestações hemorrágicas, resultantes da plaquetopenia; dispneia e dores musculares, devido à leucocitose; e febre, devido a complicações infecciosas associadas à neutropenia ou à liberação de citocinas secretadas pelas células leucêmicas (BASSAN et al., 2004; CORNELL; PALMER, 2012; NARAYANAN; SHAMI, 2012). Em alguns casos, pode-se também observar linfadenopatia generalizada, esplenomegalia e hepatomegalia, devido à infiltração das células leucêmicas nos diferentes tecidos do organismo (PEJOVIC; SCHWARTZ, 2002; NARAYANAN; SHAMI, 2012).

Para o diagnóstico laboratorial das LAs, foi estabelecido um algoritmo que combina análises citomorfológicas e imunofenotípicas, com métodos citogenéticos e moleculares (HAFERLACH et al., 2005). O diagnóstico laboratorial das LAs inicia-se com a observação de 20% ou mais de blastos neoplásicos no exame morfológico de extensão de sangue periférico (SP) e/ou MO (SWERDLOW et al., 2008;

CORNELL; PALMER, 2012). No entanto, a diferenciação entre linfoblastos e mieloblastos pela microscopia óptica é difícil e pouco precisa. Desta forma, após a avaliação citomorfológica, é mandatória a realização da imunofenotipagem e da análise citogenética das células leucêmicas (SWERDLOW et al., 2008). Além disso, também podem ser realizadas análises pelas técnicas de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), PCR ou qualquer outro método de rastreamento de marcadores moleculares específicos do clone leucêmico (HAFERLACH et al., 2005). Todas essas análises laboratoriais são necessárias para diferenciar e caracterizar a célula neoplásica encontrada, o que possibilita a correta classificação das LAs e permite uma melhor determinação do prognóstico do paciente e conduta terapêutica a ser seguida (JURCIC; SOIGNET; MASLAK, 2007; SWERDLOW et al., 2008; ESTEY, 2012; MCGREGOR; MCNEER; GURBUXANI, 2012).

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 LMAs foram divididas em oito subtipos (M0 a M7) e as 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 classificação para as neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide, levando em consideração não só as características morfológicas e citoquímicas dos blastos, mas também as suas características imunofenotípicas e genético-moleculares (JAFFE et al., 2001). Em 2008, a classificação das neoplasias hematológicas foi revisada pela OMS e novas subcategorias de LA foram estabelecidas. Para as LMAs, sete subcategorias foram criadas: i) LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes; ii) LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia; iii) neoplasias mielóides associadas ao tratamento; iv) LMA não categorizada nos itens anteriores; v) sarcoma mielóide; vi) proliferação mielóide relacionada com síndrome de Down; e vii) neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitóides. As LLAs foram subdivididas em três subcategorias: i) leucemia/linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes; ii) leucemia/linfoma linfoblástico B não categorizada nos itens anteriores; iii) e leucemia/linfoma linfoblástico T (SWERDLOW et al., 2008).

Por constituírem um grupo heterogêneo de doenças, as LMAs e as LLAs diferem quanto ao prognóstico e resposta ao tratamento. Os índices de remissão e sobrevida livre dessas doenças dependem de

vários fatores, incluindo a idade dos pacientes, leucometria ao diagnóstico, alterações citogenéticas, outras alterações moleculares relacionadas ao clone leucêmico, desordens prévias na MO e comorbidades associadas. Dentre esses fatores, as anormalidades citogenéticas são consideradas o parâmetro individual de prognóstico mais importante e a sua identificação permite a estratificação dos pacientes em três grandes grupos de risco: risco favorável, intermediário e desfavorável (Quadro 1) (HARRISON, 2011; KRUG et al., 2011; MARCHESI et al., 2011; CORNELL; PALMER, 2012).

Quadro 1 – Estratificação de risco para as Leucemias mieloides agudas e Leucemias linfoides agudas baseada nas anormalidades citogenéticas.

	Risco Favorável	Risco Intermediário	Risco Desfavorável
<b>L M A</b>	t(15;17)(q22;q12-21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/ t(16;16)(p13;q22)	Cariótipo normal t(9;11)(p22;q23) del(7q) del(9q) del(11q) del(20q) +8 +11 +13 +21	Cariótipo complexo inv(3)(q21q26)/ t(3;3)(q21;q26) t(9;22)(q34;q11) t(8;16)(p11;p13)/ inv(8)(p11;p13) t(6;9)(p23;q34) t(6;11)(q27;q23) t(10;11)(p13;q23) t(11;19)(q23;p13.1) del(5q) -5 -7 -17
<b>L L A</b>	del(12p) t(12;21) <i>ETV6/RUNX1</i> Alta hiperploidia del(9p) t(10;14) t(14q11-q13)	Cariótipo normal Outras alterações não favoráveis/desfavoráveis	t(9;22) <i>BCR/ABL</i> Rearranjos no gene <i>MLL</i> Translocação do gene <i>IGH</i> Cariótipo complexo Baixa hipoploidia

LMA – Leucemia mieloide aguda; LLA – Leucemia linfóide aguda; del – Deleção; t – Translocação; inv – Inversão; (-) – perda; (+) – adição. Adaptado de: HARRISON, 2011; KRUG et al., 2011; MARCHESI et al., 2011; CORNELL; PALMER, 2012.

Atualmente, a conduta médica para os grupos de risco favorável e desfavorável está bem estabelecida. No entanto, a heterogeneidade do

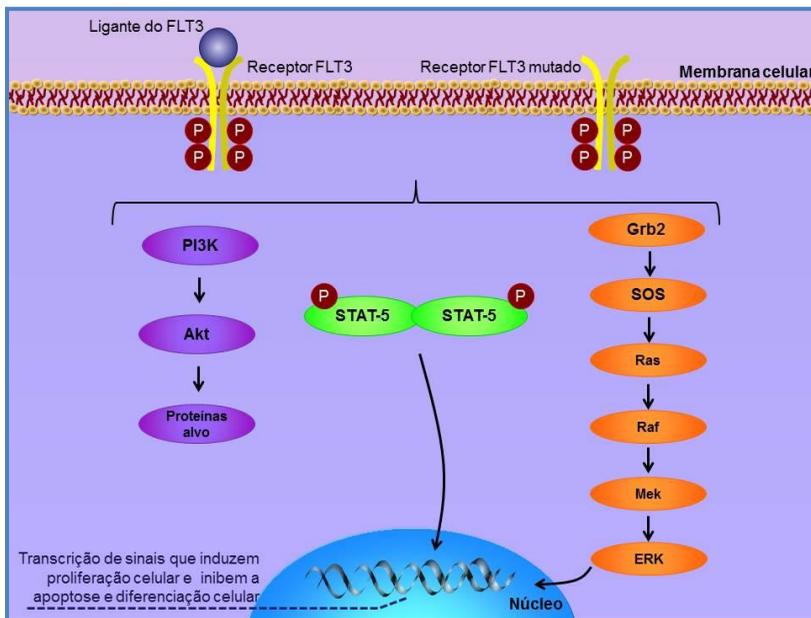
grupo de risco intermediário faz com que os protocolos de tratamento para esse grupo permaneçam incertos (DALAL et al., 2012; NCCN, 2012a; NCCN, 2012b). Entre 40% e 50% dos casos de LMA e 25% dos de LLA apresentam cariótipo normal, o que faz com que uma significativa parcela dos pacientes encontre-se nessa região de risco intermediário ou “indeterminado”. Esse fato incentivou a busca de novos marcadores moleculares de prognóstico que auxiliassem no refinamento dos grupos prognósticos, especialmente nos casos de cariótipo normal (MARCHESI et al., 2011; CORNELL; PALMER, 2012; DALAL et al., 2012).

Nesse contexto, a implementação de técnicas moleculares que permitam a identificação de várias anormalidades genéticas submicroscópicas de significado prognóstico tem sido recomendada pela OMS (SWERDLOW et al., 2008; DALAL et al., 2012). Dentre as anomalias genéticas recentemente descobertas, três mutações têm recebido especial atenção devido a sua capacidade de auxiliar na estratificação dos pacientes com LMA e cariótipo normal, as quais já são amplamente aceitas na rotina de prática clínica. Estas são as mutações nos genes que codificam as proteínas tirosina-cinase 3 semelhante a FMS (*FLT3*), nucleofosmina 1 (*NPM1*) e proteína ligante ao amplificador CCAAT isoforma alfa (*CEBPA*) (FORAN, 2010; ABDEL-WAHAB; PATEL; LEVINE, 2011). Por essas serem mutações de alta frequência, com importante significado prognóstico e importante associação com certas características morfológicas e clínicas, a OMS sugeriu que elas pudessem identificar um novo conjunto de subtipos de LMA e criou duas novas entidades ainda provisórias, a LMA com mutação no *NPM1* e a LMA com mutação no *CEBPA*. Por estarem associadas a mais de uma subcategoria de LMA e a mais de um tipo de anomalia citogenética e molecular, as mutações no gene *FLT3* não receberam um subtipo especial de LMA. No entanto, isso não diminui a sua importância clínica. De fato, a OMS recomenda a sua pesquisa para todos os casos de LMA (SWERDLOW et al., 2008; ABDEL-WAHAB; PATEL; LEVINE, 2011).

O gene *FLT3*, localizado no cromossomo 13q12, codifica um receptor tirosina-cinase de classe III, que é composto por um domínio extracelular (DE), um domínio justamembranar (JM) e um domínio tirosina-cinase altamente conservado (LICÍNIO; SANTOS-SILVA, 2010; TAKAHASHI, 2011). Esse receptor está envolvido na diferenciação e na proliferação celular e é normalmente expresso nas células tronco hematopoiéticas (Figura 1) (SMALL, 2008; SWERDLOW et al., 2008; DALAL et al., 2012). No entanto, após a

diferenciação do progenitor, o *FLT3* é rapidamente suprimido e por isso, ele não é normalmente expresso em células hematopoiéticas diferenciadas (SWERDLOW et al., 2008; DALAL et al., 2012).

Figura 1 – Vias de transdução de sinal do receptor FLT3.



A ligação do ligante de FLT3 ao receptor FLT3 causa a autofosforilação deste e sua consequente ativação. Uma vez ativado, o receptor FLT3 ativa numerosas vias, incluindo as vias das Transdutoras de Sinal e Ativadoras de Transcrição (STATs), das Proteínas Cinasas Ativadas por Mitógeno (MAPKs) e da Fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/Proteína Cinase B (Akt). A ativação destas vias induz à proliferação celular e interrompe os processos de apoptose e diferenciação celular. As mutações *FLT3-DIT* e *FLT3-D835* conferem uma atividade cinase constitutiva ao receptor FLT3, independente da presença do ligante. Adaptado de: SMALL, 2008.

Atualmente, já foram identificadas duas classes distintas de mutação no *FLT3*, a duplicação interna em *tandem* (*FLT3-DIT*) e a alteração no códon 835 da proteína (*FLT3-D835*). Nas LMAs, as mutações ativas no receptor tirosina-cinase FLT3 é o evento genético mais comumente encontrado, estando presentes em 20% a 40% dos casos de LMA. A sua forma mais comum é a *FLT3-DIT*,

compreendendo 75% a 80% dos casos de mutação no *FLT3*. Já a mutação *FLT3-D835*, que se origina de uma mutação pontual no éxon 20 do gene, representa os outros 25 a 30% das mutações no *FLT3* nas LMAs (GILLILAND; GRIFFIN, 2002; SWERDLOW et al., 2008; LICÍNIO; SANTOS-SILVA, 2010).

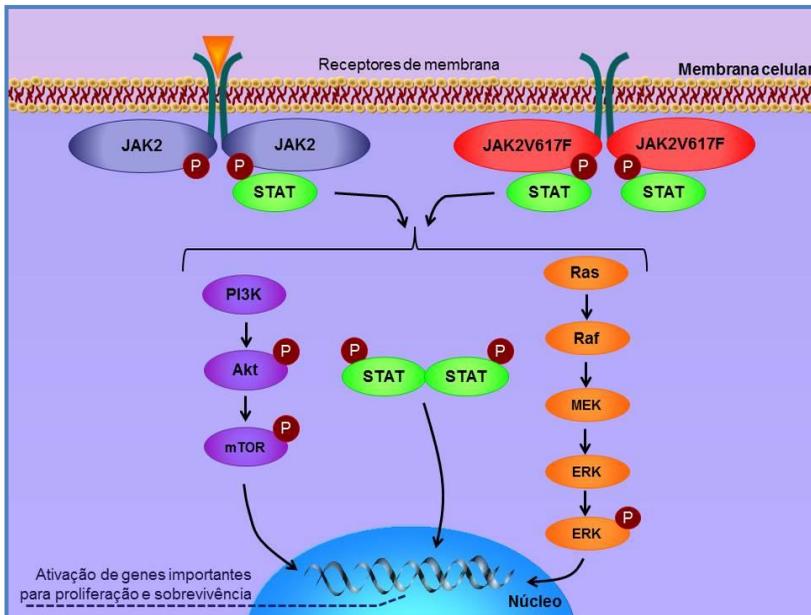
As mutações no *FLT3* modificam a estrutura do receptor, o que faz com que este fique constantemente ativo, independentemente da presença do ligante. Os receptores ativos, por sua vez, iniciam diversas vias de sinalização que estão envolvidas na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, como a da JAK2, a da transdutora de sinal e ativadora de transcrição 5 (STAT5) e a da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (LICÍNIO; SANTOS-SILVA, 2010; DALAL et al., 2012).

Como regra geral, a presença do *FLT3-DIT* em adultos com LMA apresenta pouco ou nenhum impacto na capacidade do paciente de atingir remissão completa, mas está amplamente associada a alta leucocitose ao diagnóstico, aumento do risco de recidiva e diminuição da sobrevida livre de doença e da sobrevida global (KIYOI et al., 1999; KOTTARIDIS et al., 2001; FROHLING et al., 2002; BIENZ et al., 2005). O significado prognóstico da *FLT3-D835* é controverso, mas, aparentemente, essa mutação piora a sobrevida livre de doença e a sobrevida global do paciente (YAMAMOTO et al., 2001; FROHLING et al., 2002).

A ativação constitutiva de receptores tirosina-cinase tem sido observada em diversas neoplasias hematopoiéticas, como as LAs, policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose primária (MFP) (COOLS et al., 2003; BENCH; ERBER; SCOTT, 2005; BOISSEL et al., 2006; SCHLENK et al., 2008; ABUTALIB; WETZLER; STOCK, 2009; AKAGI et al., 2009; WANG et al., 2010; YAGHMAIE et al., 2012). No ano de 2005, foi identificada uma nova mutação somática recorrente em neoplasias hematológicas que ocasiona a ativação constitutiva de outra tirosina-cinase, a JAK2. Essa mutação é denominada *JAK2V617F* por se tratar de uma mutação no éxon 14 do gene *JAK2*, localizado no cromossomo 9p24, que causa uma substituição de uma valina por uma fenilalanina no códon 617 do domínio pseudocinase da proteína JAK2 (BAXTER et al., 2005; JAMES et al., 2005; KRALOVICS et al., 2005; LEVINE et al., 2005b; ZHAO et al., 2005). A proteína JAK2 é uma enzima capaz de catalisar a transferência de um fosfato de uma molécula de ATP para resíduos de tirosina presentes no seu próprio domínio citoplasmático (autofosforilação) e para resíduos de tirosina de outras proteínas

citoplasmáticas que são componentes vitais em vias de sinalização relacionadas à diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. Dentre as vias ativadas pela JAK2, pode-se citar a dos fatores de transcrição STAT, a das MAPKs e a via Fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/Proteína Cinase B (Akt) (Figura 2) (LEVINE et al., 2007; BARCELOS; SANTOS-SILVA, 2011).

Figura 2 – Vias de sinalização ativadas pela JAK2 e JAK2V617F.



A proteína JAK2 catalisa a transferência de um fosfato para resíduos de tirosina de proteínas envolvidas nas vias de sinalização relacionadas à diferenciação, proliferação e sobrevivência celular, como as vias das Transdutoras de Sinal e Ativadoras de Transcrição (STATs), das Proteínas Cinasas Ativadas por Mitógeno (MAPKs) e da Fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/Proteína Cinase B (Akt). A mutação *JAK2V617F* confere uma atividade cinase constitutiva à sua proteína homônima, o que leva à proliferação descontrolada de células hematopoiéticas, independente da presença de ligantes. Adaptado de: LEVINE et al., 2007.

A mutação *JAK2V617F* confere uma atividade cinase constitutiva à sua proteína homônima, o que leva à proliferação descontrolada de células hematopoiéticas, independente da presença de ligantes (JAMES

et al., 2005; LEVINE et al., 2005b). A *JAK2V617F* é encontrada em mais de 90% dos casos de PV e em aproximadamente 50% dos casos de TE e MFP (SWERDLOW et al., 2008). Nas LAs, a frequência da mutação é bem inferior. Em um estudo com 222 pacientes com diagnóstico de LMA, Levine et al. (2005a) identificaram quatro casos positivos para *JAK2V617F*, sendo que desses, três tratavam-se de LMA secundária à neoplasia mieloproliferativa (NPM). Em outros estudos, Eghtedar et al. (2012) verificaram a presença da *JAK2V617F* em sete casos de LMA secundária à NMP (N=18) e três casos de LMA *de novo* (N=10); Frohling et al. (2006) encontraram cinco casos de LMA secundária à NMP (N=7) e apenas um caso de LMA *de novo* (N=152) positivos para a mutação; e Jelinek et al. (2005) identificaram apenas 2 casos de LMA positivos para a mutação (N=39). Nenhum desses estudos encontrou a *JAK2V617F* em casos de LLA (JELINEK et al., 2005; LEVINE et al., 2005a; FROHLING et al., 2006; EGHTEDAR et al., 2012). O papel da mutação *JAK2V617F* nas LAs ainda não está definido e mais estudos são necessários. No entanto, um estudo recente com 34 pacientes sugeriu que a presença da *JAK2V617F* nas NMPs parece estar associada com uma aceleração para a transformação leucêmica (RINALDI et al., 2010).

As alterações citogenéticas e moleculares também apresentam grande relação com a idade do paciente. Nas LMAs, a incidência de anormalidades citogenéticas desfavoráveis, como a deleção do cromossomo 5 ou 7, em pacientes com mais de 60 anos é de 23%, enquanto nos indivíduos com menos de 60 anos, esta incidência cai para 15% (LEITH et al., 1997; GRIMWADE et al., 2010). Dessa forma, dentro de cada grupo de risco citogenético, o prognóstico piora com o aumento da idade. Contudo, é importante ressaltar que a idade também é considerada um fator prognóstico independente e que, de forma geral, indivíduos com idade superior a 60 anos apresentam pior prognóstico (SHIPLEY; BUTERA, 2009; CORNELL; PALMER, 2012). Entretanto, 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 (LEITH et al., 1997; LEVI et al., 2000; FERRARA; PALMIERI; LEONI, 2008; ESTEY, 2012).

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 em uma alta probabilidade de erro na contagem de blastos. 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, uma vez que uma elevada leucometria reflete uma elevada massa tumoral (BASSAN et al., 2004; SHIPLEY; BUTERA, 2009). No entanto, foram estabelecidos pontos de cortes para facilitar o estadiamento dos pacientes no momento do diagnóstico. De forma geral, são considerados de pior prognóstico leucometria superior a 30.000 leucócitos/mm<sup>3</sup> em indivíduos com LMA e LLA-B, e superior a 100.000 leucócitos/mm<sup>3</sup> em indivíduos com LLA-T (BASSAN et al., 2004; CORNELL; PALMER, 2012).

Outro fator de prognóstico utilizado por também refletir a massa tumoral nas neoplasias hematológicas é a atividade da LDH. A LDH é uma enzima intracelular cuja atividade está associada ao metabolismo celular, o que a torna um marcador de proliferação celular. Dessa forma, o aumento sérico da LDH reflete a grande capacidade proliferativa das células neoplásicas dos portadores de LA e é considerado como um fator de mau prognóstico (VARMA; VARMA, 2008).

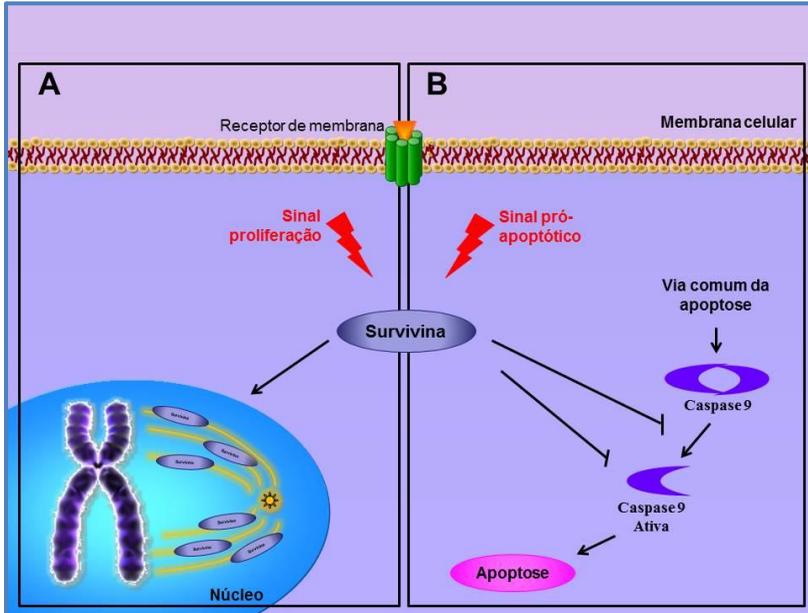
A expressão de imunofenótipos aberrantes também está relacionada ao prognóstico das LAs e deve ser considerado no momento da determinação da conduta terapêutica. Fenótipos aberrantes são aqueles em que uma célula de uma determinada linhagem expressa antígenos característicos de outra linhagem, ou seja, antígenos que em circunstâncias normais não seriam encontrados naquele tipo celular. Um fenótipo aberrante frequentemente encontrado em alguns subtipos de LMA, e que está associado a um pior prognóstico e uma menor chance de cura, é a expressão de CD56, um marcador típico dos linfócitos *natural killer* (SWERDLOW et al., 2008). Nas LLAs, a expressão de antígenos mieloides, como o CD13 e o CD33, parece conferir um pior prognóstico (BASSAN et al., 2004).

A contínua expressão de alguns antígenos também pode ser utilizada como marcador de prognóstico, como exemplo, pode-se citar a expressão sustentada de CD34. Esse marcador é normalmente encontrado em blastos e sua expressão é rapidamente suprimida à medida que essas células maturam. Dessa forma, o CD34 é normalmente encontrado em células menos diferenciadas e, portanto, menos responsivas ao tratamento quimioterápico. Com isso, a presença de CD34 está relacionada com neoplasias mais agressivas e com menor taxa de remissão nas LMAs (PLESA et al., 2008; SWERDLOW et al., 2008; DALAL et al., 2012).

Em alguns casos, determinados antígenos não são considerados como marcadores de prognóstico *per se*, mas tornam-se indicadores por estarem associados a outros fatores de prognóstico. Por exemplo, nas LMAs, os antígenos linfoides CD19 e CD79a são frequentemente encontrados na presença da  $t(8;21)(q22;q22)$ , que é uma alteração cromossômica de risco favorável nessa doença (SWERDLOW et al., 2008). O CD34 é um indicativo de mau prognóstico nas LLAs por estar comumente associado à  $t(9;22)(q34;q11)$ , uma alteração citogenética de prognóstico desfavorável (BASSAN et al., 2004). Nas LMAs, a presença de CD34 também está relacionada com a presença da mutação *FLT3-DIT* (DALAL et al., 2012) e com a expressão de survivina (DUFFY et al., 2007; FUKUDA et al., 2009; AHMED et al., 2012; CARTER et al., 2012).

A survivina é uma proteína multifuncional que inibe a apoptose, regula a divisão celular e aumenta a angiogênese (Figura 3). Apesar de ser raramente expressa em células e tecidos diferenciados, a superexpressão dessa proteína é encontrada na maioria dos cânceres (VELCULESCU et al., 1999; DUFFY et al., 2007; MITA et al., 2008). Nos tumores sólidos, vários estudos correlacionaram a expressão de survivina com um curso clinicamente desfavorável da doença, resistência a fármacos, pior prognóstico e menor sobrevida do paciente (ISLAM et al., 2000; SHINOHARA et al., 2005; CHURCH; TALBOT, 2012). O valor prognóstico da survivina nas neoplasias hematológicas não foi tão amplamente estudado e os dados existentes são limitados. Um estudo demonstrou que, nas LMAs, a alta expressão de survivina está associada a uma menor sobrevida global e livre de eventos (CARTER et al., 2012). Em outro estudo com pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA, a expressão de survivina foi significativamente maior no grupo de alto risco, e os pacientes que recidivaram apresentaram maiores níveis basais de survivina do que os que permaneciam em remissão após o tratamento (ESH et al., 2011).

Figura 3 – Funções da survivina na mitose e apoptose.



Painel A - A survivina medeia a segregação adequada das proteínas do complexo de passageiros cromossômicos para os cinetocoros e estabiliza os microtúbulos, o que contribui para a formação do fuso bipolar. Painel B – Após a ativação da sinalização celular pró-apoptótica, a survivina é liberada da mitocôndria para o citosol e inibe a ativação e a atividade da caspase 9. Adaptado de: MITA et al. 2008.

Apesar dos fatores clínicos e laboratoriais acima citados possuírem grande influência no resultado do tratamento, uma das determinantes primárias para a sobrevivência do paciente é a sensibilidade da doença à quimio-radioterapia. Por isso, a resposta do paciente à primeira etapa do tratamento também é considerada um fator prognóstico importante e a pesquisa de doença residual mínima (DRM) é de realização obrigatória (DWORZAK et al., 2002; SWERDLOW et al., 2008; NCCN, 2012b; NCCN, 2012a). De maneira geral, pacientes com LMA ou LLA que atingem remissão completa após o primeiro ciclo de quimioterapia ou após quatro a cinco semanas de tratamento, respectivamente, são considerados responsivos ao tratamento e, portanto, são classificados como de melhor prognóstico (BASSAN et

al., 2004; ABUTALIB; WETZLER; STOCK, 2009; SHIPLEY; BUTERA, 2009; CORNELL; PALMER, 2012).

A correta análise dos diversos fatores prognósticos existentes (Quadro 2), juntamente com a exata classificação do subtipo de LA permitiram a instituição de terapias mais individualizadas e efetivas (KRUG et al., 2011; NARAYANAN; SHAMI, 2012). Apesar da individualização do tratamento, a maioria das terapias antineoplásicas objetiva atingir a remissão completa, ou seja, destruir as células leucêmicas, causando o menor dano possível aos tecidos normais. Existem diferentes tipos de tratamentos antileucêmicos, no entanto, a quimioterapia é o mais utilizado (BURNETT, 2012; CORNELL; PALMER, 2012; NARAYANAN; SHAMI, 2012). Ela consiste na utilização de uma variedade de fármacos citotóxicos que objetivam promover a morte celular por apoptose ou modificar processos intracelulares que convergem a ela. Portanto, 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 (HERR; DEBATIN, 2001).

Quadro 2 – Fatores de prognóstico em indivíduos com diagnóstico de leucemia aguda.

<b>Fator de prognóstico</b>	<b>Impacto no prognóstico</b>
Idade de 60 anos ou mais ao diagnóstico	Desfavorável
Leucemotria superior a 30.000 leucócitos/mm <sup>3</sup> *	Desfavorável
Aumento da atividade da LDH	Desfavorável
Presença dos marcadores CD34 e CD56	Desfavorável nas LMAs
Translocações t(15;17)(q22;q12-21); t(8;21)(q22;q22); e t(16;16)(p13;q22)	Favorável nas LMAs
Translocação t(9;22)(q34;q11)	Desfavorável nas LMAs e LLAs
Mutação <i>FLT3-DIT</i> (13q12)	Desfavorável nas LMAs
Mutações <i>FLT3-D835</i> (13q12) e <i>JAK2V617F</i> (9p24)	Em investigação
Superexpressão de survivina	Em investigação

LMA – Leucemia mieloide aguda; LLA – Leucemia linfoide aguda. \*Superior a 100.000 leucócitos/mm<sup>3</sup> em indivíduos com diagnóstico de LLA-T; LDH – Lactato desidrogenase. Adaptado de: KOTTARIDIS et al.; 2001; FROHLING et al., 2002; BIENZ et al., 2005; SWERDLOW et al., 2008; VARMA; VARMA, 2008; RINALDI et al., 2010; CORNELL; PALMER, 2012.

O tratamento das LMAs é constituído de duas fases: a quimioterapia de indução e a terapia de pós-remissão. Nas LLAs, o tratamento em geral é dividido em: fase de indução, terapia de consolidação e de manutenção, profilaxia e/ou tratamento do sistema nervoso central (SNC) e transplante de células tronco (CORNELL; PALMER, 2012; NCCN, 2012a; NCCN, 2012b). A fase de indução consiste em uma terapia intensa que visa alcançar remissão hematológica completa, ou seja, fazer com que a MO apresente menos de 5% de blastos, que a hematopoiese normal se reestabeleça e que nenhuma doença extramedular seja detectada (CORNELL; PALMER, 2012; NARAYANAN; SHAMI, 2012). A terapia de pós-remissão ou consolidação é utilizada assim que a remissão completa é alcançada e objetiva evitar recidiva da doença, diminuindo a quantidade de células leucêmicas não detectadas laboratorialmente. A fase de manutenção pode durar de um a dois anos e tem como objetivo prevenir que o paciente tenha recidiva após a realização das terapias de indução e consolidação. A profilaxia e/ou tratamento do SNC realizada nos casos de LLA objetiva eliminar as células leucêmicas de locais que não são facilmente alcançados pelos quimioterápicos de uso sistêmico devido à presença da barreira hematoencefálica (NCCN, 2012a). O transplante de MO é utilizado apenas em alguns casos selecionados de LLA, como em pacientes com alterações citogenéticas de risco desfavorável, e visa aumentar a sobrevida a longo prazo e as chances de cura do paciente. Idealmente, o doador de MO deve ser um parente consanguíneo que apresente compatibilidade com os antígenos leucocitários humanos (HLA) expressos pelo receptor. Contudo, na ausência de um doador consanguíneo, doadores compatíveis não aparentados também podem ser considerados (CORNELL; PALMER, 2012).

Apesar do desenvolvimento de novos fármacos e da constante atualização dos protocolos, o tratamento das LAs ainda permanece um desafio (ROBOZ, 2011; NARAYANAN; SHAMI, 2012). Atualmente, entre 70% e 80% dos pacientes com menos de 60 anos que apresentam diagnóstico de LMA atingem remissão completa após o tratamento. No entanto, a maioria dos pacientes tem recidiva e apenas 40% a 45% deles sobrevive após cinco anos. Para os indivíduos com mais de 60 anos, os índices de remissão são ainda piores, pois somente 40% a 50% dos indivíduos em condições de receber tratamento no momento do diagnóstico atinge a remissão; a taxa de cura é inferior a 10% e a mediana de sobrevida é de menos de um ano (PULTE; GONDOS; BRENNER, 2010; ROBOZ, 2011; CORNELL; PALMER, 2012). Em relação às LLAs, os atuais protocolos de tratamento conseguem taxas de

remissão de 80% a 90% em pacientes adultos. Contudo, o tempo de remissão é curto, menos de 40% dos indivíduos com 60 anos ou menos atingem a cura e, entre os pacientes com mais de 60 anos, menos de 15% consegue alcançar a cura (HARRISON, 2011; CORNELL; PALMER, 2012; NARAYANAN; SHAMI, 2012).

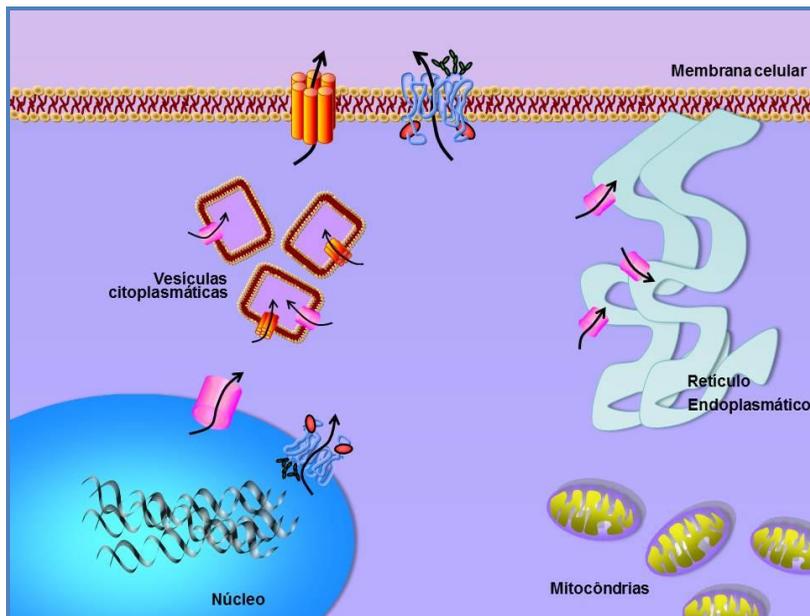
O insucesso no tratamento das LAs relaciona-se, principalmente, à elevada proporção de pacientes resistentes à quimioterapia e que, portanto, não atingem a remissão completa ou apresentam recidiva após uma resposta inicial favorável (EL-SHARNOUBY et al., 2010; SHAFFER et al., 2012). Em geral, a resistência clínica a fármacos é conferida por dois diferentes mecanismos: resistência celular a fármacos e recrudescimento leucêmico (DEN BOER et al., 1998; KRUH, 2003; ABUTALIB; WETZLER; STOCK, 2009). A resistência celular a múltiplos fármacos (MDR) denota uma condição na qual as células são resistentes à ação tóxica de uma variedade de fármacos não relacionados estrutural e funcionalmente. A MDR pode ser conferida por um ou mais mecanismos de resistência, sendo que dois dos mais importantes são a ativação de mecanismos antiapoptóticos, como a ativação da survivina, e a superexpressão de genes *mdr*, como o *abcb1*, o *abcc1* e o *lrp*, os quais codificam proteínas que funcionam como bombas de efluxo de fármacos. Além disso, esses mecanismos de resistência podem estar presentes desde o início da doença ou ser induzidos pelo tratamento (NORGAARD; OLESEN; HOKLAND, 2004; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; CHAUHAN et al., 2012).

## 2.2 BOMBAS DE EFLUXO DE FÁRMACOS

Provavelmente, uma das formas mais significantes e estudadas de resistência a múltiplos fármacos antineoplásicos é pela ação de um grupo de proteínas de membrana que funcionam como bombas de efluxo de fármacos. Essas proteínas podem localizar-se na membrana citoplasmática, na membrana nuclear ou na membrana de compartimentos intracelulares, e são capazes de transportar para fora da célula, ou afastar do seu alvo celular, moléculas tóxicas, mantendo as concentrações citoplasmáticas de quimioterápicos abaixo das concentrações desejadas (Figura 4) (NORGAARD; OLESEN; HOKLAND, 2004; LUQMANI, 2005; DE JONGE-PEETERS et al., 2007). Duas famílias de proteínas são as principais implicadas no fenômeno de MDR: a superfamília das transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*) e a família das proteínas do grupo *Vault* (KOURTI et al., 2007; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; EL-

SHARNOUBY et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012; SCHEINER et al., 2012).

Figura 4 – Localização celular das bombas de efluxo de fármacos.



As proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MDR) podem localizar-se na membrana citoplasmática, na membrana nuclear ou na membrana de compartimentos intracelulares. Elas são capazes de transportar para fora da célula, ou afastar do seu alvo celular, moléculas citotóxicas, mantendo as concentrações citoplasmáticas de quimioterápicos abaixo das concentrações citotóxicas desejadas.  – ABCB1;  – ABCC1;  – LRP;  – Direção do efluxo de fármacos. Adaptado de: NORGAARD; OLESEN; HOKLAND, 2004; DE JONGE-PEETERS et al., 2007.

Os membros da superfamília dos transportadores ABC são bombas de efluxo de fármacos dependentes de ATP envolvidas nos processos de absorção, distribuição e excreção de vários compostos farmacológicos e endógenos (DEAN; FOJO; BATES, 2005; LUQMANI, 2005; DE JONGE-PEETERS et al., 2007). Baseado na organização genômica, na ordem dos domínios e na homologia das sequências, essa superfamília foi dividida em sete subclasses, que foram denominadas, em ordem alfabética, de ABCA à ABCG (LEONARD;

FOJO; BATES, 2003; LUQMANI, 2005; DE JONGE-PEETERS et al., 2007). Dentre os diversos membros dessa superfamília, a ABCB1 e a ABCC1 são as mais bem estudadas e estão amplamente relacionadas com um prognóstico desfavorável em várias neoplasias hematológicas (Quadro 3) (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; EL-SHARNOUBY et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012; SCHEINER et al., 2012).

O grupo *Vault* é formado por organelas localizadas principalmente em vesículas citoplasmáticas, mas uma pequena fração também pode ser encontrada na membrana nuclear e nos complexos de poros nucleares (ROME; KEDERSHA; CHUGANI, 1991; SCHEFFER et al., 1995; IZQUIERDO et al., 1998; SWERTS et al., 2006; EL-SHARNOUBY et al., 2010). A função exata das proteínas que compõem esse grupo 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 (ROME; KEDERSHA; CHUGANI, 1991; IZQUIERDO et al., 1998; HUH et al., 2006; EL-SHARNOUBY et al., 2010; LARA et al., 2011). Dentre os membros dessa família, a LRP é a mais frequentemente relacionada ao fenômeno de MDR (SCHEPER et al., 1993; SCHEFFER et al., 1995; VALERA et al., 2004; BERGER et al., 2009; LARA et al., 2011).

Quadro 3 – Comparação de estudos que avaliaram a importância da expressão de *abcb1/ABCB1*, *abcc1/ABCC1* e *lrp/LRP* no prognóstico dos portadores de LA.

<b>Autor</b>	<b>Método</b>	<b>Amostra</b>	<b>Resultados/Conclusões</b>
DHOOGHE et al., 1999	Imunohistoquímico	LLA (n=102) e LLA <i>dn</i> (n=35)	A expressão da proteína ABCB1 influenciou negativamente o prognóstico, principalmente nos casos de LLA <i>dn</i> .
WUTCHER et al., 2000	CF	LLA (n=102) e LMA (n=121)	A expressão da proteína ABCB1 não influenciou negativamente o prognóstico.
SCHAICH et al., 2005	RT-PCR	LMA <i>dn</i> (n=331)	A expressão de ABCB1 e ABCC1 influenciou negativamente a remissão completa da doença após tratamento, enquanto que LRP não influenciou negativamente o prognóstico.
VALERA et al., 2004	RT-PCR	LLA (n=30)	Entre a avaliação das proteínas ABCB1, ABCC1 e LRP, apenas LRP influenciou negativamente o prognóstico.
HUH et al., 2006	RT-PCR	LLA (n=32) e LMA (n=39)	A expressão de ABCB1, ABCC1 e LRP influenciou a remissão completa e a taxa de sobrevivência em pacientes com LA, destacando-se ABCC1 e LRP.
STYCZYNSKI et al., 2007	CF	LLA (n=527), LLA <i>dn</i> (n=104), LMA (n=133) e LMA <i>dn</i> (n=23)	A expressão de ABCB1, ABCC1 e LRP desempenhou fator prognóstico adverso com relevância nos casos de LLA <i>dn</i> .
YASUNAMI et al., 2007	CF e qRT-PCR	LLA de cél. maduras (n=11)	Entre a avaliação das proteínas ABCB1, ABCC1 e LRP, apenas LRP apresentou expressão e função aumentadas.
FEDASENKA et al., 2008	qRT-PCR	LLA pré-B (n=19)	A expressão de ABCC1 e LRP não teve relação direta com a doença residual mínima.
GROTEL et al., 2008	CF e qRT-PCR	LLA-TI (n=72)	A expressão de ABCB1, ABCC1 e LRP ao diagnóstico, em todos os cut offs adotados, não influenciou negativamente o prognóstico.
SVIRNOVSKI et al., 2009	CF e RT-PCR	LLA I (n=65), LLA <i>dn</i> (n=42), LMA (n=53) e LMA <i>dn</i> (n=16)	Não houve diferença significativa entre a expressão do gene <i>abcb1</i> e da proteína ABCB1 nos pacientes com leucemia aguda <i>de novo</i> e recentemente diagnosticada.
EL-SHARNOUBY et al., 2010	RT-PCR	LA (n=34)	A expressão de ABCC1 e LRP associou-se com pior prognóstico e pior sobrevida livre de doença.
CHAUHAN et al., 2012	qRT-PCR	LLA (n=40) e LMA (n=45)	Elevada expressão de ABCB1 nas LMAs e de ABCC1 nas LLAs associou-se com pior resposta à terapia de indução.
SCHEINER et al., 2012	CF	LMA (n=109)	A expressão de ABCB1 não apresentou impacto na resposta à terapia de indução.

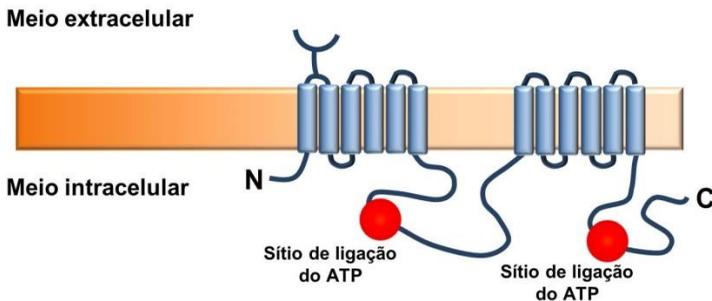
LA – Leucemia aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda; LLA – Leucemia linfóide aguda; *dn* – *de novo*; cél. – Células; Imunohistoquímico – Imunohistoquímica; CF – Citometria de Fluxo; RT-PCR – Transcrição reversa-Reação em cadeia da polimerase; qRT-PCR – RT-PCR em tempo real.

## 2.2.1 Proteína de Resistência a Múltiplos Fármacos 1 (ABCB1/Glicoproteína-P/Pgp/MDR1)

A proteína ABCB1 foi inicialmente descrita por Juliano e Ling (1976) que, ao investigarem perfis de MDR em linhagens celulares de ovário de hamster chinês, identificaram uma glicoproteína de 170 kDa, denominada de glicoproteína-P (Pgp), que estava envolvida na alteração de permeabilidade aos fármacos (JULIANO; LING, 1976). Em 1985, Fojo et al. caracterizaram a presença de uma sequência de DNA comumente amplificada em células com fenótipo MDR e que era responsável pela codificação de um peptídeo de 170 kDa. Essa sequência foi, então, denominada de sequência de resistência a múltiplos fármacos 1 (*mdr1*) (FOJO et al., 1985). No ano seguinte, Chen et al. (1986) sequenciaram o gene *mdr1* e demonstraram que ele codificava uma proteína de 1.280 aminoácidos consistente com a estimativa do tamanho da Pgp, comprovando que o gene *mdr1* era o responsável pela sua codificação (CHEN et al., 1986). Posteriormente, a Pgp foi caracterizada como pertencente a subfamília B dos transportadores ABC. Diante disso, tanto o gene *mdr1*, quanto a proteína Pgp foram renomeados como *abcb1* e ABCB1, respectivamente (DEAN; ALLIKMETS, 2001).

O gene *abcb1* localiza-se no cromossoma 7q21.12 (DEAN; ALLIKMETS, 2001) e codifica uma proteína glicosilada composta por duas metades homólogas e simétricas, uma composta por uma região transmembranar constituída por um domínio N-terminal e outra por um domínio citosólico C-terminal, e ambas contendo um sítio de ligação para ATP (Figura 5). Os domínios transmembrana são compostos por seis segmentos abrangentes capazes de reconhecer e ligar-se a substâncias hidrofóbicas neutras ou fracamente positivas e transportá-las para fora do compartimento intracelular à custa da energia proveniente da hidrólise do ATP (CHEN et al., 1986; GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002; VAN DER DEEN et al., 2005; DE JONGE-PEETERS et al., 2007; HEMBRUFF et al., 2008; SHIPLEY; BUTERA, 2009).

Figura 5 – Estrutura da proteína de resistência a múltiplos fármacos 1 (ABCB1/Glicoproteína-P/Pgp/MDR1).



A ABCB1 é composta por duas metades homólogas e simétricas, uma composta por uma região transmembranar constituída por um domínio N-terminal e outra por um domínio citosólico C-terminal, e ambas contendo um sítio de ligação para ATP. Adaptado de: CHEN et al., 1986.

Fisiologicamente, a ABCB1 possui papel na defesa da célula contra estímulos externos. Devido a sua função, essa proteína encontra-se em células de tecidos normais envolvidos em processos fisiológicos de absorção e excreção de compostos, como o fígado e o intestino; e em células de órgãos com função de barreira sanguínea, como a barreira hematoencefálica, o endotélio capilar e a placenta (DUHEM; RIES; DICATO, 1996; GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002; VAN DER DEEN et al., 2005). A ABCB1 também é detectada nos precursores hematopoiéticos e linfócitos, e apresenta papel fundamental na regulação da proliferação e diferenciação dessas células (DUHEM; RIES; DICATO, 1996; MARZOLINI et al., 2004; VAN DER DEEN et al., 2005). Essa proteína também parece exercer papel no transporte de fosfolipídios pela membrana celular e atuar como molécula antiapoptótica por meio da inibição da ativação das caspases 8 e 3 (JOHNSTONE; CRETNEY; SMYTH, 1999; SCOTTO; JOHNSON, 2001; BUDA et al., 2008). Além disso, alguns polimorfismos de ABCB1 estão relacionados com a resposta imune que envolve processos inflamatórios e atuam na liberação de diversas citocinas, como as interleucinas-2 e 4, o interferon- $\gamma$  e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (PARK et al., 2003; BUDA et al., 2008; BALCERCZAK et al., 2010). Interessantemente, devido a suas diversas funções, a intensidade de expressão de ABCB1 é altamente variável entre os diferentes tecidos e indivíduos e é dependente tanto de características genotípicas, quanto

de condições gerais de metabolismo e meio ambiente, o que inclui exposição a choques térmicos, irradiação, estresse genotóxico e estímulos antiinflamatórios (SCOTTO; JOHNSON, 2001; LUQMANI, 2005).

Dentre os tipos de substrato que a ABCB1 é capaz de transportar para exercer sua função de proteção, incluem-se diversas moléculas de fármacos (Quadro 4) (KOURTI et al., 2007; HEMBRUFF et al., 2008; SHIPLEY; BUTERA, 2009). Assim, a expressão de ABCB1 tem sido amplamente relacionada com a resistência à quimioterapia (KOURTI et al., 2007; CHAUHAN et al., 2012; SCHEINER et al., 2012; TONG et al., 2012).

Quadro 4 – Lista de fármacos que são transportados pela ABCB1.

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

Adaptados de: LUQMANI, 2005; DE JONGE-PEETERS et al., 2007.

A função em nível celular da ABCB1 em células neoplásicas tem sido extensivamente investigada (LEGRAND; ZITTOUN; MARIE, 1999; MAHJOUBI et al., 2008; HIROSE, 2009; CHAUHAN et al., 2012). A alteração da atividade e da expressão da ABCB1 podem representar um fator de risco independente na falha do tratamento quimioterápico (TSIMBERIDOU et al., 2002; MAHADEVAN; LIST, 2004; LOURENÇO et al., 2008; SHIPLEY; BUTERA, 2009; HIRSCH et al., 2012) e um aumento da sua atividade ou expressão têm sido associada a menores taxas de remissão completa, maiores chances de recidiva e menor sobrevida livre de doença em pacientes tratados com regimes terapêuticos padrão (LEITH et al., 1997; LEITH et al., 1999; KOURTI et al., 2007; CRIPE et al., 2010; DAMIANI et al., 2010; PALLIS et al., 2011; CHAUHAN et al., 2012; HIRSCH et al., 2012). Um estudo demonstrou que 56% dos pacientes adultos com LMA que não expressavam ABCB1 atingiram remissão completa após a terapia de indução, enquanto apenas 31% dos portadores de LMA que expressavam ABCB1 atingiram remissão completa (SCHAICH et al., 2005). Outro trabalho demonstrou que, nos casos de LLA, as taxas de remissão dos pacientes que expressavam e dos que não expressavam ABCB1 no momento do diagnóstico eram similares. No entanto, esse mesmo trabalho relatou que os portadores de LLA que expressavam ABCB1 ao diagnóstico apresentavam maior frequência de recidiva (45%) após seis meses do que os que não expressavam (16%) (DAMIANI et al., 2002). A intensidade de expressão de ABCB1 também parece estar correlacionada com variáveis prognósticas clínicas e biológicas, como a idade (PALLIS et al., 2011; CHAUHAN et al., 2012), o imunofenótipo (SAMDANI et al., 1996), a contagem de leucócitos ao diagnóstico (VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; PALLIS et al., 2011), a expressão de CD34 (SAMDANI et al., 1996; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; CHAUHAN et al., 2012; HIRSCH et al., 2012) e a resposta à terapia de indução (LIST et al., 1996; PALLIS et al., 2011). No entanto, esses estudos são controversos e, apesar de estudos relatarem que a ABCB1 possui significado prognóstico em certos tipos de neoplasias (VAN DEN HEUVEL-EIBRINK; SONNEVELD; PIETERS, 2000; WUCHTER et al., 2000; PENSON et al., 2004; CHAUHAN et al., 2012; HIRSCH et al., 2012), outros falham em demonstrar correlação com a resposta clínica do paciente (LEONESSA; CLARKE, 2003; ELSAYED; ISMAIL; MONEER, 2011; ROCKOVA et al., 2011).

Apesar dos dados contraditórios, a OMS considera a expressão de ABCB1 como um fator prognóstico importante nas LMAs

(SWERDLOW et al., 2008) e muitos centros a utilizam como um indicador da necessidade para um protocolo de tratamento mais agressivo, com quimioterápicos de segunda ou terceira linha (DUHEM; RIES; DICATO, 1996). Outra adaptação de protocolo sugerida pela presença de ABCB1 é a adição de inibidores de proteínas MDR ao tratamento. No entanto, a utilização desses fármacos ainda não está estabelecida, uma vez que muitos estudos falharam em demonstrar os benefícios dos moduladores de ABCB1 (CRIPE et al., 2010; KOLITZ et al., 2010; SHAFFER et al., 2012).

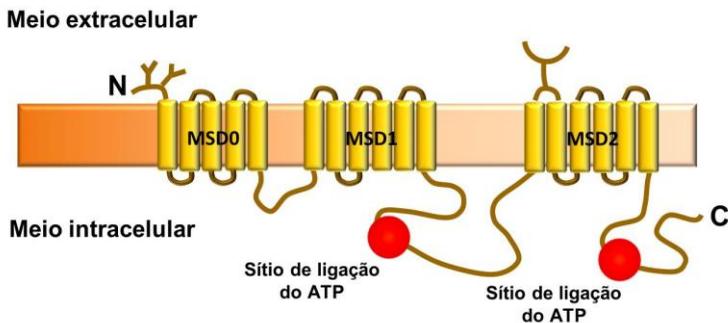
### **2.2.2 Proteína Associada à Resistência a Múltiplos Fármacos 1 (ABCC1/MRP1)**

A descoberta, caracterização e identificação da proteína ABCC1 e do gene responsável pela sua codificação, seguiu caminhos semelhantes aos da proteína ABCB1. Inicialmente, vários estudos mostravam que algumas linhagens de células tumorais apresentavam fenótipo MDR sem expressar a proteína ABCB1, o que reforçava a hipótese da existência de outra proteína envolvida no efluxo de xenobióticos (MCGRATH; CENTER, 1987; MIRSKI; GERLACH; COLE, 1987). Alguns anos depois, Cole et al. (1992) identificaram a sequência gênica responsável pelo fenótipo MDR em linhagens de células tumorais ABCB1 negativa. Nesse mesmo estudo, verificou-se que essa sequência codificava um membro da superfamília de transportadores ABC, que foi denominado de Proteína Associada à Resistência a Múltiplos Fármacos 1 (MRP1) (COLE et al., 1992). Em 1994, a proteína MRP1 foi caracterizada como uma proteína integral de membrana, glicosilada e com peso molecular em torno de 190 kDa (GRANT et al., 1994). Após a descoberta da MRP1, outras onze proteínas homólogas (MRP2-MRP12) foram caracterizadas e consideradas membros da mesma família. No entanto, apenas oito (MRP2-MRP9) delas parecem estar relacionadas com o fenótipo MDR. Posteriormente, esta família passou a ser chamada de subfamília ABCC de transportadores ABC e a proteína MRP1 e o gene *mrp1* passaram a serem denominados de proteína ABCC1 e gene *abcc1*, respectivamente (BORST et al., 2000; DE JONGE-PEETERS et al., 2007; EL-SHARNOUBY et al., 2010; DA GRACA ROCHA et al., 2012).

O gene *abcc1* localiza-se no cromossoma 16p13.12 (COLE et al., 1992). Estruturalmente, a ABCC1 possui três domínios abrangentes de membrana (MSD). Os dois primeiros (MSD1 e MSD2) contêm seis hélices transmembranares cada, enquanto o terceiro (MSD0), com

aproximadamente 200 aminoácidos, é formado por apenas cinco hélices transmembranares e por uma região amino (NH<sub>2</sub>) terminal (Figura 6) (KAST; GROS, 1997). Acredita-se que a ligação da proteína aos seus substratos ocorra pela interação entre estas hélices transmembranares (ZHANG; COLE; DEELEY, 2001; HAIMEUR et al., 2004). Na porção citoplasmática da proteína, há dois sítios de ligação de nucleotídeos (NBDs) (KAST; GROS, 1997; COLE; 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; DEELEY, 2006).

Figura 6 – Estrutura da proteína associada à resistência a múltiplos fármacos 1 (ABCC1/MRP1).



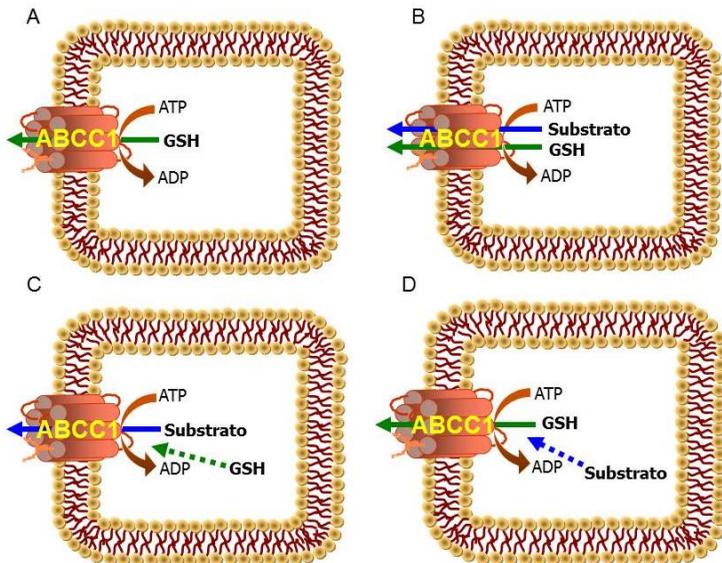
A ABCC1 possui três domínios abrangentes de membrana (MSD). Os dois primeiros (MSD1 e MSD2) contêm seis hélices transmembranares cada, enquanto o terceiro (MSD0) é formado por apenas cinco hélices transmembranares e por uma região amino (NH<sub>2</sub>) terminal. Adaptado de: KAST; GROS, 1997.

Da mesma forma que a ABCB1, a expressão de ABCC1 é variável entre os diferentes tecidos e indivíduos. Ela é altamente expressa nos pulmões, cérebro, testículos, rins, esqueleto, músculo cardíaco e esquelético, placenta, intestinos, fígado e células sanguíneas (BORST et al., 2000; DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; VAN DER DEEN et al., 2005; COLE; DEELEY, 2006; DEELEY; WESTLAKE; COLE, 2006). A intensidade e o local de expressão da ABCC1 estão amplamente relacionados com a sua função de transportar substratos fisiológicos neutros ou hidrofóbicos aniônicos, como o leucotrieno C<sub>4</sub> e a glutatona reduzida, pela

membrana celular (MAO; DEELEY; COLE, 2000; GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002). Além disso, a ABCC1 atua no sentido de proteger as células, exercendo sua ação na extrusão de metabólitos tóxicos de xenobióticos, com o intuito de impedir o acúmulo dos mesmos (LOE; DEELEY; COLE, 1996; DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001; LESLIE; DEELEY; COLE, 2005; VAN DER DEEN et al., 2005).

O mecanismo pelo qual a ABCC1 transporta seus substratos pela membrana celular é complexo e ainda não está completamente compreendido. No entanto, sabe-se que a ABCC1 é capaz de transportar conjugados de glutatona reduzida (GSH) e que o transporte dos seus substratos é dependente da interação da ABCC1 com o GSH (LOE; DEELEY; COLE, 1996; WONG et al., 2009). A GSH parece interagir com a ABCC1 por meio de, pelo menos, quatro diferentes mecanismos (Figura 7): i) a GSH *per se* é substrato de baixa afinidade para a ABCC1; ii) a GSH é requerida para o cotransporte de alguns substratos da ABCC1; iii) a GSH estimula o transporte de alguns compostos através da ABCC1, mas ela não é cotransportada; iv) o transporte da GSH pode ser intensificado por certos compostos, os quais não são substratos da ABCC1 (BALLATORI et al., 2005). O mecanismo mais aceito para explicar a resistência conferida pela ABCC1 é o de que a GSH forme complexos com os agentes quimioterápicos, o que possibilita a ABCC1 extruí-los para fora da célula (ZAMAN et al., 1995; COLE; DEELEY, 2006; WONG et al., 2009). 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; BALLATORI et al., 2005). Além disso, outros trabalhos demonstraram que a redução da concentração de GSH diminui a resistência a alcalóides da vinca e antraciclinas mediada pela ABCC1 (ISHIKAWA et al., 1996; KUO et al., 1998; BORST et al., 2000).

Figura 7 – Possíveis mecanismos de interação entre ABCC1 e GSH.



(A) A glutatona reduzida (GSH) como substrato para ABCC1; (B) A GSH como cotransportador de alguns substratos para ABCC1; (C) GSH como estimulador do transporte de certos compostos pela ABCC1, porém, a GSH não é cotransportada; (D) O transporte da GSH é acelerado por certos compostos, mas estes não são transportados pela ABCC1. GSH – Glutatona reduzida; ATP – Adenosina trifosfato; ADP – Adenosina difosfato. Adaptado de: BALLATORI et al., 2005.

Da mesma forma que a ABCB1, devido a sua capacidade de transportar substratos, a ABCC1 tem sido relacionada à resistência à quimioterapia (EL-SHARNOUBY et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012; GREAVES et al., 2012). No entanto, apesar das similaridades entre os perfis de resistência *in vitro* de ambas as proteínas, algumas diferenças importantes ainda existem (LAUTIER et al., 1996; LOCKHART; TIRONA; KIM, 2003; HEMBRUFF et al., 2008), como, por exemplo, o transporte de paclitaxel e colchicina. Enquanto a proteína ABCB1 possui avidez por ambos quimioterápicos, o que fornece grande resistência a esses compostos, a ABCC1 não tem uma boa capacidade de extrusão dos mesmos, o que faz com que a expressão de ABCC1 confira apenas uma pequena resistência ao paclitaxel e a colchicina (LOE;

DEELEY; COLE, 1996). Atualmente, sabe-se que a expressão da ABCC1 confere resistência às antraciclinas, aos alcalóides da vinca, aos etoposídeos, ao metotrexato, à mitoxantrona, e à camptotecina (BORST et al., 2000; KRUH, 2003; COUTURE; NASH; TURGEON, 2006; DE JONGE-PEETERS et al., 2007).

A literatura traz dados discordantes acerca do papel da ABCC1 nas LAs, por isso a sua importância no prognóstico ainda não está bem estabelecida. Enquanto 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 (SCHNEIDER et al., 1995; PLASSCHAERT et al., 2005; SCHAICH et al., 2005; EL-SHARNOUBY et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012; GREAVES et al., 2012), 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; ADVANI et al., 2010; HAMPRAS et al., 2010; MAHJOUBI; AKBARI, 2012; SERTEL et al., 2012). Autores creditam isso ao fato de que todas as linhagens de células hematopoiéticas normais possuem expressão constitutiva dessa proteína, o que complica a avaliação da sua expressão nas células neoplásicas (DEELEY; WESTLAKE; COLE, 2006; HIROSE, 2009). Outro desafio na interpretação do valor prognóstico da ABCC1 é que, muitas vezes, as células leucêmicas expressam múltiplos transportadores de membrana capazes de conferir um fenótipo MDR ao paciente (DEELEY; WESTLAKE; COLE, 2006). Por exemplo, estudos demonstraram que a coexpressão de ABCB1 e ABCC1 em células leucêmicas tem um impacto negativo na resposta ao tratamento e na sobrevida dos pacientes (LEGRAND; ZITTOUN; MARIE, 1999; SONNEVELD; LIST, 2001). No entanto, essa resistência preditiva não é encontrada quando as proteínas são consideradas separadamente (LEGRAND; ZITTOUN; MARIE, 1999).

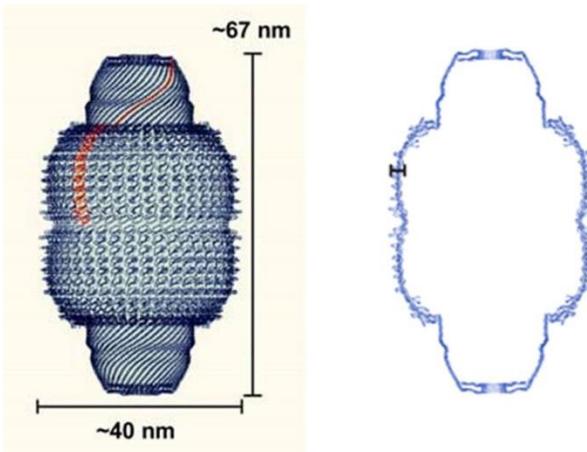
O insucesso em estabelecer o real papel da ABCC1 no fenótipo MDR nas LAs faz com que a análise da expressão dessa proteína ao diagnóstico ainda não seja indicada (STEINBACH; LEGRAND, 2007). Da mesma forma, os protocolos de tratamento não recomendam modificações no coquetel quimioterápico de pacientes que expressem ABCC1 (NCCN, 2012b; NCCN, 2012a). Assim como a ABCB1, a investigação de moduladores da ABCC1 tem sido extensiva e, apesar de alguns inibidores já terem sido descritos, como o óxido nítrico, o probenecide e o CBT-1<sup>®</sup>, os estudos limitam-se a testes *in vitro* (ROBEY

et al., 2008; KWEON; SONG; KIM, 2010; YE et al., 2011; CURTA et al., 2012; DA GRACA ROCHA et al., 2012).

### 2.2.3 Proteína Associada à Resistência Pulmonar (LRP)

A proteína LRP foi inicialmente identificada em células de linhagem de câncer de pulmão resistentes a antraciclinas que não apresentavam aumento de expressão de ABCB1 (SCHEPER et al., 1993). Posteriormente, a análise da sequência de aminoácidos da LRP revelou que esta era, na verdade, a principal proteína do grupo *Vault* (MVP) (SCHEFFER et al., 1995). As *Vaults* são organelas de 110 kDa encontradas em todos os eucariotos superiores. Essa organela é composta por quatro estruturas: a MVP propriamente dita, a adenosina difosfato ribose (ADP-ribose), a proteína associada à telomerase e o RNA pequeno não traduzido (Figura 8) (SWERTS et al., 2006; TANAKA et al., 2009). Diferentemente das proteínas ABCB1 e ABCC1, essa proteína não possui fragmentos transmembrana ou sítios de ligação de ATP, não sendo, portanto, considerada um membro da superfamília de transportadores ABC (IZQUIERDO et al., 1998; MOSSINK et al., 2003; SWERTS et al., 2006).

Figura 8 – Estrutura geral da *Vault*.



À esquerda está representada a vista lateral e, à direita, a vista transversal. Em castanho está destacada uma molécula de MVP, enquanto as demais estão coloridas em azul. Adaptado de: TANAKA et al., 2009.

O gene *lrp*, que codifica a proteína LRP, está localizado na região cromossomal 16p11.2, próximo ao gene *abcc1* (IZQUIERDO et al., 1998; SWERTS, 2006). As *Vaults* apresentam estrutura e composição complexas. Elas são altamente conservadas entre distintas espécies filogenéticas e estão presentes em distintos tipos celulares. Desta forma, a LRP é expressa em uma variedade de tecidos humanos normais e seus níveis de expressão são variáveis entre os diferentes tecidos e indivíduos (SWERTS et al., 2006). Há registros de expressão da proteína LRP no epitélio dos brônquios e trato digestivo, nos queratinócitos, no córtex da adrenal, em macrófagos, nos túbulos proximais dos rins, no urotélio, no ducto pancreático, em células germinativas, em fibroblastos, nas células de Purkinje e no endotélio de diferentes localizações (IZQUIERDO et al., 1996a; LU; SHERVINGTON, 2008; KUO, 2009).

Sugere-se que as *Vaults* desempenhem funções básicas em todas as células, principalmente nos mecanismos que envolvem a proteção do núcleo celular contra compostos tóxicos e no transporte intracelular de ribossomas e receptores esteroidais, incluindo os relativos à progesterona, ao estrogênio e aos glicocorticoides (LARSEN; ESCARGUEIL; SKLADANOWSKI, 2000; SWERTS et al., 2006). Avaliações imunohistoquímicas reforçaram a correlação entre a expressão de LRP e a resistência a fármacos em culturas celulares, a agressividade de tumores e o mau prognóstico da terapia anticâncer (IZQUIERDO et al., 1996b). No entanto, o mecanismo molecular envolvido na MDR mediada por LRP ainda não foi completamente determinado, mas, devido a sua similaridade estrutural e encaixe com os poros nucleares, sugere-se que a proteína atue no transporte de moléculas do núcleo para o citoplasma. Além do transporte de substâncias tóxicas, acredita-se que o complexo protéico das *Vaults* sequestre as moléculas em vesículas, para posteriormente levá-las para fora da célula por exocitose (IZQUIERDO et al., 1996a; MOSSINK et al., 2003; KOLLI et al., 2004; KOZLOV et al., 2006; SWERTS et al., 2006). Essa hipótese do seqüestro dos fármacos vem sendo esclarecida por investigações envolvendo mecanismos de sinalização celular e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) (KOLLI et al., 2004; KOZLOV et al., 2006).

Além do papel no efluxo de fármacos, foi proposto que as *Vaults* atuem como proteínas estruturadas nas vias de sinalização do fator de crescimento epidérmico (EGF). As *Vaults* participam de múltiplas interações proteína-proteína, que resultam no aumento da eficiência dos mecanismos de sinalização intracelular. Dessa forma, esse modelo sugere que o papel desempenhado pela LRP envolva o estímulo das vias

de ativação de moléculas associadas a mecanismos de proliferação celular (KOLLI et al., 2004; KOZLOV et al., 2006).

Por fim, o papel da expressão da LRP em células de LAs ainda é controverso, mas acredita-se que esta confira resistência intrínseca a vários agentes quimioterápicos, como a doxorrubicina, a vincristina, a mitoxantrona, o etoposídeo e os compostos de platina, e que esteja relacionada a menor sobrevida dos pacientes (SCHEPER et al., 1993; SCHEFFER et al., 1995; VALERA et al., 2004; HUH et al., 2006). No entanto, outros trabalhos afirmam que a expressão de LRP ao diagnóstico não confere resistência ao tratamento e tem pouco ou nenhum impacto negativo na resposta clínica do paciente (DEN BOER et al., 1998; KAKIHARA et al., 1999; SIVA et al., 2001; SONNEVELD; LIST, 2001; VAN ZON et al., 2004). Essas contradições sugerem a necessidade de novas investigações acerca da relação entre LRP e MDR (SWERTS et al., 2006).

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 CASUÍSTICA

Para o estudo, foram coletadas amostras consecutivas de SP ou MO com EDTA de pacientes de ambos os gêneros, com idade superior a 15 anos, com suspeita de LA e que tivessem sido atendidos pelo Serviço de Oncohematologia HU-UFSC, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2012. Antes da coleta das amostras, foi recolhida a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos da UFSC (Anexos A e B).

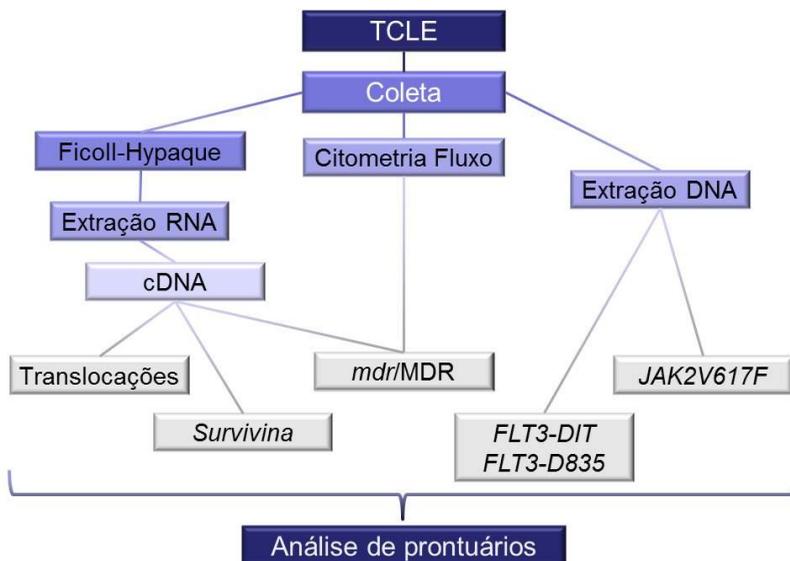
No total, foram coletadas amostras consecutivas de 92 pacientes com suspeita de LA. No entanto, foram incluídos no estudo apenas pacientes com diagnóstico final de LA, sem histórico de tratamento prévio de LA e que tivessem o prontuário à disposição para consulta. Dessa forma, foram excluídas do estudo nove pacientes que não tiveram diagnóstico de LA, três pacientes em recidiva de LA e cinco pacientes que não tiveram seus prontuários pesquisados, pois os mesmos não estavam disponíveis. Diante disso, foram incluídas no estudo 75 amostras pacientes com diagnóstico de LA, sendo destas 37 de SP e 38 de MO (Apêndice A). O diagnóstico de LA foi baseado na avaliação morfológica, imunofenotípica, citogenética e molecular das células leucêmicas. A subclassificação foi realizada de acordo com os critérios de Classificação da Organização Mundial da Saúde para Tumores Hematopoiéticos e de Tecidos Linfoides (SWERDLow et al., 2008).

Para verificar o papel do perfil *mdr*/MDR como ferramenta de detecção da doença residual mínima, foram coletas de amostras de MO dos pacientes incluídos no presente estudo após o término do primeiro ciclo de quimioterapia de indução (Anexos C e D). Ao todo, foi possível avaliar os níveis de expressão dos genes e proteínas MDR em 32 amostras de MO (Apêndice B).

Após a coleta, as amostras foram divididas em três partes (Figura 9). Uma parte foi utilizada para a extração de RNA, para a síntese do DNA complementar (cDNA) e para os ensaios de RT-PCR semiquantitativa. Nos casos em que havia indicação no momento do diagnóstico de um subtipo específico de LA com alterações citogenéticas, o cDNA sintetizado nessa etapa também foi utilizado para realizar a pesquisa das seguintes translocações: t(8;21)(q22;q22), t(9;22)(q34;q11), t(15;17)(q22;q21) e inv(16)(p13;q22). A segunda parte da amostra foi utilizada para realizar os ensaios de expressão de proteína

por citometria de fluxo e a terceira parte para a extração de DNA e a realização de ensaios para identificar a presença das mutações no gene *FLT3* e no gene *JAK2*.

Figura 9 – Fluxograma do processamento das amostras de SP ou MO.



Após a coleta, uma parte da amostra foi utilizada para a extração de RNA, a síntese do DNA complementar (cDNA), os ensaios de RT-PCR semiquantitativa e, quando havia indicação, a pesquisa das translocações  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $t(9;22)(q34;q11)$ ,  $t(15;17)(q22;q21)$  e  $inv(16)(p13;q22)$ . Uma segunda parte da amostra foi utilizada para os ensaios de citometria de fluxo e outra parte para a extração de DNA e a realização da pesquisa da presença das mutações no gene *FLT3* e no gene *JAK2*. TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido.

Além dos ensaios de biologia molecular e citometria de fluxo, foi realizada uma pesquisa em prontuários para obtenção dos dados clínicos e demais dados laboratoriais dos pacientes. Os seguintes dados foram coletados nos prontuários: idade, leucometria e níveis de LDH ao diagnóstico, gênero, imunofenótipo, cariótipo, diagnóstico final, ocorrência de óbitos e presença ou ausência de DRM após a terapia de indução (Apêndice A). Considerou-se ausência de DRM a ocorrência de remissão hematológica completa, ou seja, presença de 5% ou menos de

blastos na MO, reestabelecimento da hematopoiese normal (retorno aos valores normais de hemoglobina, de leucometria, de contagem diferencial de leucócitos e de plaquetometria) e ausência de doença extramedular, após a terapia de indução.

### 3.2 REAGENTES

Todos os reagentes para a cultura de células, para os ensaios de biologia molecular e para a extração de DNA foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). O *kit* de extração de RNA foi adquirido da QIAGEN (Austin, Texas, USA) e o Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/m<sup>3</sup>) da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os anticorpos monoclonais anti-CD34 e anti-CD45 foram adquiridos da Becton Dickinson (San Jose, CA, USA); o anti-ABCB1 e o anti-ABCC1, da Becton Dickinson Pharmingen (San Jose, CA, USA); o anti-LRP, da Millipore (Molsheim, France); e o Alexa Fluor 488, da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). O *kit* de fixação e permeabilização foi adquirido da Caltag (Viena, Austria).

### 3.3 CONTROLES DOS ENSAIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Linhagens de células humanas de LA foram cultivadas e utilizadas como controles positivos para os ensaios de RT-PCR. Como controle positivo de expressão de *abcb1*/ABCB1 foi utilizada a linhagem de LMA de origem humana K562-Lucena (RUMJANEK et al., 2000). A linhagem de LLA de origem humana Jurkat foi utilizada como controle positivo de expressão de *abcc1*/ABCC1 e *lrp*/LRP (HAMMOND et al., 2007). Como controle de transcrição de *survivina* e da presença da t(9;22)(q34;q11) foi utilizada a linhagem de LMA de origem humana K562 (VAN DONGEN et al., 1999; LIU et al., 2005). Já para as translocações t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21) e inv(16)(p13;q22), foi utilizada como controle positivo a linhagem de LMA de origem humana Kasumi1, NB4 e ME-1, respectivamente (VAN DONGEN et al., 1999).

As células foram mantidas em garrafas apropriadas para cultura celular contendo meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) ou RPMI1640 (Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* 1640) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 10 mM de tampão HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-etanosulfônico) em pH 7.4. As células foram mantidas em estufa com atmosfera úmida a 37

°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Para a realização dos experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%) e foram utilizadas apenas amostras com viabilidade superior a 80%.

Nas reações de PCR para a detecção das mutações no gene *FLT3* e *JAK2*, foram utilizados como controle positivo amostras de pacientes previamente identificados como portadores dessas mutações.

### 3.4 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total foi extraído das células mononucleares dos pacientes com diagnóstico de LA utilizando-se o *QIAamp RNA Blood Mini Kit* conforme instruções do fabricante.

Sucintamente, as células mononucleares foram obtidas por diferença de gradiente de densidade a partir de SP ou MO. Para tanto, as amostras foram diluídas em tampão fosfato (PBS) em uma proporção de 2:1 (1 mL de amostra para 0,5 mL de PBS). Após a diluição, a amostra foi colocada sobre 4 mL de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/m<sup>3</sup>) e centrifugada a 300 g por 30 minutos. A interfase com as células mononucleadas foi transferida para um tubo cônico, suspendida em 10 mL de tampão PBS e centrifugada a 200 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente lavadas com PBS. Ao fim das lavagens, as células foram suspendidas em 3 mL de tampão de lise de eritrócitos, fornecido pelo *kit*, e incubadas em gelo por 15 minutos. Após incubação, as células foram submetidas à centrifugação de 400 g por 10 minutos a 4 °C. Os leucócitos mononucleares foram lisados utilizando-se 600 µL de tampão de lise, fornecido pelo *kit*, e β-mercaptoetanol 0,1%. O lisado de leucócitos foi transferido para a coluna QIAshredder e centrifugado a 10.000 g por 2 minutos. A coluna foi descartada e ao filtrado foram adicionados 600 µL de etanol 70%. Todo o lisado foi transferido para uma coluna QIAamp e submetido a uma nova centrifugação de 10.000 g por 15 segundos. A coluna QIAamp foi lavada duas vezes com tampão de lavagem, fornecido pelo *kit*. Após a lavagem, foram adicionados à coluna 50 µL de água livre de RNases (fornecida pelo *kit*) e esta foi submetida a uma última centrifugação a 10.000 g por 1 minuto. O filtrado contendo o RNA total foi armazenado a -80 °C para ser posteriormente utilizado para a síntese de cDNA.

### 3.5 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR

A quantificação do RNA foi realizada por fluorimetria utilizando-se o *Qubit™ Quantitation Platform* (Invitrogen) e a sua qualidade foi avaliada pela visualização das bandas de RNA ribossomal (RNAr) em eletroforese em gel de agarose 2%. Foram consideradas amostras de boa qualidade aquelas que não apresentavam rastro abaixo das bandas de RNAr e cuja a banda referente ao RNAr 28S apresentava o dobro da intensidade da banda do rRNA 18S.

Para a síntese do cDNA, de 1 µg a 5 µg de RNA total foram adicionados em microtubos de 0,2 mL. O possível DNA contaminante nas amostras foi eliminado por digestão com DNase. Para tanto, adicionou-se ao RNA total 1 µL de DNase (1 U/µL), 1 µL de tampão de reação e água tratada com dietil pirocarbonato (água-DEPC) até o volume para 10 µL. Após digestão de 15 minutos a temperatura ambiente, a DNase foi inativada por 1 µL de EDTA (25 mM) e incubação de 10 minutos a 65 °C.

Após a inativação da DNase, as amostras foram submetidas a uma incubação de 5 minutos a 70 °C, seguida de uma incubação em gelo por 5 minutos. Após a incubação em gelo, a cada tubo de amostra foram adicionados 15 µL de solução *mix* contendo: 5 µL de tampão 5x *first strand* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 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 RNase (40 U/µL), 0,5 µL de transcriptase reversa (200 U/µL) e água-DPEC q.s.p. para 15 µL. As amostras foram então levadas ao termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf) e submetidas à seguinte programação: 25 °C por 5 minutos, 37 °C por 60 minutos e 90 °C por 5 minutos. Ao fim da programação, as amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos. As amostras de cDNAs foram dosados por fluorimetria utilizando-se o *Qubit™ Quantitation Platform* (Invitrogen) e armazenados em freezer a menos 20 °C para serem posteriormente utilizados nos ensaios de detecção da transcrição dos genes de resistência e na pesquisa da presença de translocações cromossômicas.

### 3.6 DETECÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE *abcb1*, *abcc1*, *lrp* E *survivina* POR TRANSCRIÇÃO REVERSA - REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE SEMIQUANTITATIVA (RT-PCR SEMIQUANTITATIVA)

A avaliação de transcrição gênica das proteínas de resistência foi realizada utilizando-se a técnica de RT-PCR semiquantitativa.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* (Quadro 5) utilizados para avaliar a transcrição de *abcb1*, *abcc1*, *lrp* e *survivina* foram previamente descritos por Valera et al. (2004) e por Liu et al. (2005) e a transcrição de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*) foi utilizada para a normalização das bandas.

Quadro 5 – Sequência dos *primers* para a detecção de *abcb1*, *abcc1*, *lrp* e *survivina*.

Gene		Sequência	Tamanho do produto
<i>abcb1</i>	<i>sense</i>	5' -CCCATCATTGCAATAGCAGG-3'	157 pb
	<i>antisense</i>	5' -GTTCAAACCTTCTGCTCCTGAG-3'	
<i>abcc1</i>	<i>sense</i>	5' -TGGGACTGGAATGTCACG-3'	260 pb
	<i>antisense</i>	5' -AGGAATATGCCCCGACTTC-3'	
<i>lrp</i>	<i>sense</i>	5' -GTCTTCGGGCCTGAGCTGGTGTGCG-3'	240 pb
	<i>antisense</i>	5' -CTTGGCCGTCTCTGGGGGTCTT-3'	
<i>survivina</i>	<i>sense</i>	5' -CTTTCTCAAGGACCACCGCATC-3'	393 pb
	<i>antisense</i>	5' -CAATCCATGGCAGCCAGCTGC-3'	
<i>gapdh</i>	<i>sense</i>	5' -CGTCTTCACCACCATGGAGAA-3'	330 pb
	<i>antisense</i>	5' -GAGGCAGGGATGATGTTCTG-3'	

pb – Pares de base. Adaptado de: VALERA et al., 2004; LIU et al., 2005.

Todas as reações foram preparadas com um volume final de 50 µL. As reações de PCR com os *primers* para *abcb1* e *lrp*, foram realizadas nas seguintes condições: 1 µg de cDNA, 5 µL de tampão 10X concentrado para Taq DNA polimerase (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,4 µL de dNTP *mix* (100 mM de cada), 1 µL de *primer sense* e *antisense* (10 µM 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*, *survivina* e *gapdh* foram iguais as dos outros *primers* com exceção da quantidade de MgCl<sub>2</sub>, que foi de 1,5 µL (50 mM).

As amostras foram inicialmente desnaturadas a 94 °C por 5 minutos e, depois, submetidas às condições de reação ideal para cada

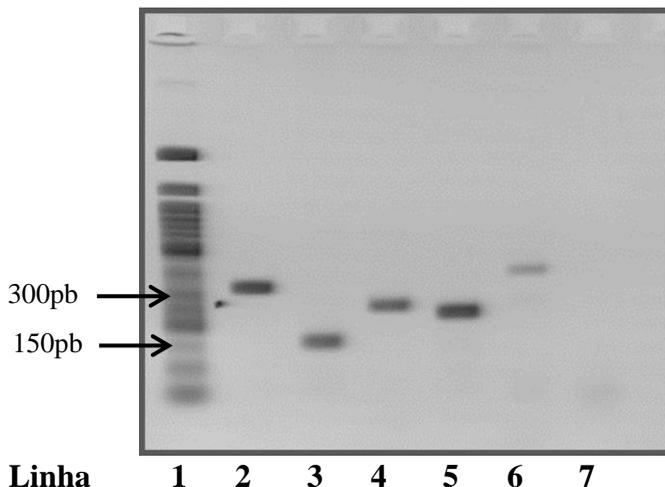
par de *primers*, conforme Quadro 6. Ao fim dos ciclos da PCR, foi realizada uma extensão final 72 °C por 10 minutos. As condições ideais de reação e o número de ciclos utilizados foram estabelecidos em ensaios prévios realizados no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) de forma que a PCR terminasse na fase exponencial da amplificação.

Quadro 6 – Condições de reação para a detecção de *abcb1*, *abcc1*, *lrp* e *survivina*.

<b>Primer</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Pareamento</b>	<b>Extensão</b>	<b>Ciclos</b>
<i>abcb1</i>	94°C/1 min.	53°C/1 min.	72°C/1 min.	25
<i>abcc1</i>	94°C/1 min.	60°C/1 min.	72°C/1 min.	30
<i>lrp</i>	94°C/1 min.	64°C/1 min.	72°C/1 min.	30
<i>survivina</i>	94°C/1 min.	61°C/1 min.	72°C/1 min.	40
<i>gapdh</i>	94°C/30 seg.	60°C/30 seg.	72°C/30 seg.	25

Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% a 100 volts por 30 minutos e corados com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas em transiluminador (HOEFER-MacroVue UV-20) sob luz UV de 320 nm (Figura 10) e fotografadas com o sistema de foto-documentação de géis (DOC-PRINT<sup>®</sup>, Biosystems). O tamanho dos fragmentos foi estimado, por comparação, com o marcador de tamanho molecular 50 pb.

Figura 10 – Gel de agarose 2% representativo dos controles positivos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de *abcb1* (K562-LUCENA), *abcc1*(Jurkat), *lrp* (Jurkat) e *survivina* (K562).



Linha 1 – Marcador de tamanho molecular 50 pb; Linha 2 – Produto da PCR com os *primers* para *gapdh* (330 pb); Linha 3 – Produto da PCR com os *primers* para *abcb1* (157 pb); Linha 4 – Produto da PCR com os *primers* para *abcc1* (260 pb); Linha 5 – Produto da PCR com os *primers* para *lrp* (240 pb); Linha 6 – Produto da PCR com os *primers* para *survivina* (393 pb); Linha 7 – Controle negativo com água.

A intensidade média de cada banda foi avaliada pelo programa de análise digital (NIH *ImageJ1.40 software*, *National Institute of Health website*). A intensidade das bandas dos genes *abcb1*, *abcc1*, *lrp* e *survivina* foi dividida pela intensidade do gene normalizador *gapdh*. Os resultados foram relatados na forma de transcrição relativa.

### 3.7 PESQUISA DAS TRANSLOCAÇÕES t(8;21)(q22;q22), t(9;22)(q34;q11), t(15;17)(q22;q21) E inv(16)(p13;q22)

A pesquisa das translocações cromossômicas foi realizada utilizando-se a técnica de RT-PCR seguida por uma *nested* PCR.

Os *primers* (Quadro 7) e as condições da PCR utilizadas para a pesquisa das translocações cromossômicas foram as descritas pelo programa BIOMED-1 (VAN DONGEN et al., 1999).

Quadro 7 – Sequência dos *primers* para a pesquisa das translocações cromossômicas.

Translocação	Primer	Sequência
t(8;21)(q22;q22)	AML1-A	5' -CTACCGCAGCCATGAAGAACC-3'
	ETO-B	5' -AGAGGAAGGCCCATGTGCTGAA-3'
	AML1-C	5' -ATGACCTCAGGTTTGTCCGGTCG-3'
	ETO-D	5' -TGAAGTGGTTCTTGGAGCTCCT-3'
	AML1-E5'	5' -TGGCTGGCAATGATGAAAATACT-3'
t(9;22)(q34;q11) p190	BCR-e1-A	5' -GACTGCAGCTCCAATGAGAAC-3'
	ABL-a3-B	5' -GTTTGGGCTTCACACCATTCC-3'
	BCR-e1-C	5' -CAGAAGTGCACAGCTCCTTC-3'
	ABL-a3-D	5' -TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA-3'
	ABL-a3-E3'	5' -TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT-3'
t(9;22)(q34;q11) p210	BCR-b1-A	5' -GAAGTGTTCAGAAGCTTCTCC-3'
	ABL-a3-B	5' -GTTTGGGCTTCACACCATTCC-3'
	BCR-b2-C	5' -CAGATGCTGACCAACTCGTGT-3'
	ABL-a3-D	5' -TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA-3'
	ABL-a3-E3'	5' -TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT-3'
t(15;17)(q22;q21)	PML-A1	5' -CAGTGTACGCCTTCTCCATCA-3'
	PML-A2	5' -CTGCTGGAGGCTGTGGAC-3'
	RARA-B	5' -GCTTGTAGATGCGGGGTAGA-3'
	PML-C1	5' -TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG-3'
	PML-C2	5' -AGCGCGACTACGAGGAGAT-3'
	RARA-D	5' -CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT-3'
	RARA-E3'	5' -GCCCACTTCAAAGCACTTCT-3'
inv(16)(p13;q22)	CBFB-A	5' -GCAGGCAAGGTATATTTGAAGG-3'
	MYH11-B1	5' -TGAAGCAACTCCTGGGTGTC-3'
	MYH11-B2	5' -TCCTCTTCTCCTCATTCTGCTC-3'
	CBFB-C	5' -GGGCTGTCTGGAGTTTGATG-3'
	MYH11-D1	5' -TCCCTGTGACGCTCTCAACT-3'
	MYH11-D2	5' -CTTGAGCGCCTGCATGTT-3'
	CBFB-E5'	5' -CAGGGAGAACAGCGACAAACA-3'

Adaptado de: VAN DONGEN et al., 1999.

Para as primeiras PCRs de todas as translocações cromossômicas, foram utilizados os *primers* codificados como A (*sense*) e B (*antisense*). Para evitar a liberação de resultados falso positivos, paralelamente à primeira PCR, foi realizada uma PCR confirmatória com os *primers* C (*sense*) e E3' (*antisense*), com exceção da t(8;21)(q22;q22) e da inv(16)(p13;q22) em que os *primers* confirmatórios utilizados foram os codificados como E5' (*sense*) e D (*antisense*). As *nested* PCRs foram realizadas utilizando-se os *primers* codificados com C (*sense*) e D (*antisense*).

As reações foram preparadas com um volume final de 50  $\mu$ L. A solução mãe da PCR foi preparada da seguinte forma: 2  $\mu$ L de cDNA, 5  $\mu$ L de tampão 10X concentrado para Taq DNA polimerase (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl), 1,5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (50 Mm), 0,4  $\mu$ L de dNTP *mix* (100 mM de cada), 1  $\mu$ L de *primer sense* e *antisense* (10  $\mu$ M cada), 0,4  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L) e água ultra-pura q.s.p para 50  $\mu$ L. As reações de *nested* PCR foram realizadas sob as mesmas condições, exceto que, ao invés de DNA genômico, foi utilizado como molde 1  $\mu$ L do produto de amplificação dos *primers* A e B da primeira PCR.

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, pareamento a 65 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. O produto das PCRs foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% a 100 volts por 30 minutos e corado com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas em transiluminador sob luz UV de 320 nm. O tamanho dos fragmentos foi estimado, por comparação, com o marcador de tamanho molecular 50 pb (Quadro 8).

Quadro 8 – Tamanho esperado dos produtos de PCR para a pesquisa das translocações cromossômicas, segundo o par de *primers* utilizado.

<b>t(8;21)(q22;q22)</b>								
Par de <i>primers</i> e Tamanho do Produto de PCR (pb)								
	A↔B	C↔D	A↔B + C↔D	E5'↔D				
	395	260	260	338				
<b>t(9;22)(q34;q11) p190</b>								
Ponto de quebra	Par de <i>primers</i> e Tamanho do Produto de PCR (pb)							
	A↔B	C↔D	A↔B + C↔D	C↔E3'				
p190e1-a2	521	381	381	445				
p190e1-a3 <sup>a</sup>	347	207	207	271				
<b>t(9;22)(q34;q11) p210</b>								
Ponto de quebra	Par de <i>primers</i> e Tamanho do Produto de PCR (pb)							
	A↔B	C↔D	A↔B + C↔D	C↔E3'				
p210b3-a2	417	360	360	424				
p210b2-a2	342	285	285	349				
p210b3-a3	243	186	186	250				
p210b2-a3	168	111	111	175				
<b>t(15;17)(q22;q21)</b>								
Ponto de quebra	Par de <i>primers</i> e Tamanho do Produto de PCR (pb)							
	A1↔B	A2↔B	C1↔D	C2↔D	A1↔B + C1↔D	A2↔B + C2↔D	C1↔E3'	C2↔E3'
bcr1	381	NA	214	NA	214	NA	470	NA
bcr2	345*	NA	178*	NA	178*	NA	434*	NA
bcr3	NA	376	NA	289	NA	289	NA	545
<b>inv(16)(p13;q22)</b>								
Ponto de quebra	Par de <i>primers</i> e Tamanho do Produto de PCR (pb)							
	A↔B1	A↔B2	C↔D1	C↔D2	A↔B1 + C↔D1	A↔B2 + C↔D2	E5'↔D1	E5'↔D2
Tipo A	NA	418	NA	271	NA	271	NA	417
Tipo B	NA	630	NA	483	NA	483	NA	679
Tipo C	NA	811	NA	664	NA	664	NA	810
Tipo D	338	NA	155	NA	155	NA	301	NA
Tipo E	545	NA	362	NA	362	NA	508	NA
Tipo F	NA	322	NA	175	NA	175	NA	321
Tipo G	242	NA	59	NA	59	NA	205	NA
Tipo H	344	NA	161	NA	161	NA	307	NA
Tipo I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tipo J	NA	1033	NA	886	NA	886	NA	1032

pb – Pares de base; NA – não aplicável. \*O tamanho do produto é variável devido a variabilidade dos pontos de quebra do éxon 6 no gene *PML*. Adaptado de: VAN DONGEN et al., 1999.

### 3.8 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se uma solução de isotiocianato de guanidina 5 M (LIPPKE et al., 1987). Para tanto, 200  $\mu$ L de SP ou MO foram transferidos para um microtubo contendo 1 mL de solução de isotiocianato de guanidina 5 M e submetido à homogeneização com vórtex. A amostra foi então mantida em agitação contínua a temperatura ambiente por 12 horas *over night*. Após incubação, foram adicionados ao microtubo 50  $\mu$ L de solução de dióxido de sílica acidificada e a amostra foi homogeneizada por inversão durante 5 minutos. Após, a amostra foi centrifugada a 1.000 g por 1 minuto à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O sedimento de sílica contendo DNA foi então lavado duas vezes com 500  $\mu$ L de solução de lavagem de isotiocianato de guanidina 5 M, duas vezes com 500  $\mu$ L de etanol 70% e uma vez com 500  $\mu$ L de acetona ultra pura. Entre cada lavagem, o sobrenadante foi retirado após a amostra ser centrifugada a 1.000 g por 1 minuto à temperatura ambiente. Ao fim da última lavagem, os resíduos de acetona foram removidos por evaporação em termobloco (Thermomixer compact, Eppendorf) a 56 °C por 10 minutos. A amostra foi rehidratada com 25  $\mu$ L de Tampão Tris-EDTA (10 mM Tris.HCl, pH 6,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) e novamente incubada em termobloco a 56 °C por 10 minutos sob agitação. Após, a amostra foi centrifugada a 2.600 g por 5 minutos e o sobrenadante contendo o DNA genômico foi transferido para um novo microtubo com capacidade para 0,6 mL e congelado a menos 20 °C para posterior utilização nos ensaios de pesquisa das mutações nos genes *FLT3* e *JAK2*.

### 3.9 PESQUISA DE MUTAÇÕES NO GENE *FLT3*

#### 3.9.1 Detecção da Mutação no Gene *FLT3* do Tipo DIT

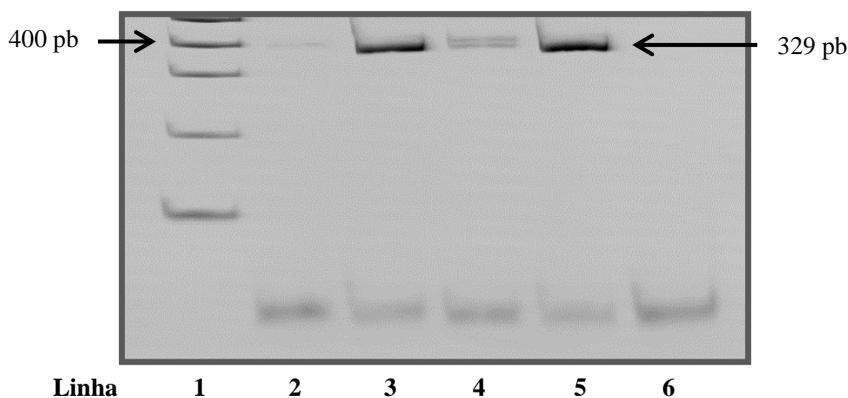
Para a detecção do *FLT3-DIT* foi realizada a amplificação dos éxons 14 e 15 do gene *FLT3* (MESHINCHI et al., 2001).

As reações foram preparadas com um volume final de 50  $\mu$ L. A solução *mix* da PCR foi preparada da seguinte forma: 100 ng a 1  $\mu$ g de DNA genômico, 5  $\mu$ L de tampão 10X concentrado para Taq DNA polimerase (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 1,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 Mm), 0,4  $\mu$ L de dNTP *mix* (100 mM de cada), 2  $\mu$ L de *primer sense* (5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3') e *antisense* (5'-CTTTCAGCATTGACGGCAACC-3') (10  $\mu$ M cada), 0,25  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L) e água ultra-pura q.s.p para 50  $\mu$ L.

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, pareamento a 61 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final de 72 °C por 8 minutos. O produto das PCRs foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% a 80 volts por 90 minutos e corado com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas em transiluminador sob luz UV de 320 nm. O tamanho dos fragmentos foi estimado, por comparação, com o marcador de tamanho molecular 100 pb.

A detecção de apenas uma banda com 329 pb correspondeu ao gene selvagem e foi correlacionada com a ausência da mutação *FLT3-DIT*. A presença de uma segunda banda de tamanho maior (até 400 pb) ou a ausência da banda com 329 pb com a presença de uma ou duas bandas maiores foi relacionada como a presença da mutação *FLT3-DIT* na sua forma homozigota e heterozigota, respectivamente (Figura 11).

Figura 11 – Gel de poliacrilamida 12% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção da mutação *FLT3-DIT*.



Linha 1 – Marcador de tamanho molecular de 100 pb; Linha 2 – Amostra de paciente homozigoto com banda compatível com a mutação *FLT3-DIT*; Linha 3 – Amostra de paciente sem banda compatível com a mutação *FLT3-DIT*; Linha 4 – Controle positivo (Amostra de paciente heterozigoto conhecidamente positivo para a mutação *FLT3-DIT*); Linha 5 – Controle negativo com DNA (Amostra de paciente conhecidamente negativo para a mutação *FLT3-DIT*); Linha 6 – Controle negativo com água.

### 3.9.2 Detecção da Mutação no Gene *FLT3* do Tipo D835

Para a detecção da mutação do *FLT3-D835* foi realizada a amplificação do éxon 20 do gene *FLT3* seguida por uma digestão enzimática com EcoRV (LIANG et al., 2003).

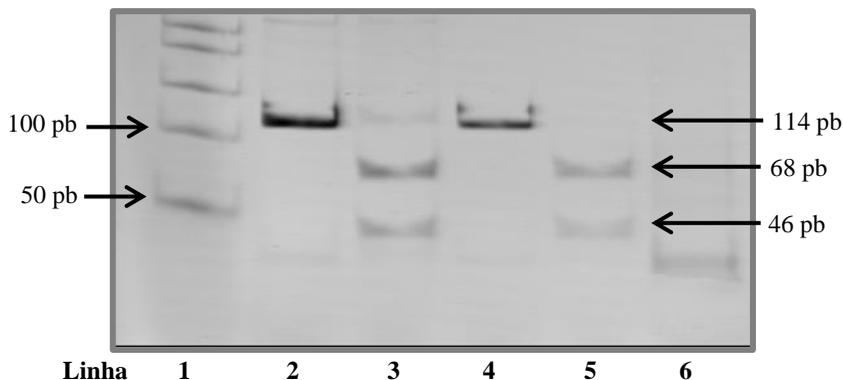
As reações foram preparadas com um volume final de 50 µL. A solução *mix* da PCR foi preparada da seguinte forma: 100 ng a 1 µg de DNA genômico, 5 µL de tampão 10X concentrado para Taq DNA polimerase (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 2,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,6 µL de dNTP *mix* (100 mM de cada), 2 µL de *primer sense* (5'-CCGCCAGGAACGTGCTTG-3') e *antisense* (5'-GCAGCTCACATTGCCCC-3') (10 µM cada), 0,25 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água ultra-pura q.s.p para 50 µL.

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, pareamento a 66 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final de 72 °C por 8 minutos. Antes da digestão enzimática, o sucesso da amplificação foi verificado realizando-se uma eletroforese em gel de agarose 2,5% a 100 V por 30 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas foram visualizadas em transiluminador sob luz UV de 320 nm. O tamanho dos fragmentos foi estimado, por comparação, com o marcador de tamanho molecular 50 pb. As amostras que apresentavam uma única banda com 114 pb foram submetidas à digestão com EcoRV.

A digestão enzimática foi preparada com um volume final de 15 µL e foi realizada na seguinte condição: 10 µL de produto de PCR, 1,5 µL de tampão H 10X concentrado (500 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 1 M NaCl), 0,5 µL de EcoRV (10 U/µL) e água ultra-pura q.s.p para 15 µL. A reação foi incubada por 1 hora a 37 °C e os produtos da digestão foram observados em gel de poliácridamida 20% a 70 V por 90 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas foram visualizadas em transiluminador sob luz UV de 320 nm. O tamanho dos fragmentos foi estimado, por comparação, com o marcador de tamanho molecular 50 pb.

As amostras sem a mutação *FLT3-D835* foram totalmente digeridas e apresentaram duas bandas (68 pb/46 pb). As amostras homozigotas ou heterozigotas para a mutação *FLT3-D835* não foram digeridas ou foram parcialmente digeridas, respectivamente. Dessa forma, as amostras homozigotas apresentaram uma única banda não digerida (114 pb) e nas heterozigotas observou-se três bandas resultantes da digestão parcial (114 pb/68 pb/46 pb) (Figura 12).

Figura 12 – Gel de poliacrilamida 20% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção da mutação *FLT3-D835*.



Linha 1 – Marcador de tamanho molecular de 50 pb; Linha 2 – Amostra de paciente com bandas compatíveis com a mutação *FLT3-D835* antes da digestão com EcoRV; Linha 3 – Amostra de paciente heterozigoto com bandas compatíveis com a mutação *FLT3-D835* após digestão com EcoRV; Linha 4 – Amostra de paciente sem bandas compatíveis com a mutação *FLT3-D835* antes da digestão com EcoRV; Linha 5 – Amostra de paciente sem bandas compatíveis com a mutação *FLT3-D835* após digestão com EcoRV; Linha 6 – Controle negativo com água.

### 3.10 DETECÇÃO DA MUTAÇÃO *JAK2V617F*

A presença da mutação *JAK2V617F* foi investigada por PCR-alelo específico, utilizando-se *primers* específicos para o gene *JAK2* “selvagem” e mutado (CAMPBELL et al., 2006).

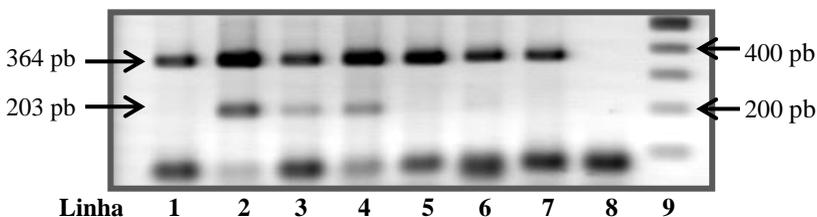
As reações foram preparadas com um volume final de 50  $\mu$ L. A solução *mix* da PCR foi preparada da seguinte forma: 100 ng a 1  $\mu$ g de DNA genômico, 5  $\mu$ L de tampão 10X concentrado para Taq DNA polimerase (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 4,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 Mm), 0,6  $\mu$ L de dNTP *mix* (100 mM de cada), 1,5  $\mu$ L de *primer sense/JAK2V617F* (5'-AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATAT T-3' - 10 mM), 3,0  $\mu$ L de *primer sense/JAK2* (5'-ATCTATAGTCATG CTGAAAGTAGGAGAAAG-3' - 10 mM), 5,0  $\mu$ L de *primer antisense* (5'-CTGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTTTCA-3' - 10 mM), 0,6  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ L) e água ultra-pura q.s.p para 50  $\mu$ L.

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, pareamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30

segundos, com uma extensão final de 72 °C por 6 minutos. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,5% a 80 volts por 40 minutos e corado com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas em transiluminador sob luz UV de 320 nm e o tamanho dos fragmentos foi estimado, por comparação, com o marcador de tamanho molecular 100 pb.

As amostras que apresentaram uma única banda de 364 pb foram consideradas negativas para a mutação *JAK2V617F*, enquanto a presença de uma segunda banda de 203 pb foi relacionada a um resultado positivo para a presença da mutação (Figura 13).

Figura 13 – Gel de agarose 2,5% representativo dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção da mutação *JAK2V617F*.



Linha 1 – Controle negativo com DNA (Amostra de paciente conhecidamente negativo para a mutação *JAK2V617F*); Linha 2 – Controle positivo (Amostra de paciente conhecidamente positivo para a mutação *JAK2V617F*); Linha 3 – Amostra positiva para a mutação *JAK2V617F*; Linha 4 – Amostra positiva para a mutação *JAK2V617F*; Linha 5 – Amostra negativa para a mutação *JAK2V617F*; Linha 6 – Amostra negativa para a mutação *JAK2V617F*; Linha 7 – Amostra negativa para a mutação *JAK2V617F*; Linha 8 – Controle negativo com água; Linha 9 – Marcador de tamanho molecular de 100 pb.

### 3.11 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA

A expressão da ABCB1, da ABCC1 e da LRP foi analisada por citometria de fluxo, utilizando-se as seguintes combinações de anticorpos monoclonais (FITC/PE/PerCP/APC): --/--/CD45/CD34; ABCB1/--/CD45/CD34; ABCC1/--/CD45/CD34; IgG-camundongo/--/CD45/CD34; e LRP/--/CD45/CD34. Todas as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA) utilizando os lasers azul (488 nm, air-cooled, 20 mW solid state) e vermelho (633 nm, 17 mW HeNe), e o

*software* FACSDiva versão 6.1.2 (Becton Dickinson, USA). Em cada tubo foram analisados 10.000 eventos.

Antes da marcação com os anticorpos monoclonais, as amostras de MO foram previamente lavadas com PBS para a retirada do excesso de gordura. Tanto as amostras de SP, quanto as de MO, foram diluídas com PBS e ajustadas para que ficassem em uma concentração final de 10.000 células/ $\mu$ L.

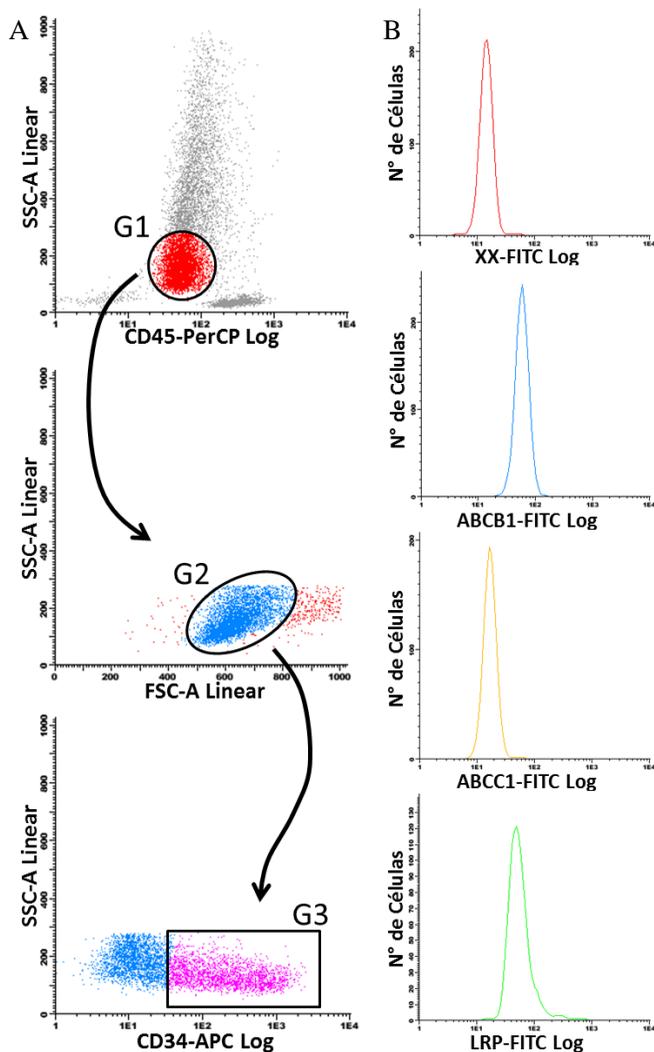
Para a detecção de ABCB1 e ABCC1 foi utilizada a técnica de marcação direta. Em cada tubo, 100  $\mu$ L de amostra foram incubadas com 3  $\mu$ L e 5  $\mu$ L dos anticorpos monoclonais anti-CD34 (clone 8G12) e anti-CD45 (clone 2D1), respectivamente, por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram fixadas e permealizadas utilizando-se o FIX & PERM<sup>®</sup> *fixation and permeabilization kit*. Para tanto, foram adicionados 100  $\mu$ L do reagente de fixação em cada tubo e, após homogeneização em vórtex, as amostras foram incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. Logo após, foram adicionados 2 mL de PBS e as amostras foram centrifugadas a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento suspenso em 100  $\mu$ L do reagente de permeabilização B. Foram adicionados 10  $\mu$ L de anti-ABCB1 (clone 17F9) ou anti-ABCC1 (clone QCRL-3) e as amostras foram incubadas no escuro por 10 minutos. Após incubação, foram adicionados 2 mL de PBS em cada tubo, os quais foram submetidos a uma centrifugação de 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi suspenso em 500  $\mu$ L de PBS e analisado por citometria de fluxo. Paralelo ao processo de marcação das proteínas ABCB1 e ABCC1, foi realizada a marcação de um tubo controle de autofluorescência em FITC, em que foram adicionados apenas os anticorpos monoclonais anti-CD34 e anti-CD45.

A detecção de LRP foi realizada pela marcação indireta utilizando-se um anticorpo secundário conjugado ao Alexa Fluor 488. Para tanto, à amostra, foram adicionados 100  $\mu$ L do reagente de fixação “A”, e esta foi incubada no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. Após a fixação, foram adicionados 2 mL de PBS e os tubos foram centrifugados a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 15 minutos com 100  $\mu$ L do reagente de permeabilização “B” e 5  $\mu$ L de anti-LRP (clone LRP-56). Após a permeabilização, as amostras foram lavadas com 2 mL de PBS e centrifugadas a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100  $\mu$ L do anticorpo secundário anti-IgG-camundongo-Alexa Fluor 488 (1:500). Incubou-se

por 15 minutos ao abrigo da luz e o excesso de anticorpo foi retirado com 2 mL de PBS e uma centrifugação a 200 g por 5 minutos. Após a lavagem das células, essas foram suspensas em 100 µL de PBS e marcadas com 3 µL de anti-CD34 e 5 µL de anti-CD45. Após a marcação, as amostras foram mais uma vez lavadas com 2 mL de PBS e, após a centrifugação, elas foram suspensas em 400 µL de PBS e analisadas por citometria de fluxo. Como controle de marcação inespecífica do anticorpo secundário, foi realizada a marcação de um tubo contendo apenas o anticorpo secundário na ausência do anti-LRP.

Os dados adquiridos pelo citômetro de fluxo foram analisados utilizando-se o *software* Infinicyt versão 1.6.0 (Cytognos S.L., Salamanca, Espanha) e as células blásticas foram reconhecidas por meio das propriedades de *forward* e *side scatter* (FSC e SSC, respectivamente), bem como pelas suas características de expressão com o anti-CD34 e o anti-CD45 (Figura 14). Os dados foram descritos em intensidade de fluorescência relativa (IFR). Para tanto, a intensidade de fluorescência média (IFM) das células marcadas com anti-ABCB1 e anti-ABCC1 foi dividida pela IFM das células controle, marcadas apenas com anti-CD34 e anti-CD45. Para a detecção de LRP, a IFM das células marcadas com anti-LRP foi dividida pela IFM das células tratadas apenas com o anti-IgG mouse-Alexa Fluor 488.

Figura 14 – Dot-plots e histogramas representativos da análise da expressão das proteínas ABCB1, ABCC1 e LRP por citometria de fluxo.



Painel A – Estratégia de reconhecimento das células neoplásicas por meio das propriedades de *forward scatter*, *side scatter* e a expressão de CD34 e CD45. Painel B – Histograma demonstrando a intensidade de autofluorescência em FITC, de expressão de ABCB1, de ABCC1 e de expressão de LRP. XX – ausência de anticorpo monoclonal; G1 – Gate 1; G2 – Gate 2; G3 – Gate 3.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A confecção do banco de dados e a análise estatística foram realizadas com o auxílio dos *softwares* SPSS versão 17.0<sup>®</sup> e MedCalc<sup>®</sup> versão 12.3.0.0.

Os dados demográficos foram sumarizados como números absolutos e percentuais no caso de variáveis nominais; e mediana de valores máximo e mínimo no caso de variáveis numéricas.

A expressão de proteínas de resistência a múltiplos fármacos (ABCB1, ABCC1 e LRP) foram sumarizadas de forma numérica através de mediana e valores máximos e mínimos (limites).

A presença das mutações *FLT3-DIT*, *FLT3-D835* e *JAK2V617F*, bem como das translocações e a transcrição de *survivina* foram sumarizadas de forma dicotômica (presente ou ausente).

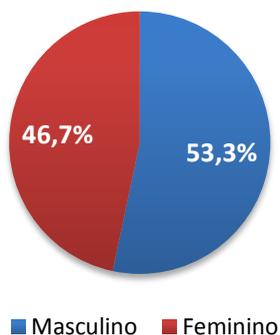
Para a avaliação da distribuição das amostras foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov. As variáveis numéricas independentes foram comparadas entre os grupos através do teste de Mann-Whitney U ou do teste de Kruskal-Wallis. A comparação de duas variáveis numéricas dependentes entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste de Wilcoxon. A correlação entre duas variáveis numéricas foi feita através da correlação de Pearson e a associação entre duas ou mais variáveis nominais foi verificada pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher. A curva de sobrevida foi construída pelo método de Kaplan-Meier. Foi considerado um nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

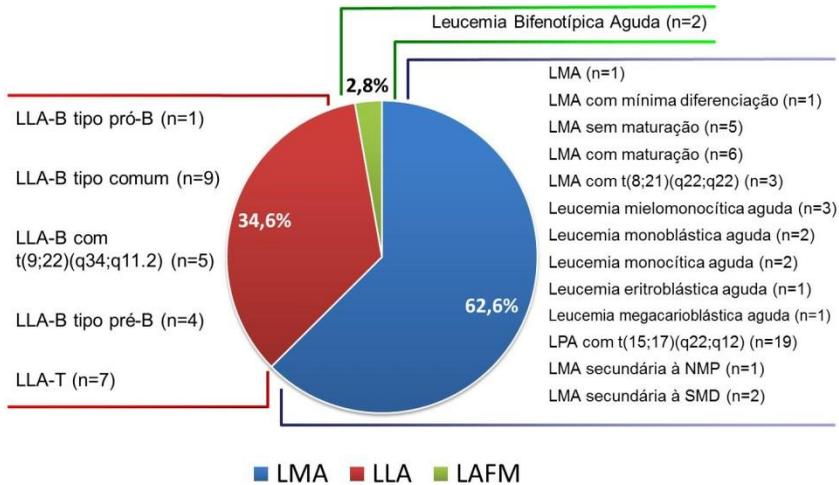
Neste estudo, foram avaliados 75 pacientes com diagnóstico de LA. Destes, 40 (53,3%) eram do gênero masculino e 35 (46,7%) do feminino (Figura 15) e a mediana de idade foi de 41 anos (15-87 anos; Tabela 1).

Figura 15 – Distribuição dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda segundo o gênero.



Em relação ao subtipo de LA, foram diagnosticados 47 (62,6%) casos de LMA, 26 (34,6%) de LLA e dois (2,8%) de LAFM (Figura 16). A distribuição dos subtipos de LA segundo os critérios da OMS foi a seguinte: LMA (um caso; 1,3%), LMA com mínima diferenciação (um caso; 1,3%), LMA sem maturação (cinco casos; 6,7%), LMA com maturação (seis casos; 8,0%), LMA com maturação com t(8;21)(q22;q22) (três casos; 4,0%), leucemia mielomonocítica aguda (três casos; 4,0%), leucemia monoblástica aguda (dois casos; 2,7%), leucemia monocítica aguda (dois casos; 2,7%), leucemia eritroblástica aguda (um caso; 1,3%), leucemia megacarioblástica aguda (um caso; 1,3%), leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12) (19 casos; 25,4%; LPA), LMA secundária à NMP (um caso; 1,3%), LMA secundária à SMD (dois casos; 2,7%), LLA-B tipo pró-B (um caso; 1,3%), LLA-B tipo comum (nove casos; 12,0%), LLA-B com t(9;22)(q34;q11.2) (cinco casos; 6,7%), LLA-B tipo pré-B (quatro casos; 5,3%), LLA-T (sete casos; 9,3%) e LBA (dois casos; 2,8%).

Figura 16 – Distribuição dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda segundo o subtipo de leucemia aguda.



LMA – Leucemia mieloide aguda; LLA – Leucemia linfóide aguda; LAFM – Leucemia aguda de fenótipo misto; LPA – Leucemia promielocítica aguda; NMP – Neoplasia mieloproliferativa; SMD – Síndrome mielodisplásica.

Como pode ser observado na Tabela 1, a qual apresenta as características clínicas e laboratoriais no momento do diagnóstico dos pacientes incluídos no estudo, os pacientes que não entraram em remissão foram aqueles que apresentaram mediana de idade significativamente superior (54 anos) aos que entraram em remissão (35 anos) ( $P < 0,001$ ). As medianas de leucometria, de percentual de blastos e de LDH ao diagnóstico foram semelhantes entre os dois grupos de pacientes. Além disso, também não houve associação entre o gênero e a resposta ao tratamento.

Tabela 1 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo da terapia de indução.

Parâmetros	DRM Negativa (n=56)		DRM Positiva (n=19)		Total (n=75)	
	N°	%	N°	%	N°	%
<b>Idade (anos)</b>						
Mediana	35		54*		41	
Limites	15-76		29-87		15-87	
<b>Leucometria (x10<sup>3</sup>/μL)</b>						
Mediana	3,9		10,7		5,7	
Limites	0,3-177,2		0,6-288,7		0,3-288,7	
<b>Blastos (%)</b>						
Mediana	58,4		51,8		55,4	
Limites	6,0-98,8		5,4-96,0		5,4-98,8	
<b>LDH (U/L)</b>						
Mediana	308,5		297,0		308,5	
Limites	0,0-3060,0		131,0-3197,0		0,0-3197,0	
<b>Subtipo de LA</b>						
LMA	18	32,1	10	52,6	28	37,3
LPA	17	30,4	2	10,5	19	25,3
LLA-B	14	25,0	5	26,3	19	25,3
LLA-T	6	10,7	1	5,3	7	9,3
LBA	1	1,8	1	5,3	2	2,8
<b>Gênero</b>						
Masculino	32	57,1	8	42,1	40	53,3
Feminino	24	42,9	11	57,9	35	46,7
<b>FLT3-DIT</b>						
Negativos	39	69,6	10	52,6	49	65,3
Positivos	2	3,6	1	5,3	3	4,0
Não realizado	15	26,8	8	42,1	23	30,7
<b>FLT3-D835</b>						
Negativos	34	60,7	11	57,9	45	60,0
Positivos	4	7,1	0	0,0	4	5,3
Não realizado	18	32,2	8	42,1	26	34,7
<b>Survivina</b>						
Negativos	44	78,6	14	73,7	58	77,3
Positivos	5	8,9	1	5,3	6	8,0
Não realizado	7	12,5	4	21,0	11	14,7

DRM – Doença residual mínima; LA – Leucemia Aguda; LMA – Leucemia Mieloide Aguda; LPA – Leucemia Promielocítica Aguda com t(15;17)(q22;q12); LLA-B – Leucemia Linfóide Aguda do tipo B; LLA-T – Leucemia Linfóide Aguda do tipo T; LBA – Leucemia Bifenotípica Aguda; LDH – Lactato Desidrogenase. Teste de Mann-Whitney U, Teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher. \*Significância estatística quando comparado com o grupo DRM negativa, P<0,05.

Dos 75 pacientes incluídos neste estudo, não foi possível analisar a presença da mutação *FLT3-DIT* em 23 casos e da mutação *FLT3-D835* em 26 casos devido à quantidade insuficiente de amostra ou a ausência de amplificação do gene selvagem.

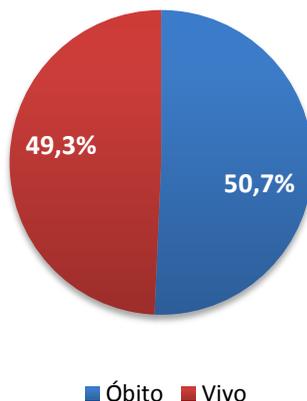
Do total de pacientes analisados (n=75), somente três apresentaram a mutação *FLT3-DIT* (Tabela 1). Um foi diagnosticado como portador de LPA, outro como de LMA sem maturação e o terceiro como de LLA-B do tipo comum. Os pacientes portadores de LPA e de LMA sem maturação obtiveram remissão após o tratamento. No entanto, o paciente com diagnóstico de LLA-B do tipo comum foi a óbito sem entrar em remissão. Os quatro pacientes que foram positivos para a mutação *FLT3-D835* entraram em remissão após o tratamento e encontravam-se vivos até o momento do término do presente trabalho. Dois deles foram diagnosticados como LMA com maturação com t(8;21)(q22;q22), um como LPA e outro como LMA mielomonocítica. Não foi observada associação entre a resposta ao tratamento e a presença das mutações no *FLT3*. Além disso, nenhum paciente apresentou a mutação *JAK2V617F*.

Em relação à pesquisa das translocações, três pacientes apresentaram t(8;21)(q22;q22), 19 a t(15;17)(q22;q12) e cinco a t(9;22)(q34;q11.2), recebendo o diagnóstico de LMA com maturação com t(8;21)(q22;q22), LPA com t(15;17)(q22;q12) e LLA-B com t(9;22)(q34;q11.2), respectivamente. Nenhum paciente apresentou a inv(16)(p13;q22).

Além dessas alterações genéticas, também foi investigada a transcrição de *survivina*, uma proteína antiapoptótica, nas células leucêmicas desses pacientes. Devido à quantidade insuficiente de amostra ou a ausência de amplificação do gene constitutivo (*gapdh*), não foi possível avaliar a intensidade de transcrição de *survivina* em 11 casos. Como pode ser observado na Tabela 1, seis pacientes expressaram *survivina* no momento do diagnóstico. Desses, um era portador de LMA com maturação, um de leucemia monoblástica aguda, dois de LLA-B tipo comum e dois de LLA-T. Os pacientes com diagnóstico de LMA com maturação, de leucemia monoblástica aguda e de LLA-T foram a óbito. Não houve associação entre a presença de DRM e a transcrição de *survivina*.

Do total de pacientes (n=75), 38 (50,7%) foram a óbito (Figura 17). Apenas um óbito não foi relacionado à doença hematológica de base ou a complicações associadas ao tratamento. Dos pacientes que foram a óbito, 19 (50%) estavam em remissão no momento do óbito e 19 (50%) morreram sem entrar em remissão.

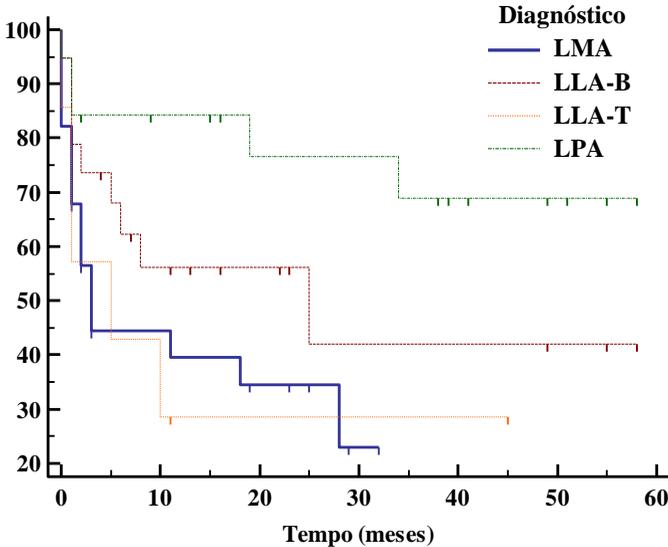
Figura 17 – Distribuição dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda segundo óbito.



Apesar de a LPA ser um subtipo de LMA, essa leucemia possui patofisiologia, prognóstico e tratamento diferenciados das demais LMAs. Devido a isso, para a construção da curva de sobrevida e determinação da mediana de sobrevida dos pacientes, optou-se por separar os casos de LPA dos demais casos de LMA. Por apresentarem prognósticos diferenciados entre si, os pacientes com diagnóstico de LLA-B e LLA-T também foram divididos em dois grupos (SWERDLOW et al., 2008).

A mediana de sobrevida dos pacientes com LMA foi de três meses, daqueles com diagnóstico de LLA-B de 25 meses e daqueles com diagnóstico de LLA-T de cinco meses (Figura 18). A mediana de sobrevida dos pacientes com LPA não pôde ser calculada, pois poucos pacientes com diagnóstico de LPA foram a óbito durante o período desse estudo. Dos pacientes com diagnóstico de LBA, um foi a óbito nove dias após o diagnóstico e outro se encontrava vivo até o momento do término desse trabalho.

Figura 18 – Curva de sobrevivência dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda.



LMA – Leucemia mieloide aguda; LPA – Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); LLA-B – Leucemia linfóide aguda do tipo B; LLA-T – Leucemia linfóide aguda do tipo T; LBA – Leucemia bifenotípica aguda. Método de Kaplan-Meier.

#### 4.2 TRANSCRIÇÃO DOS GENES *mdr*

Dos 75 pacientes incluídos neste estudo, 10 não apresentaram amplificação do gene constitutivo (*gapdh*) e por isso suas amostras foram excluídas dos ensaios de detecção da transcrição gênica. Assim sendo, a avaliação da transcrição de *abcb1*, *abcc1* e *lrp* foi realizada em 65 pacientes. Para as análises da transcrição dos genes *mdr*, os pacientes foram divididos em cinco grupos: LMA (n=24), LPA (n=17), LLA-B (n=17), LLA-T (n=5) e LBA (n=2). Mais uma vez, optou-se por essa divisão em grupos devido às diferenças de prognóstico entre os subtipos de LA (SWERDLOW et al., 2008).

Como pode ser observado na Tabela 2, as medianas (limites) de transcrição de *abcb1*, *abcc1* e *lrp* no total de pacientes foi de 0,00 (0,00-1,32), 0,78 (0,00-7,35) e 0,00 (0,00-1,38), respectivamente. No momento do diagnóstico, não houve correlação entre a intensidade de transcrição dos diferentes genes *mdr*.

Tabela 2 – Mediana da transcrição de *abcb1*, *abcc1* e *lrp* nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.

Gene		DRM Negativa (n=49)	DRM Positiva (n=16)	Total (n=65)
T O T A L de L A (n=65)	<i>abcb1</i>			
	Mediana	<b>0,00</b>	<b>0,00*</b>	0,00
	Limites	0,00-1,10	0,00-1,32	0,00-1,32
	<i>abcc1</i>			
	Mediana	0,79	0,74	0,78
	Limites	0,00-7,35	0,00-1,08	0,00-7,35
	<i>lrp</i>			
	Mediana	0,00	0,68	0,00
	Limites	0,00-1,38	0,00-1,01	0,00-1,38
L M A (n=24)	<i>abcb1</i>			
	Mediana	<b>0,00</b>	<b>0,60*</b>	0,00
	Limites	0,00-0,84	0,00-1,32	0,00-1,32
	<i>abcc1</i>			
	Mediana	0,85	0,74	0,84
	Limites	0,00-7,37	0,00-1,08	0,00-7,35
	<i>lrp</i>			
	Mediana	0,00	0,00	0,00
	Limites	0,00-1,01	0,00-1,01	0,00-1,01
L P A (n=17)	<i>abcb1</i>			
	Mediana	0,00	0,00	0,00
	Limites	0,00-1,08	-	0,00-1,08
	<i>abcc1</i>			
	Mediana	0,68	0,89	0,68
	Limites	0,00-0,95	-	0,00-0,95
	<i>lrp</i>			
	Mediana	0,00	0,76	0,00
	Limites	0,00-1,12	-	0,00-1,12

Continua...

.....Continuação (Tabela 2).....

Gene		DRM Negativa (n=49)	DRM Positiva (n=16)	Total (n=65)
<i>abcb1</i>				
L	Mediana	0,00	0,00	0,00
L	Limites	0,00-1,10	0,00-1,09	0,00-1,10
<i>abcc1</i>				
A	Mediana	0,87	0,78	0,83
B	Limites	0,00-1,13	0,62-0,92	0,00-1,13
<i>lrp</i>				
(n=17)	Mediana	0,69	0,86	0,74
	Limites	0,00-1,38	0,62-0,91	0,00-1,38
<i>abcb1</i>				
L	Mediana	0,00	0,00	0,00
L	Limites	0,00-0,57	-	0,00-0,57
<i>abcc1</i>				
A	Mediana	0,39	0,00	0,00
T	Limites	0,00-1,01	-	0,00-1,01
<i>lrp</i>				
(n=5)	Mediana	0,26	0,00	0,00
	Limites	0,00-0,73	-	0,00-0,73
<i>abcb1</i>				
L	Mediana	0,00	0,00	0,00
L	Limites	-	-	0,00-0,00
<i>abcc1</i>				
B	Mediana	0,00	0,75	0,38
A	Limites	-	-	0,00-0,75
<i>lrp</i>				
(n=2)	Mediana	0,00	0,67	0,22
	Limites	-	-	0,00-0,67

DRM – Doença residual mínima; LMA – leucemia mieloide aguda; LLA – leucemia linfóide aguda; LBA – Leucemia bifenotípica aguda; n – número de pacientes. Teste de Mann-Whitney U. \*Significância estatística quando comparado com o grupo DRM negativa,  $P < 0,05$ .

Além disso, analisou-se se havia associação entre os níveis de transcrição dos genes *mdr* e a resposta ao tratamento (Tabela 2) e pode-se constatar que há associação entre a maior transcrição de *abcb1* e a presença de DRM, tanto no total de pacientes ( $P=0,004$ ), quanto no

grupo de pacientes com diagnóstico de LMA ( $P=0,005$ ). Essa mesma associação não foi encontrada nos demais grupos de pacientes.

As expressões de *abcc1* e de *lrp* não apresentaram relação com a resposta ao tratamento em nenhum subtipo de LA.

Posteriormente, avaliou-se se havia associação entre a intensidade de transcrição dos genes *mdr* e o diagnóstico diferencial dos pacientes (LMA, LPA, LLA-B, LLA-T ou LBA). Porém, não foi encontrada qualquer associação entre a transcrição dos genes e o diagnóstico diferencial, mesmo quando os pacientes foram separados segundo a resposta ao tratamento (DRM negativa e DRM positiva).

Outro dado que foi avaliado é se existia associação entre a transcrição dos genes *mdr* e alguns fatores de prognóstico como: idade, leucometria e percentual de blastos ao diagnóstico, LDH, expressão de CD34, de CD56 e de *survivina*, presença das mutações *FLT3-DIT*, *FLT3-D835* e da translocação  $t(8;21)(q22;q22)$  nos casos de LMA e da  $t(9;22)(q34;q11.2)$  nos casos de LLA-B (Tabela 3, 4 e 5). Devido ao pequeno número de pacientes no grupo LBA, não foi possível verificar a existência de relação entre a transcrição de *abcb1*, *abcc1* e *lrp* e os fatores de prognóstico nesse grupo. Como pode ser observada na Tabela 3, a transcrição de *abcb1* correlacionou-se positivamente com a contagem de leucócitos nos casos de LLAs-T ( $P=0,007$ ;  $R^2=0,967$ ). Essa correlação manteve-se no grupo de pacientes com diagnóstico de LLA-T e DRM negativa ( $P=0,030$ ;  $R^2=0,970$ ).

Tabela 3 – Associação entre a transcrição de *abcb1* e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.

	Fatores de Prognóstico	DRM Negativa (n=49)	DRM Positiva (n=16)	Total (n=65)
T O T A L de L A (n=65)	Idade (anos)	0,130	0,715	0,534
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,316	0,261	0,975
	Blastos (%)	0,640	0,384	0,698
	LDH (U/L)	0,323	0,191	0,167
	Expressão de CD34	1,000	1,000	0,516
	Expressão de CD56	1,000	0,524	0,324
	<i>Survivina</i>	1,000	1,000	0,593
	<i>FLT3-DIT</i>	1,000	1,000	1,000
	<i>FLT3-D835</i>	0,225	-	0,185
	<i>t(8;21)(q22;q22)</i>	0,200	-	0,881
<i>t(9;22)(q34;q11.2)</i>	1,000	1,000	0,559	
L M A (n=24)	Idade (anos)	0,100	0,746	0,921
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,765	0,513	0,811
	Blastos (%)	0,074	0,952	0,294
	LDH (U/L)	0,379	0,705	0,249
	Expressão de CD34	0,295	0,857	0,726
	Expressão de CD56	1,000	0,400	0,961
	<i>Survivina</i>	0,133	0,889	0,101
	<i>FLT3-DIT</i>	1,000	-	1,000
	<i>FLT3-D835</i>	0,273	-	0,200
	<i>t(8;21)(q22;q22)</i>	0,200	-	0,881
<i>t(9;22)(q34;q11.2)</i>	-	-	-	
L P A (n=17)	Idade (anos)	0,906	-	0,976
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,517	-	0,529
	Blastos (%)	0,481	-	0,546
	LDH (U/L)	0,861	-	0,828
	Expressão de CD34	1,000	-	1,000
	Expressão de CD56	0,273	-	0,276
	<i>Survivina</i>	-	-	-
	<i>FLT3-DIT</i>	1,000	-	1,000
	<i>FLT3-D835</i>	1,000	-	1,000
	<i>t(8;21)(q22;q22)</i>	-	-	-
<i>t(9;22)(q34;q11.2)</i>	-	-	-	

Continua...

.....Continuação (Tabela 3).....

	Fatores de Prognóstico	DRM Negativa (n=49)	DRM Positiva (n=16)	Total (n=65)
	Idade (anos)	0,356	0,335	0,756
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,498	0,457	0,651
L	Blastos (%)	0,695	0,567	0,686
L	LDH (U/L)	0,726	0,288	0,387
A	Expressão de CD34	1,000	-	1,000
	Expressão de CD56	-	-	-
B	Survivina	1,000	-	1,000
	FLT3-DIT	-	1,000	1,000
(n=17)	FLT3-D835	-	-	-
	t(8;21)(q22;q22)	-	-	-
	t(9;22)(q34;q11.2)	1,000	1,000	0,559
<hr/>				
	Idade (anos)	0,113	-	0,089
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	<b>0,030*</b>	-	<b>0,007*</b>
L	Blastos (%)	0,490	-	0,510
L	LDH (U/L)	0,757	-	0,827
A	Expressão de CD34	0,250	-	0,400
	Expressão de CD56	-	-	-
T	Survivina	1,000	-	1,000
	FLT3-DIT	-	-	-
(n=5)	FLT3-D835	-	-	-
	t(8;21)(q22;q22)	-	-	-
	t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-

DRM – Doença residual mínima; LA – Leucemia aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda; LPA – Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); LLA-B – Leucemia linfóide aguda do tipo B; LLA-T – Leucemia linfóide aguda do tipo T; LDH – Lactato desidrogenase; Leuco - Leucometria. Teste de Mann-Whitney U ou correlação de Pearson. \*Significância estatística.

Em relação à transcrição de *abcc1* (Tabela 4), nos portadores de LA, foi observada uma associação entre a maior transcrição de *abcc1* e a presença do marcador CD34 nos blastos leucêmicos ( $P=0,006$ ). Essa associação manteve-se para o grupo de pacientes com diagnóstico de LA e com DRM negativa ( $P=0,007$ ), mas não para o grupo com DRM positiva ( $P=0,333$ ). No grupo de pacientes portadores de LMA e que apresentavam DRM após a terapia de indução, houve correlação positiva entre a idade e a transcrição de *abcc1* ( $P=0,029$ ;  $R^2=0,718$ ). Nos pacientes com diagnóstico de LPA e que não apresentaram DRM após a terapia de indução, houve correlação diretamente proporcional entre a transcrição de *abcc1* e o percentual de promielócitos neoplásicos

( $P=0,019$ ;  $R^2=0,639$ ). Em relação às LLAs, os portadores de LLA-B que entraram em remissão após o tratamento apresentaram correlação positiva entre a transcrição de *abcc1* e a atividade de LDH ( $P=0,017$ ;  $R^2=0,983$ ).

Tabela 4 – Associação entre a transcrição de *abcc1* e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.

	Fatores de Prognóstico	DRM Negativa (n=49)	DRM Positiva (n=16)	Total (n=65)
T O T A L de L L A (n=65)	Idade (anos)	0,877	0,070	0,929
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,513	0,362	0,759
	Blastos (%)	0,094	0,944	0,101
	LDH (U/L)	0,692	0,263	0,576
	Expressão de CD34	<b>0,007*</b>	0,333	<b>0,006*</b>
	Expressão de CD56	0,115	0,563	0,075
	Survivina	0,567	0,667	0,689
	<i>FLT3-DIT</i>	0,428	0,778	0,549
	<i>FLT3-D835</i>	0,490	-	0,459
	t(8;21)(q22;q22)	0,998	-	0,794
t(9;22)(q34;q11.2)	0,737	0,500	0,898	
L M A (n=24)	Idade (anos)	0,570	<b>0,029*</b>	0,587
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,523	0,279	0,678
	Blastos (%)	0,216	0,919	0,226
	LDH (U/L)	0,802	0,633	0,974
	Expressão de CD34	0,179	0,429	0,060
	Expressão de CD56	0,268	0,714	0,209
	Survivina	0,533	0,889	0,362
	<i>FLT3-DIT</i>	0,769	-	0,647
	<i>FLT3-D835</i>	0,158	-	0,246
	t(8;21)(q22;q22)	0,998	-	0,794
t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-	

Continua...

.....Continuação (Tabela 4).....

	Fatores de Prognóstico	DRM Negativa (n=49)	DRM Positiva (n=16)	Total (n=65)
	Idade (anos)	0,245	-	0,487
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,519	-	0,575
	Blastos (%)	<b>0,019*</b>	-	0,058
L	LDH (U/L)	0,261	-	0,219
P	Expressão de CD34	0,055	-	0,055
A	Expressão de CD56	0,667	-	0,667
	<i>Survivina</i>	-	-	-
(n=17)	<i>FLT3-DIT</i>	0,727	-	0,727
	<i>FLT3-D835</i>	0,800	-	0,800
	t(8;21)(q22;q22)	-	-	-
	t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-
	Idade (anos)	0,909	0,463	0,795
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,272	0,766	0,856
L	Blastos (%)	0,259	0,649	0,313
L	LDH (U/L)	0,453	<b>0,017*</b>	0,471
A	Expressão de CD34	0,179	-	0,167
	Expressão de CD56	-	-	-
B	<i>Survivina</i>	0,872	-	0,912
	<i>FLT3-DIT</i>	-	0,667	0,727
(n=17)	<i>FLT3-D835</i>	-	-	-
	t(8;21)(q22;q22)	-	-	-
	t(9;22)(q34;q11.2)	0,737	0,500	0,898
	Idade (anos)	0,525	-	0,902
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,566	-	0,589
L	Blastos (%)	0,702	-	0,825
L	LDH (U/L)	0,896	-	0,940
A	Expressão de CD34	0,750	-	0,400
	Expressão de CD56	-	-	-
T	<i>Survivina</i>	0,333	-	0,333
	<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-
(n=5)	<i>FLT3-D835</i>	-	-	-
	t(8;21)(q22;q22)	-	-	-
	t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-

DRM – Doença residual mínima; LA – Leucemia aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda; LPA – Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); LLA-B – Leucemia linfóide aguda do tipo B; LLA-T – Leucemia linfóide aguda do tipo T; LDH – Lactato desidrogenase; Leuco - Leucometria. Teste de Mann-Whitney U ou correlação de Pearson. \*Significância estatística.

Na Tabela 5, pode-se observar que, nos casos de LA, a maior transcrição de *lrp* associou-se com a ausência de transcrição de *survivina* e a ausência de expressão de CD56 nas células neoplásicas (P=0,029 e P=0,029, respectivamente). Nos pacientes com diagnóstico de LA que responderam ao tratamento, houve associação entre a ausência do marcador CD56 e a maior transcrição de *lrp* (P=0,043). Nos casos de LMA, pode-se observar a presença de associação entre a ausência de transcrição de *survivina* e a maior transcrição de *lrp* (P=0,040).

Tabela 5 – Associação entre a transcrição de *lrp* e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.

	Fatores de Prognóstico	DRM Negativa (n=49)	DRM Positiva (n=16)	Total (n=65)
T O T A L de L A (n=65)	Idade (anos)	0,310	0,548	0,988
	Leuco (x10 <sup>3</sup> /μL)	0,982	0,415	0,400
	Blastos (%)	0,413	0,853	0,420
	LDH (U/L)	0,717	0,119	0,139
	Expressão de CD34	0,431	0,308	0,184
	Expressão de CD56	<b>0,043*</b>	0,405	<b>0,029*</b>
	<i>Survivina</i>	0,071	0,067	<b>0,029*</b>
	<i>FLT3-DIT</i>	0,676	0,222	0,092
	<i>FLT3-D835</i>	0,203	-	0,160
	t(8;21)(q22;q22)	0,664	-	0,630
t(9;22)(q34;q11.2)	0,069	0,500	0,135	
L M A (n=24)	Idade (anos)	0,910	0,250	0,371
	Leuco (x10 <sup>3</sup> /μL)	0,186	0,969	0,332
	Blastos (%)	0,502	0,624	0,891
	LDH (U/L)	0,947	0,461	0,780
	Expressão de CD34	0,795	0,464	0,687
	Expressão de CD56	0,061	0,714	0,069
	<i>Survivina</i>	0,267	0,111	<b>0,040*</b>
	<i>FLT3-DIT</i>	0,231	-	0,235
	<i>FLT3-D835</i>	0,491	-	0,516
	t(8;21)(q22;q22)	0,664	-	0,630
t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-	

Continua...

.....Continuação (Tabela 5).....

Fatores de Prognóstico		DRM Negativa (n=49)	DRM Positiva (n=16)	Total (n=65)
L P A  (n=17)	Idade (anos)	0,254	-	0,587
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,943	-	0,967
	Blastos (%)	0,378	-	0,606
	LDH (U/L)	0,588	-	0,689
	Expressão de CD34	0,257	-	0,257
	Expressão de CD56	0,448	-	0,448
	Survivina	-	-	-
	FLT3-DIT	1,000	-	1,000
	FLT3-D835	1,000	-	1,000
	t(8;21)(q22;q22)	-	-	-
t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-	
L L A  B  (n=17)	Idade (anos)	0,747	0,399	0,963
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,315	0,357	0,590
	Blastos (%)	0,937	0,507	0,598
	LDH (U/L)	0,511	0,408	0,304
	Expressão de CD34	0,803	-	0,850
	Expressão de CD56	-	-	-
	Survivina	0,497	-	0,735
	FLT3-DIT	-	0,667	0,182
	FLT3-D835	-	-	-
	t(8;21)(q22;q22)	-	-	-
t(9;22)(q34;q11.2)	0,069	1,000	0,135	
L L A  T  (n=5)	Idade (anos)	0,344	-	0,738
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,480	-	0,495
	Blastos (%)	0,578	-	0,687
	LDH (U/L)	0,709	-	0,520
	Expressão de CD34	0,750	-	0,400
	Expressão de CD56	-	-	-
	Survivina	0,333	-	0,333
	FLT3-DIT	-	-	-
	FLT3-D835	-	-	-
	t(8;21)(q22;q22)	-	-	-
t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-	

DRM – Doença residual mínima; LA – Leucemia aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda; LPA – Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); LLA-B – Leucemia linfóide aguda do tipo B; LLA-T – Leucemia linfóide aguda do tipo T; LDH – Lactato desidrogenase; Leuco - Leucometria. Teste de Mann-Whitney U ou correlação de Pearson. \*Significância estatística.

Analisou-se também se havia associação entre a ocorrência do óbito e a intensidade de transcrição dos genes *mdr*. No entanto, não foi encontrada qualquer associação entre a transcrição de *abcb1*, *abcc1* e *lrp* e a ocorrência do óbito ( $P=0,103$ ;  $P=0,730$  e  $P=0,184$ , respectivamente).

Dos 65 pacientes que tiveram a transcrição dos genes *mdr* avaliada no momento do diagnóstico, foi possível verificar a transcrição desses genes após o primeiro ciclo de terapia de indução em 29 casos (LMA=7; LPA=15; LLA-B=7; Tabela 6). Não foi possível avaliar a transcrição dos genes *mdr* após a terapia de indução em nenhum caso de LLA-T ou LBA. A análise dos dados mostrou diminuição significativa na transcrição de *abcc1* após o tratamento nos pacientes com LMA ( $P=0,016$ ).

Tabela 6 – Mediana da transcrição de *abcb1*, *abcc1* e *lrp* nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda antes e depois do primeiro ciclo de terapia de indução.

	Gene	DRM Negativa (n=20)		DRM Positiva (n=9)		Total (n=29)	
		1°	2°	1°	2°	1°	2°
T O	<i>abcb1</i>	Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Limites	0,00-1,10	0,00-1,01	0,00-1,09	0,00-1,18	0,00-1,10	0,00-1,18
A L	<i>abcc1</i>	Mediana	0,78	0,69	0,86	0,79	0,84
	Limites	0,00-1,17	0,00-1,23	0,00-0,92	0,00-0,94	0,00-1,17	0,00-1,23
de L A (n=29)	<i>lrp</i>	Mediana	0,00	0,61	0,62	0,79	0,00
	Limites	0,00-1,12	0,00-1,20	0,00-0,91	0,00-1,11	0,00-1,12	0,00-1,20
L M A (n=7)	<i>abcb1</i>	Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Limites	0,00-0,00	0,00-0,00	0,00-0,00	0,00-0,00	0,00-0,00	0,00-0,00
A (n=7)	<i>abcc1</i>	Mediana	0,96	0,00	0,87	0,42	<b>0,89</b>
	Limites	0,74-1,17	0,00-0,73	0,84-0,90	0,00-0,88	0,74-1,17	0,00-0,88
	<i>lrp</i>	Mediana	0,00	0,98	0,46	0,48	0,00
	Limites	0,00-0,82	0,60-1,10	0,00-0,91	0,00-1,11	0,00-0,91	0,00-1,11
L P A (n=15)	<i>abcb1</i>	Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Limites	0,00-1,08	0,00-1,01	-	-	0,00-1,08	0,00-1,01
	<i>abcc1</i>	Mediana	0,67	0,79	0,88	0,92	0,68
	Limites	0,00-0,94	0,00-1,23	-	-	0,00-0,94	0,00-1,23
	<i>lrp</i>	Mediana	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00
	Limites	0,00-1,12	0,00-1,20	-	-	0,00-1,12	0,00-1,20
L L A (n=7)	<i>abcb1</i>	Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Limites	0,00-1,10	0,00-0,91	0,00-1,09	0,00-1,18	0,00-1,10	0,00-1,18
A B (n=7)	<i>abcc1</i>	Mediana	0,93	0,78	0,62	0,67	0,87
	Limites	0,83-1,09	0,00-0,95	0,00-0,92	0,00-0,79	0,00-1,09	0,00-0,95
	<i>lrp</i>	Mediana	0,72	0,90	0,62	0,79	0,69
	Limites	0,66-0,86	0,62-1,02	0,00-0,86	0,00-1,11	0,00-0,86	0,00-1,11

DRM – Doença residual mínima; LA – Leucemia aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda; LPA – Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); LLA-B – Leucemia linfóide aguda do tipo B; LLA-T – Leucemia linfóide aguda do tipo T; 1° - Amostra coletada no momento do diagnóstico; 2° – Amostra coletada após o primeiro ciclo de terapia de indução. Teste de Wilcoxon. \*Significância estatística quando comparado com os valores observados no momento do diagnóstico, P<0,05.

### 4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MDR

Dos 75 pacientes incluídos neste estudo, 46 tiveram a expressão das proteínas MDR avaliadas no momento do diagnóstico. Os demais pacientes não puderam ser analisados devido a quantidade insuficiente de amostra. Assim como realizado para a avaliação da transcrição gênica, os pacientes foram divididos em cinco grupos: LMA (n=18), LPA (n=14), LLA-B (n=9), LLA-T (n=4) e LBA (n=1). Como anteriormente mencionado, essa divisão deve-se às diferenças de prognóstico que esses subtipos de LA apresentam (SWERDLOW et al., 2008).

Como pode ser observado na Tabela 7, as medianas (limites) de expressão das proteínas ABCB1, ABCC1 e LRP foram de 2,21 (0,00-116,15), 1,14 (0,00-7,54) e 0,59 (0,00-39,93), respectivamente. Não houve correlação entre a intensidade de expressão das diferentes proteínas MDR.

Tabela 7 – Mediana da expressão de ABCB1, ABCC1 e LRP nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e ao diagnóstico diferencial.

	<b>Proteína</b>	<b>DRM Negativa (n=31)</b>	<b>DRM Positiva (n=15)</b>	<b>Total (n=46)</b>
<b>T</b>	<b>ABCB1</b>			
	Mediana	2,09	2,74	2,21
<b>O</b>	Limites	0,00-116,15	0,87-83,70	0,00-116,15
	<b>ABCC1</b>			
<b>L</b>	Mediana	1,12	1,37	1,14
	Limites	0,00-7,54	0,75-3,02	0,00-7,54
<b>A</b>	<b>LRP</b>			
	Mediana	0,80	0,13	0,59
<b>(n=46)</b>	Limites	0,00-39,93	0,00-11,40	0,00-39,93
	<b>ABCB1</b>			
<b>L</b>	Mediana	1,86	15,90	3,13
	Limites	0,00-10,77	1,48-83,70	0,00-83,70
<b>M</b>	<b>ABCC1</b>			
	Mediana	<b>1,07</b>	<b>2,02*</b>	1,14
<b>(n=18)</b>	Limites	0,00-1,57	1,00-2,02	0,00-3,02
	<b>LRP</b>			
<b>A</b>	Mediana	8,51	0,13	6,00
	Limites	0,00-39,93	0,00-11,40	0,00-39,93
<b>L</b>	<b>ABCB1</b>			
	Mediana	2,64	3,54	2,64
<b>P</b>	Limites	1,42-29,46	0,87-6,20	0,87-29,46
	<b>ABCC1</b>			
<b>A</b>	Mediana	1,15	0,99	1,15
	Limites	0,61-5,64	0,75-1,23	0,61-5,64
<b>(n=14)</b>	<b>LRP</b>			
	Mediana	0,21	1,40	0,32
<b>L</b>	Limites	0,00-2,48	0,00-2,79	0,00-2,79
	<b>ABCB1</b>			
<b>L</b>	Mediana	3,04	1,78	1,78
	Limites	1,21-116,15	1,51-14,51	1,21-116,15
<b>A</b>	<b>ABCC1</b>			
	Mediana	1,18	1,37	1,32
<b>B</b>	Limites	0,88-7,54	0,91-1,40	0,88-7,54
	<b>LRP</b>			
<b>(n=9)</b>	Mediana	0,50	1,30	0,50
	Limites	0,00-6,74	0,00-2,61	0,00-6,74

Continua...

.....Continuação (Tabela 7).....

	<b>Proteína</b>	<b>DRM Negativa (n=31)</b>	<b>DRM Positiva (n=15)</b>	<b>Total (n=46)</b>
	<b>ABCBI</b>			
<b>L</b>	Mediana	1,51	2,02	1,76
<b>L</b>	Limites	1,19-4,99	-	1,19-4,99
<b>A</b>	<b>ABCC1</b>			
	Mediana	1,05	1,24	1,14
<b>T</b>	Limites	0,65-1,74	-	0,65-1,74
	<b>LRP</b>			
<b>(n=4)</b>	Mediana	0,00	0,00	0,26
	Limites	0,00-1,17	-	0,00-1,17
	<b>ABCBI</b>			
	Mediana	-	2,12	2,12
<b>L</b>	Limites	-	-	-
<b>B</b>	<b>ABCC1</b>			
<b>A</b>	Mediana	-	1,08	1,08
	Limites	-	-	-
<b>(n=1)</b>	<b>LRP</b>			
	Mediana	-	0,00	0,00
	Limites	-	-	-

DRM – Doença residual mínima; LA – Leucemia aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda; LPA – Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); LLA-B – Leucemia linfóide aguda do tipo B; LLA-T – Leucemia linfóide aguda do tipo T. Teste de Mann-Whitney U. \*Significância estatística quando comparado com o grupo DRM negativa, P<0,05.

A seguir, foi avaliado se havia associação entre a expressão das proteínas MDR e a resposta ao tratamento (Tabela 7). Nos pacientes portadores de LMA, houve associação entre a maior expressão de ABCB1 e a presença de DRM (P=0,017). Quando foi avaliado se havia associação entre o diagnóstico diferencial e a expressão das proteínas, observou-se que a maior expressão de LRP apresentou associação com o diagnóstico de LMA (P=0,025). Essa associação também se manteve significativa para o grupo de pacientes com diagnóstico de LMA que entrou em remissão (P=0,008).

Assim como foi realizado para a expressão de RNAm, verificou-se se havia associação entre a expressão das proteínas MDR e alguns fatores de prognóstico como: idade, leucometria e percentual de blastos ao diagnóstico, LDH, expressão de CD34, de CD56 e de *survivina*, presença das mutações *FLT3-DIT*, *FLT3-D835* e da translocação t(8;21)(q22;q22) nos casos de LMA e da t(9;22)(q34;q11.2) nos casos

de LLA-B (Tabelas 8, 9 e 10). Devido ao pequeno número de pacientes no grupo LBA, não foi possível verificar a existência de relação entre a expressão de ABCB1, ABCC1 e LRP e os fatores de prognóstico nesse grupo.

Como pode ser observado na Tabela 8, o grupo dos pacientes que entraram em remissão após a terapia de indução apresentaram correlação positiva entre a expressão de ABCB1 e a LDH ( $P=0,001$ ;  $R^2=0,577$ ). Em relação ao grupo de pacientes com diagnóstico de LLA-B, pôde-se observar que os pacientes que não apresentaram DRM após a terapia de indução apresentaram correlação diretamente proporcional entre a expressão de ABCB1 e a LDH ( $P=0,007$ ;  $R^2=0,929$ ).

Tabela 8 – Associação entre a expressão de ABCB1 e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.

	Fatores de Prognóstico	DRM Negativa (n=31)	DRM Positiva (n=15)	Total (n=46)
T O T A L de L A (n=46)	Idade (anos)	0,487	0,528	0,802
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,650	0,210	0,292
	Blastos (%)	0,629	0,870	0,945
	LDH (U/L)	<b>0,001*</b>	0,194	0,557
	Expressão de CD34	0,229	0,692	0,376
	Expressão de CD56	0,383	0,886	0,452
	Survivina	0,464	1,000	0,347
	FLT3-DIT	0,696	-	0,625
	FLT3-D835	0,417	-	0,364
	t(8;21)(q22;q22)	0,389	-	0,749
t(9;22)(q34;q11.2)	1,000	1,000	1,000	
L M A (n=18)	Idade (anos)	0,548	0,479	0,873
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,564	0,311	0,301
	Blastos (%)	0,853	0,327	0,905
	LDH (U/L)	0,161	0,143	0,453
	Expressão de CD34	1,000	1,000	0,233
	Expressão de CD56	0,629	1,000	0,268
	Survivina	0,857	0,800	0,659
	FLT3-DIT	-	-	-
	FLT3-D835	-	-	0,545
	t(8;21)(q22;q22)	0,889	-	0,732
t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-	

Continua...

.....Continuação (Tabela 8).....

Fatores de Prognóstico		DRM Negativa (n=31)	DRM Positiva (n=15)	Total (n=46)
L P A (n=14)	Idade (anos)	0,291	-	0,866
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,442	-	0,405
	Blastos (%)	0,964	-	0,782
	LDH (U/L)	0,999	-	0,996
	Expressão de CD34	0,381	-	0,267
	Expressão de CD56	0,500	-	0,667
	<i>Survivina</i>	-	-	-
	<i>FLT3-DIT</i>	0,800	-	0,727
	<i>FLT3-D835</i>	-	-	-
	<i>t(8;21)(q22;q22)</i>	-	-	-
<i>t(9;22)(q34;q11.2)</i>	-	-	-	
L L A B (n=9)	Idade (anos)	0,692	0,892	0,508
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,834	0,649	0,658
	Blastos (%)	0,702	0,311	0,758
	LDH (U/L)	<b>0,007*</b>	0,258	0,683
	Expressão de CD34	0,333	-	0,222
	Expressão de CD56	-	-	-
	<i>Survivina</i>	0,400	-	0,286
	<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-
	<i>FLT3-D835</i>	-	-	-
	<i>t(8;21)(q22;q22)</i>	-	-	-
<i>t(9;22)(q34;q11.2)</i>	1,000	1,000	1,000	
L L A T (n=4)	Idade (anos)	0,503	-	0,434
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,471	-	0,981
	Blastos (%)	1,000	-	0,541
	LDH (U/L)	0,401	-	0,187
	Expressão de CD34	1,000	-	0,667
	Expressão de CD56	-	-	-
	<i>Survivina</i>	-	-	-
	<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-
	<i>FLT3-D835</i>	-	-	-
	<i>t(8;21)(q22;q22)</i>	-	-	-
<i>t(9;22)(q34;q11.2)</i>	-	-	-	

DRM – Doença residual mínima; LA – Leucemia aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda; LPA – Leucemia promielocítica aguda com  $t(15;17)(q22;q12)$ ; LLA-B – Leucemia linfóide aguda do tipo B; LLA-T – Leucemia linfóide aguda do tipo T; LDH – Lactato desidrogenase; Leuco - Leucometria. Teste de Mann-Whitney U ou correlação de Pearson. \* Significância estatística.

Em relação à proteína ABCC1, pôde-se observar que houve correlação entre a expressão da proteína e a LDH nos portadores de LPA (Tabela 9;  $P=0,019$ ;  $R^2=0,664$ ). Essa mesma correlação manteve-se significativa no grupo de pacientes com diagnóstico de LPA que entraram em remissão ( $P=0,018$ ;  $R^2=0,695$ ). O grupo de pacientes com diagnóstico de LLA-B que apresentaram DRM após a terapia de indução tiveram uma correlação inversamente proporcional entre a expressão de ABCC1 e a leucometria ao diagnóstico ( $P=0,006$ ;  $R^2=-1,000$ ).

Tabela 9 – Associação entre a expressão de ABCC1 e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.

	Fatores de Prognóstico	DRM Negativa (n=31)	DRM Positiva (n=15)	Total (n=46)	
T O T A L de L A	Idade (anos)	0,625	0,893	0,702	
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,999	0,646	0,868	
	Blastos (%)	0,749	0,585	0,966	
	LDH (U/L)	0,452	0,127	0,879	
	Expressão de CD34	0,749	0,573	0,693	
	Expressão de CD56	0,317	0,686	0,427	
	Survivina	0,507	0,545	0,728	
	FLT3-DIT	0,174	-	0,125	
	FLT3-D835	0,625	-	0,636	
	(n=46)	t(8;21)(q22;q22)	0,689	-	0,860
	t(9;22)(q34;q11.2)	0,600	0,667	0,940	
L M A	Idade (anos)	0,529	0,467	0,426	
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,327	0,676	0,543	
	Blastos (%)	0,513	0,541	0,878	
	LDH (U/L)	0,345	0,141	0,740	
	Expressão de CD34	1,000	0,800	0,352	
	Expressão de CD56	0,629	1,000	0,755	
	Survivina	0,857	0,400	0,286	
	(n=18)	FLT3-DIT	-	-	-
		FLT3-D835	-	-	0,636
		t(8;21)(q22;q22)	0,689	-	0,752
	t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-	

Continua...

.....Continuação (Tabela 9).....

Fatores de Prognóstico		DRM Negativa (n=31)	DRM Positiva (n=15)	Total (n=46)
L P A  (n=14)	Idade (anos)	0,798	-	0,524
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,913	-	0,972
	Blastos (%)	0,598	-	0,436
	LDH (U/L)	<b>0,018*</b>	-	<b>0,019*</b>
	Expressão de CD34	0,714	-	0,833
	Expressão de CD56	0,500	-	0,444
	<i>Survivina</i>	-	-	-
	<i>FLT3-DIT</i>	0,200	-	0,182
	<i>FLT3-D835</i>	-	-	-
	<i>t(8;21)(q22;q22)</i>	-	-	-
<i>t(9;22)(q34;q11.2)</i>	-	-	-	
L L A  B  (n=9)	Idade (anos)	0,544	0,464	0,666
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,784	<b>0,006*</b>	0,610
	Blastos (%)	0,638	0,332	0,646
	LDH (U/L)	0,778	0,386	0,534
	Expressão de CD34	0,333	-	0,222
	Expressão de CD56	-	-	-
	<i>Survivina</i>	0,600	-	0,714
	<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-
	<i>FLT3-D835</i>	-	-	-
	<i>t(8;21)(q22;q22)</i>	-	-	-
<i>t(9;22)(q34;q11.2)</i>	0,600	0,667	0,940	
L L A  T  (n=4)	Idade (anos)	0,788	-	0,870
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,186	-	0,677
	Blastos (%)	1,000	-	0,502
	LDH (U/L)	0,686	-	0,554
	Expressão de CD34	1,000	-	0,667
	Expressão de CD56	-	-	-
	<i>Survivina</i>	-	-	-
	<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-
	<i>FLT3-D835</i>	-	-	-
	<i>t(8;21)(q22;q22)</i>	-	-	-
<i>t(9;22)(q34;q11.2)</i>	-	-	-	

DRM – Doença residual mínima; LA – Leucemia aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda; LPA – Leucemia promielocítica aguda com  $t(15;17)(q22;q12)$ ; LLA-B – Leucemia linfóide aguda do tipo B; LLA-T – Leucemia linfóide aguda do tipo T; LDH – Lactato desidrogenase; Leuco - Leucometria. Teste de Mann-Whitney U ou correlação de Pearson. \* Significância estatística.

Como pode ser observado na Tabela 10, os pacientes com diagnóstico de LPA apresentaram correlação inversamente proporcional entre a expressão de LRP e o percentual de promielócitos neoplásicos no momento do diagnóstico ( $P=0,001$ ;  $R^2=-0,924$ ). Essa correlação manteve-se significativa para o grupo de pacientes portadores de LPA que entraram em remissão ( $P=0,009$ ;  $R^2=-0,880$ ). Em relação aos pacientes com diagnóstico de LLA-B, houve associação entre a maior expressão de LRP e a presença da  $t(9;22)(q34;q11.2)$  ( $P=0,012$ ). Tanto os pacientes com diagnóstico de LLA-B que entraram em remissão, quanto os que não entraram apresentaram correlação entre a expressão de LRP e a leucometria ao diagnóstico ( $P=0,001$ ;  $R^2=0,970$ ;  $P=0,029$ ;  $R^2=0,999$ , respectivamente).

Tabela 10 – Associação entre a expressão de LRP e os fatores de prognóstico nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda no momento do diagnóstico, conforme resposta ao primeiro ciclo de terapia de indução e/ou ao diagnóstico diferencial.

	Fatores de Prognóstico	DRM Negativa (n=31)	DRM Positiva (n=15)	Total (n=46)
T O T A L de L A (n=46)	Idade (anos)	0,095	0,428	0,215
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,766	0,636	0,854
	Blastos (%)	0,495	0,665	0,661
	LDH (U/L)	0,456	0,645	0,775
	Expressão de CD34	0,125	0,333	0,433
	Expressão de CD56	0,195	0,333	0,751
	Survivina	0,190	0,200	0,120
	<i>FLT3-DIT</i>	1,000	-	1,000
	<i>FLT3-D835</i>	0,095	-	0,071
	t(8;21)(q22;q22)	0,857	-	0,511
t(9;22)(q34;q11.2)	0,333	1,000	0,100	
L M A (n=18)	Idade (anos)	0,498	0,407	0,402
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,671	0,579	0,604
	Blastos (%)	0,866	1,000	0,654
	LDH (U/L)	0,796	0,240	0,684
	Expressão de CD34	0,429	1,000	0,750
	Expressão de CD56	1,000	1,000	0,952
	Survivina	0,429	0,200	0,750
	<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-
	<i>FLT3-D835</i>	-	-	0,444
	t(8;21)(q22;q22)	0,607	-	0,511
t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-	
L P A (n=14)	Idade (anos)	0,702	-	0,129
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,527	-	0,695
	Blastos (%)	<b>0,009*</b>	-	<b>0,001*</b>
	LDH (U/L)	0,608	-	0,608
	Expressão de CD34	1,000	-	0,857
	Expressão de CD56	0,714	-	0,625
	Survivina	-	-	-
	<i>FLT3-DIT</i>	0,600	-	0,727
	<i>FLT3-D835</i>	-	-	-
	t(8;21)(q22;q22)	-	-	-
t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-	

Continua...

.....Continuação (Tabela 10).....

	Fatores de Prognóstico	DRM Negativa (n=31)	DRM Positiva (n=15)	Total (n=46)
	Idade (anos)	0,599	0,429	0,481
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	<b>0,001*</b>	<b>0,029*</b>	0,283
L	Blastos (%)	0,424	0,367	0,280
L	LDH (U/L)	0,657	0,420	0,886
A	Expressão de CD34	1,000	-	0,833
	Expressão de CD56	-	-	-
B	<i>Survivina</i>	1,000	-	0,857
	<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-
(n=9)	<i>FLT3-D835</i>	-	-	-
	t(8;21)(q22;q22)	-	-	-
	t(9;22)(q34;q11.2)	0,067	0,333	<b>0,012*</b>
<hr/>				
	Idade (anos)	0,115	-	0,658
	Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,911	-	0,707
L	Blastos (%)	1,000	-	1,000
L	LDH (U/L)	0,217	-	0,182
A	Expressão de CD34	1,000	-	0,333
	Expressão de CD56	-	-	-
T	<i>Survivina</i>	-	-	-
	<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-
(n=4)	<i>FLT3-D835</i>	-	-	-
	t(8;21)(q22;q22)	-	-	-
	t(9;22)(q34;q11.2)	-	-	-

DRM – Doença residual mínima; LA – Leucemia aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda; LPA – Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); LLA-B – Leucemia linfóide aguda do tipo B; LLA-T – Leucemia linfóide aguda do tipo T; LDH – Lactato desidrogenase; Leuco - Leucometria. Teste de Mann-Whitney U ou correlação de Pearson. \* Significância estatística.

Também se analisou se existia associação entre a ocorrência de óbito e a intensidade de expressão das proteínas MDR e verificou-se que não houve associação entre a expressão de ABCB1, ABCC1 e LRP e a ocorrência do óbito ( $P=0,987$ ;  $P=0,259$  e  $P=0,192$ , respectivamente).

Dos 46 pacientes que tiveram a expressão das proteínas MDR no momento diagnóstico, foi possível analisar a expressão de ABCB1, ABCC1 e LRP após o primeiro ciclo da terapia de indução em 19 pacientes (LMA=4, LPA=12 e LLA-B=3; Tabela 11). Não foi possível avaliar a expressão das proteínas MDR após a terapia de indução em nenhum caso de LLA-T ou LBA. A análise dos dados mostrou um aumento significativo na expressão de LRP após o tratamento nos

pacientes com LPA (P=0,012). Essa mesma associação foi encontrada com pacientes com diagnóstico de LPA que entraram em remissão após o tratamento (P=0,012).

Tabela 11 – Mediana da expressão de ABCB1, ABCC1 e LRP nas amostras de pacientes portadores de leucemia aguda antes e depois do primeiro ciclo de terapia de indução.

Proteína		DRM Negativa (n=13)		DRM Positiva (n=6)		Total (n=19)	
		1°	2°	1°	2°	1°	2°
T O T A L de L A	<b>ABCB1</b>						
	Mediana	4,06	1,72	5,46	1,93	4,71	1,78
	Limites	1,42-116,15	0,58-57,60	0,00-14,51	1,36-43,64	0,00-116,15	0,58-57,60
	<b>ABCC1</b>						
	Mediana	1,16	1,07	1,08	1,09	1,16	1,07
	Limites	0,00-2,00	0,33-4,42	0,00-7,54	0,95-1,82	0,00-7,54	0,33-4,42
(n=19)	<b>LRP</b>						
	Mediana	0,32	2,53	0,59	7,88	0,36	6,63
	Limites	0,00-39,93	0,00-12,97	0,00-8,51	0,00-10,92	0,00-39,93	0,00-12,97
L M A	<b>ABCB1</b>						
	Mediana	10,77	3,51	0,00	1,78	10,08	2,64
	Limites	9,40-26,77	0,58-14,13	-	-	0,00-26,77	0,58-14,13
(n=4)	<b>ABCC1</b>						
	Mediana	1,32	0,83	0,00	0,95	0,66	0,89
	Limites	0,00-1,59	0,79-2,96	-	-	0,00-1,59	0,79-2,96
	<b>LRP</b>						
	Mediana	17,60	0,68	8,51	6,36	13,06	3,52
	Limites	0,13-39,93	0,00-12,97	-	-	0,13-39,93	0,00-12,97
L P A	<b>ABCB1</b>						
	Mediana	2,20	1,47	6,20	43,64	2,64	1,60
	Limites	1,42-29,46	1,15-32,93	-	-	1,42-29,46	1,15-43,64
(n=12)	<b>ABCC1</b>						
	Mediana	1,14	1,07	0,75	1,82	1,13	1,08
	Limites	0,61-5,64	0,33-4,42	-	-	0,61-5,64	0,33-4,42
	<b>LRP</b>						
	Mediana	<b>0,21</b>	<b>7,39*</b>	0,00	0,00	<b>0,10</b>	<b>6,90*</b>
	Limites	0,00-2,48	0,00-12,14	-	-	0,00-2,48	0,00-12,14
L L A	<b>ABCB1</b>						
	Mediana	116,15	57,60	14,12	13,62	14,51	25,16
	Limites	-	-	13,74-14,51	2,08-25,16	13,74-116,15	2,08-57,60
B	<b>ABCC1</b>						
	Mediana	1,32	3,21	18,85	1,34	1,40	1,27
	Limites	-	-	1,40-7,54	1,01-1,66	1,32-7,54	1,01-3,21
(n=3)	<b>LRP</b>						
	Mediana	0,00	0,00	0,50	7,34	0,00	3,76
	Limites	-	-	0,00-1,00	3,76-10,92	0,00-1,00	0,00-10,92

DRM – Doença residual mínima; LA – Leucemia aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda; LPA – Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); LLA-B – Leucemia linfóide aguda do tipo B; LLA-T – Leucemia linfóide aguda do tipo T; 1° - Amostra coletada no momento do diagnóstico; 2° - Amostra coletada após o primeiro ciclo de terapia de indução. Teste de Wilcoxon.

\*Significância estatística quando comparado com os valores observados no momento do diagnóstico, P<0,05.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES

As LAs constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas que acometem indivíduos em todas as faixas etárias e é ligeiramente mais frequente em homens (BASSAN et al., 2004; JEMAL et al., 2010; NORONHA et al., 2011; CHAUHAN et al., 2012). Como esperado, o grupo de pacientes incluídos no presente trabalho apresentou predomínio do gênero masculino (n=40; Feminino=35; Figura 15) e uma ampla faixa etária (15-87 anos; Tabela 1). Além disso, a mediana de idade dos pacientes com diagnóstico de LMA foi de 54 anos (18-87 anos), enquanto a dos com diagnóstico de LLA foi de 30 anos (15-60 anos).

Mundialmente, a mediana de idade ao diagnóstico dos pacientes adultos portadores de LMA e de LLA é de 63 a 72 anos (JULIUSSON et al., 2009; SILLA et al., 2010; PULTE et al., 2013) e de 25 a 45 anos, respectivamente (GLEISSNER et al., 2002; CANDONI et al., 2006; CHAUHAN et al., 2012; PULTE et al., 2013; STOCK et al., 2013). No Brasil, um estudo realizado no Rio Grande do Sul com portadores de LMA encontrou uma mediana de idade ao diagnóstico de 43 anos (n=69) (BITTENCOURT et al., 2008). Estudos realizados no Rio de Janeiro, São Paulo, Maranhão e Piauí relataram medianas de idade ao diagnóstico nas LMAs de 34 anos (n=109), 67 anos (n=97), 35 anos (n=17) e 34 anos (n=115), respectivamente (REGO et al., 2003; NORONHA et al., 2011; CALLERA et al., 2012; SCHEINER et al., 2012). Em relação às LLAs, um estudo na Bahia e outro no Rio Grande do Sul relataram medianas de idade ao diagnóstico de 49 anos (n=70) e 26 anos (n=42), respectivamente (FOGLIATTO et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2007). Como pode ser observado, com exceção do estudo paulista (SCHEINER et al., 2012), os pacientes com diagnóstico de LMA aqui avaliados apresentaram mediana de idade um pouco superior à encontrada nos demais trabalhos brasileiros (REGO et al., 2003; BITTENCOURT et al., 2008; NORONHA et al., 2011; CALLERA et al., 2012), mas ainda inferior à relatada em estudos internacionais (JULIUSSON et al., 2009; SILLA et al., 2010; PULTE et al., 2013). Por outro lado, a mediana de idade dos pacientes com diagnóstico de LLA incluídos no presente estudo foi semelhante às relatadas em trabalhos nacionais e internacionais (FOGLIATTO et al., 2002; GLEISSNER et al., 2002; CANDONI et al., 2006;

BITTENCOURT et al., 2007; CHAUHAN et al., 2012; PULTE et al., 2013; STOCK et al., 2013).

Diferentemente dos outros subtipos de LA, as LPAs não apresentam distribuição em picos de idade. Sua incidência aumenta progressivamente durante a adolescência, atinge um patamar durante o início da vida adulta e permanece constante até decrescer por volta dos 60 anos (RIBEIRO; REGO, 2006). Desta forma, a maioria dos diagnósticos de LPA ocorre entre os 20 e 50 anos (RIBEIRO; REGO, 2006; YAMAMOTO; GOODMAN, 2008; LO-COCO et al., 2010; SANZ et al., 2010). Diante disso, a mediana de idade (26 anos) e a faixa etária (15-87 anos) dos pacientes com diagnóstico de LPA incluídos no presente estudo estão de acordo com o esperado para esse subtipo de LMA (RIBEIRO; REGO, 2006; YAMAMOTO; GOODMAN, 2008; LO-COCO et al., 2010; SANZ et al., 2010).

Ainda em relação à idade dos pacientes incluídos neste trabalho, verificou-se que os indivíduos que não entraram em remissão após a terapia de indução apresentaram mediana de idade significativamente superior (54 anos) a dos pacientes que entraram em remissão (35 anos;  $P < 0,001$ ; Tabela 1). Como já mencionado, a “idade avançada” é considerada um fator de mau prognóstico independente das LAs (LEVI et al., 2000; FERRARA; PALMIERI; LEONI, 2008; SHIPLEY; BUTERA, 2009; CORNELL; PALMER, 2012). Além disso, pacientes com mais idade geralmente apresentam maior ocorrência de outros fatores de mau prognóstico, como anormalidades citogenéticas desfavoráveis, maior susceptibilidade aos efeitos tóxicos da quimioterapia, superexpressão de genes associados à MDR e presença de contra-indicações à terapia intensiva, o que explica porque esses pacientes normalmente não respondem tão bem à quimioterapia (BUCHNER et al., 2009; ESTEY, 2009; KRUG et al., 2011; RIBERA, 2013). Por isso, já era esperado que no presente trabalho os pacientes com DRM positiva apresentassem uma mediana da idade superior a dos que entraram em remissão completa após a terapia de indução (LEVI et al., 2000; FERRARA; PALMIERI; LEONI, 2008).

A leucometria ao diagnóstico foi outro fator de prognóstico avaliado neste estudo. Os pacientes com diagnóstico de LA podem apresentar leucometria elevada, normal ou diminuída no momento do diagnóstico e, em geral, contagens superiores a  $30.000$  leucócitos/ $\text{mm}^3$  são consideradas de mau prognóstico (BASSAN et al., 2004; SHIPLEY; BUTERA, 2009; CORNELL; PALMER, 2012). No presente trabalho, o grupo de pacientes que entrou em remissão e o que apresentou DRM após a terapia de indução tiveram medianas de contagem de leucócitos

semelhantes, de 3.900 leucócitos/mm<sup>3</sup> e de 10.700 leucócitos/mm<sup>3</sup>, respectivamente ( $P>0,05$ ; Tabela 1). Um estudo brasileiro realizado no Piauí por Rego et al. (2003) relatou uma mediana de leucócitos um pouco superior (12.600 leucócitos/mm<sup>3</sup>;  $n=115$ ) à encontrada neste trabalho. No entanto, um trabalho realizado no Rio Grande do Sul, um estado muito parecido ao de Santa Catarina em relação às características étnicas e sócio-econômicas, relatou que 51% dos pacientes avaliados apresentavam contagens de leucócitos inferiores a 10.000 leucócitos/mm<sup>3</sup> ( $n=39$ ), a qual é muito semelhante às leucometrias encontradas no presente trabalho (BITTENCOURT et al., 2008). Além disso, um fato interessante observado é que tanto o grupo de bom prognóstico (DRM negativa), quanto o de mau prognóstico (DRM positiva) apresentaram medianas de leucometria consideradas como de bom prognóstico (BASSAN et al., 2004; SHIPLEY; BUTERA, 2009; CORNELL; PALMER, 2012) e dentro dos valores de referência estipulados pelo Serviço de Análises Clínicas do HU-UFSC (3.800 a 11.000 leucócitos/mm<sup>3</sup>) (LEE et al., 1999). No entanto, é importante ressaltar que dos 19 pacientes que não entraram em remissão após a terapia de indução, sete (36,8%) apresentaram leucometria superior a 30.000 leucócitos/mm<sup>3</sup>, enquanto que no grupo com DRM negativa, apenas dez pacientes (17,8%) de um total de 56 tiveram leucometria acima de 30.000 leucócitos/mm<sup>3</sup>. Dessa forma, fica evidente que, apesar das medianas de leucometria dos dois grupos estarem dentro dos parâmetros de bom prognóstico, o grupo com DRM positiva apresentou, como esperado, maior frequência de pacientes com contagens de leucócitos superiores a 30.000 leucócitos/mm<sup>3</sup> (BASSAN et al., 2004; SHIPLEY; BUTERA, 2009; CORNELL; PALMER, 2012).

Outro fato a ser ressaltado é que, apesar de a mediana da leucometria dos pacientes que entraram em remissão (3.900 leucócitos/mm<sup>3</sup>; Tabela 1) estar dentro dos limites de referência, ela está muito próxima ao limite inferior de normalidade adotado para esse parâmetro pelo Serviço de Análises Clínicas do HU-UFSC (3.800 leucócitos/mm<sup>3</sup>) (LEE et al., 1999). Provavelmente, a baixa contagem de leucócitos se deve ao elevado número de casos de LPA no grupo DRM negativa ( $n=17$ ). Esse subtipo de LMA é, normalmente, de prognóstico favorável e se caracteriza por frequentemente apresentar pancitopenia ao diagnóstico (SWERDLOW et al., 2008; CORNELL; PALMER, 2012).

Da mesma forma que a contagem de leucócitos, a mediana do percentual de blastos ao diagnóstico foi semelhante entre os dois grupos de pacientes (DRM negativa – 58,4% e DRM positiva – 51,8%;  $P>0,05$ ;

Tabela 1). Como mencionado anteriormente, a discriminação morfológica entre os blastos leucêmicos e as células mononucleares atípicas não leucêmicas é difícil, o que implica na utilização da contagem absoluta de leucócitos e não de blastos como fator de prognóstico (BASSAN et al., 2004; SHIPLEY; BUTERA, 2009). Neste estudo, o percentual de blastos ao diagnóstico foi obtido a partir dos resultados da imunofenotipagem, o que eliminou a possibilidade de confusão entre as células mononucleares atípicas e os blastos. No entanto, a imunofenotipagem realizada para o diagnóstico das LAs neste estudo foi qualitativa e não quantitativa. Os métodos qualitativos fornecem apenas contagens celulares relativas, o que impossibilita o cálculo do número absoluto de blastos na amostra e, portanto, diferente da contagem absoluta de leucócitos, não fornece uma verdadeira noção da massa tumoral. Com isso, a utilidade do percentual de blastos ao diagnóstico como parâmetro de prognóstico fica bastante limitada. Dessa forma, é esperado que neste estudo não tenha sido possível estabelecer uma associação entre o percentual de blastos e a resposta ao tratamento.

A LDH é uma enzima intracelular cuja atividade está associada ao metabolismo celular, o que a torna um marcador de proliferação celular e de lesão celular. Assim, o aumento sérico da LDH é o reflexo da grande capacidade proliferativa das células neoplásicas dos portadores de LA e é considerado como um fator de mau prognóstico (VARMA; VARMA, 2008). O presente estudo não encontrou diferença entre as medianas de LDH dos pacientes com DRM negativa e positiva (308,5 U/L e 297,0 U/L, respectivamente;  $P > 0,05$ ; Tabela 1). Quando comparados separadamente, os casos de LMA com DRM negativa e positiva (275,0 U/L e 268,0 U/L, respectivamente;  $P = 0,876$ ) e os de LLA com DRM negativa e positiva (334,5 U/L e 610,0 U/L, respectivamente;  $P = 0,247$ ) também não apresentaram diferenças significativas entre si. Alguns estudos relatam que a elevação da LDH parece estar relacionada com pior sobrevida global, menor taxa de remissão completa, e maior probabilidade de morte prematura e de resistência ao tratamento nos casos de LMAs (KRUG et al., 2010; COLOVIC et al., 2012; DJUNIC et al., 2012b). No entanto, assim como o presente estudo, outros trabalhos também não encontraram associação entre a LDH e o prognóstico dos pacientes com diagnóstico de LMA (DUFOR et al., 2010; SCHELLONGOWSKI et al., 2011). De fato, a relação da LDH com o prognóstico das LMAs não está totalmente estabelecida, e os protocolos de diagnóstico e tratamento destas ainda não incluem a LDH como fator de prognóstico (INCA/MS, 2002b;

SWERDLOW et al., 2008; NCCN, 2012b). Em contrapartida, nas LLAs de modo geral, a elevação da LDH não parece estar relacionada com as taxas de remissão completa (DAMIANI et al., 2002; PLASSCHAERT et al., 2005; RIBERA et al., 2008), mas sim com o risco de infiltração do SNC (BASSAN et al., 2004; NCCN, 2012a) e, mais especificamente nos casos de LLA-T, com a pior sobrevida global (SWERDLOW et al., 2008; BELTRAN et al., 2011). Dessa forma, os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os estudos que reportam que a LDH não influencia na resposta à terapia de indução dos portadores de LMA e LLA (DAMIANI et al., 2002; BASSAN et al., 2004; PLASSCHAERT et al., 2005; RIBERA et al., 2008; DUFOUR et al., 2010; BELTRAN et al., 2011; SCHELLONGOWSKI et al., 2011). No entanto, deve ser ressaltado é que a LDH é um marcador inespecífico de lesão tecidual e pode apresentar-se alterada em diversas situações, como infecções, pancreatite aguda e anemias hemolíticas (VARMA; VARMA, 2008). Muitos dos pacientes incluídos no presente estudo apresentavam doenças concomitantes que poderiam afetar os níveis de LDH, o que pode ter influenciado na análise do impacto da LDH no prognóstico dos pacientes incluídos no presente estudo.

Em relação à presença da *FLT3-DIT*, dos 52 pacientes avaliados quanto à presença desta mutação, somente três (5,8%) apresentaram-na, sendo que, destes, dois (3,9%) receberam o diagnóstico de LMA (um caso de LPA e outro de LMA sem maturação) e um (1,9%) de LLA (LLA-B do tipo comum). A frequência de pacientes com diagnóstico de LLA e portadores de mutação *FLT3-DIT* encontrada no presente estudo está de acordo com o esperado para os casos de LLA, que é de 0% a 10% (KOTTARIDIS et al., 2001; WANG et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012). No entanto, interessantemente, a frequência de *FLT3-DIT* nos casos de LMA é inferior à encontrada em estudos internacionais e nacionais, que relatam uma incidência de *FLT3-DIT* de 12% a 32% nas LMAs (KOTTARIDIS et al., 2001; FROHLING et al., 2002; BENCH; ERBER; SCOTT, 2005; KRUM; YAMAMOTO; CHAUFFAILLE MDE, 2009; CARTER et al., 2012; CHAUHAN et al., 2012). Além disso, a *FLT3-DIT* é comumente associada a t(15;17)(q22;q12) e está presente em aproximadamente 35% dos casos de LPA (FROHLING et al., 2002; THIEDE et al., 2002; BENCH; ERBER; SCOTT, 2005). Isso faz com que essa baixa frequência torne-se ainda mais inusitada, uma vez que das 52 amostras analisadas, 13 eram de pacientes que apresentavam a t(15;17)(q22;q12). Essa baixa incidência de *FLT3-DIT* nos casos de LMA pode estar relacionada a características intrínsecas da população estudada. No entanto, existe a possibilidade de que a

incidência reportada por outros trabalhos esteja superestimada (BAO et al., 2006). Essa superestimação decorre do fato de que muitos desses estudos são retrospectivos e utilizam amostras armazenadas. As amostras armazenadas geralmente pertencem a pacientes que apresentavam leucocitose no momento do diagnóstico e, por isso, possuíam células em quantidade excedente que puderam ser armazenadas. Sabe-se que contagens elevadas de leucócitos no momento do diagnóstico estão associadas com a presença das mutações no gene *FLT3*. Dessa forma, a utilização dessas amostras armazenadas pelos estudos retrospectivos pode ter levado a superestimação das incidências reportadas (KOTTARIDIS et al., 2001; AU et al., 2004; BAO et al., 2006; WANG et al., 2010).

Dos três casos que apresentaram a mutação *FLT3-DIT* (n=3), o paciente com diagnóstico de LLA-B do tipo comum (51 anos) abriu o quadro com importante leucocitose (288.680 leucócitos/mm<sup>3</sup>) e foi a óbito um mês após o diagnóstico sem nunca entrar em remissão. O paciente com diagnóstico de LMA sem maturação (57 anos) também abriu o quadro de LA com contagem de leucócitos elevada (19.310 leucócitos/mm<sup>3</sup>), mas entrou em remissão após a terapia de indução e foi submetido a um transplante alogênico de MO. No entanto, um ano após a seu diagnóstico ele teve recidiva e foi a óbito. O terceiro caso que apresentou *FLT3-DIT* foi o de um paciente portador de LPA (23 anos) que apresentava no momento do diagnóstico leucocitose (44.600 leucócitos/mm<sup>3</sup>), marcadores imunofenotípicos de mau prognóstico (CD34<sup>+/++</sup> e CD2<sup>-/+</sup>) e, na pesquisa da t(15;17)(q22;q12), a isoforma curta (bcr3 – sítio de ponto de quebra 3) da translocação. Esse paciente entrou em remissão após a terapia de indução, mas teve uma recidiva cerca de dois anos após o seu diagnóstico inicial. Ele foi submetido a um novo tratamento quimioterápico e a um transplante autólogo de MO e, até o momento, encontra-se em remissão.

O pequeno número de pacientes com *FLT3-DIT* encontrado no presente estudo impossibilita uma adequada avaliação estatística da relação desta mutação com o prognóstico dos pacientes. Não obstante, a história clínica destes três pacientes condiz com o que é esperado para os casos com presença da *FLT3-DIT*. Trabalhos relatam que a presença da *FLT3-DIT* apresenta pouco impacto na capacidade de atingir remissão completa (KOTTARIDIS et al., 2001; FROHLING et al., 2002; BIENZ et al., 2005), no entanto, sua presença aumenta o risco de recidiva e diminui a sobrevida global dos pacientes (KOTTARIDIS et al., 2001; FROHLING et al., 2002; BIENZ et al., 2005). Além disso, a presença da *FLT3-DIT* nos blastos leucêmicos dos portadores de LA

também se associa com a presença de leucocitose ao diagnóstico (KOTTARIDIS et al., 2001; THIEDE et al., 2002; PENG et al., 2008; WANG et al., 2010). Nos casos de LPA, essa mutação parece relacionar-se com a positividade para os marcadores CD2 e CD34 (ALBANO et al., 2006; TAKENOKUCHI et al., 2012), a presença da isoforma bcr3 (SHIH et al., 2003; CALLENS et al., 2005), a minimização do prognóstico favorável conferido pela presença de t(15;17)(q22;q12) e a menor sobrevida (SCHNITTGER et al., 2002; SHIH et al., 2003; CALLENS et al., 2005; PASCHKA et al., 2006).

Em relação à mutação *FLT3-D835*, dos 49 pacientes avaliados quanto à presença desta, somente quatro (8,2%) apresentaram-na, sendo que todos receberam o diagnóstico de LMA (dois casos de LMA com maturação com t(8;21)(q22;q22), um caso de LPA e outro de leucemia mielomonocítica aguda). Essa frequência está de acordo com o mencionado em outros estudos, que relatam a presença da *FLT3-D835* como rara na população brasileira (LUCENA-ARAÚJO et al., 2010) e pouco comum mundialmente, 3% a 10% dos casos de LMA (KOTTARIDIS et al., 2001; BENCH; ERBER; SCOTT, 2005; GRIMWADE; HILLS, 2009; WANG et al., 2010; CARTER et al., 2012) e 0% a 3% dos de LLA (WANG et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012). Além disso, a *FLT3-D835* apresenta frequência maior nos casos de LPA, em torno de 26% (AKAGI et al., 2009; YAGHMAIE et al., 2012), e é infrequentemente associada a outras anormalidades citogenéticas que não a t(15;17)(q22;q12) (CARE et al., 2003; BAO et al., 2006; BOISSEL et al., 2006). Bao et al. (2006) avaliaram 20 pacientes portadores de LMA com t(8;21)(q22;q22) e não encontraram pacientes com a mutação *FLT3-D835*. Em estudos semelhantes, Boissel et al. (2006) e Care et al. (2003) relataram uma frequência da *FLT3-D835* em LMAs com t(8;21)(q22;q22) de 7,2% (n=56) e 2,1% (n=47), respectivamente. No presente trabalho, a frequência de *FLT3-D835* nos casos de LPA foi inferior (8,4%; n=1/12) à esperada (26%) (AKAGI et al., 2009; YAGHMAIE et al., 2012). No entanto, a frequência nos casos de LMA com maturação com t(8;21)(q22;q22) foi muito superior (66,7%; n=2/3) à relatada por outros trabalhos (CARE et al., 2003; BAO et al., 2006; BOISSEL et al., 2006).

Todos os quatro pacientes que apresentaram a mutação *FLT3-D835* entraram em remissão após a terapia de indução e, até o momento do término deste estudo, apresentavam-se em remissão completa. Dos dois casos de LMA com maturação com t(8;21)(q22;q22), um apresentava significativa leucocitose ao diagnóstico (18 anos; 25.680 leucócitos/mm<sup>3</sup>), enquanto o outro apresentava apenas leve aumento do

número de leucócitos (39 anos; 12.950 leucócitos/mm<sup>3</sup>). O paciente com diagnóstico de leucemia mielomonocítica aguda (76 anos) também apresentou leucocitose ao diagnóstico (35.500 leucócitos/mm<sup>3</sup>), enquanto o com diagnóstico de LPA (41 anos) apresentou leucopenia (2.200 leucócitos/mm<sup>3</sup>), ausência dos marcadores de mau prognóstico CD34 e CD2 e a pesquisa da t(15;17)(q22;q12) evidenciou a presença da isoforma longa (bcr1 – sítio de ponto de quebra 1) da translocação.

Assim como para a análise do *FLT3-DIT*, o pequeno número de pacientes com *FLT3-D835* encontrado no presente estudo impossibilita uma adequada avaliação estatística da relação desta mutação com o prognóstico dos pacientes. De fato, a baixa frequência da *FLT3-D835* tem dificultado a correta avaliação do impacto desta mutação na progressão clínica dos pacientes com diagnóstico de LA (YAMAMOTO et al., 2001; THIEDE et al., 2002; KOTTARIDIS; GALE; LINCH, 2003; WANG et al., 2010). Alguns estudos demonstraram que a *FLT3-D835* influencia negativamente na taxa de remissão, na sobrevida livre de doença e na sobrevida global dos pacientes (FROHLING et al., 2002; MORENO et al., 2003; MEAD et al., 2007; WHITMAN et al., 2008). Outros trabalhos relatam apenas uma tendência de que os pacientes portadores de *FLT3-D835* apresentem taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global menores (YAMAMOTO et al., 2001; THIEDE et al., 2002). Todavia, os dados do presente estudo parecem estar de acordo com alguns outros trabalhos que não conseguiram encontrar relação entre a presença da mutação e a progressão dos pacientes (SHEIKHHA et al., 2003; AU et al., 2004; SANTOS et al., 2011; YAGHMAIE et al., 2012). Outro achado que parece estar de acordo com estudos prévios é a presença de leucocitose ao diagnóstico em todos os casos de *FLT3-D835*, com exceção do paciente com diagnóstico de LPA. Trabalhos demonstraram que a presença de *FLT3-D835* está associada à presença de leucocitose ao diagnóstico em todas as LMAs, exceto nas LPAs, em que a presença da *FLT3-D835* não parece estar associada a qualquer característica do paciente no momento do diagnóstico (THIEDE et al., 2002; SHIH et al., 2003; AU et al., 2004; BAO et al., 2006; YAGHMAIE et al., 2012).

Outra variável avaliada foi a transcrição de *survivina*. Dos 64 pacientes avaliados, seis (9,4%) expressavam *survivina* no momento do diagnóstico. Destes, dois (3,1%) receberam o diagnóstico de LMA (um caso de LMA com maturação e um caso de leucemia monoblástica aguda) e quatro (6,3%) de LLA (dois casos de LLA-B tipo comum e dois casos de LLA-T). Os dois casos de LMA e um de LLA-T morreram em menos de um mês após o diagnóstico. Os demais pacientes

encontram-se, até o momento do término deste trabalho, em remissão completa. A elevada transcrição de *survivina* tem sido relatada em vários subtipos de LA, principalmente as LLAs (ADIDA et al., 2000; KAMIHIRA et al., 2001; CARTER et al., 2003; CHE et al., 2006; GUENOVA et al., 2010; ESH et al., 2011; AHMED et al., 2012; CHAUHAN et al., 2012). No entanto, no presente estudo, apenas um pequeno percentual de pacientes (9,4%) possuía blastos que expressavam *survivina* no momento do diagnóstico. Possivelmente, o pequeno número de pacientes com blastos *survivina* positiva encontrado no presente trabalho deva-se a menor sensibilidade da metodologia empregada, uma vez que a maioria dos outros estudos utilizou a PCR em tempo real (qPCR) para avaliar a transcrição de *survivina*. Entretanto, outro fator que pode ter colaborado para a menor frequência de pacientes com blastos que expressavam *survivina* é a procedência da amostra analisada. Carter et al. (2012) relataram que a *survivina* é expressa mais intensamente nos blastos da MO do que nos circulantes em SP. De forma geral, o diagnóstico de LA pode ser realizado tanto em amostras de SP, quanto de MO. Dessa forma, a escolha da amostra a ser utilizada é realizada pelo médico hematologista e depende, principalmente, do percentual de blastos no SP e das condições clínicas do paciente no momento do diagnóstico (SWERDLOW et al., 2008). No presente trabalho, das 64 amostras analisadas para a transcrição de *survivina*, 31 (48,4%) eram amostras de SP e 33 (51,6%) de MO. Portanto, essa grande quantidade de amostras de SP pode também ter contribuído para a baixa frequência de transcrição de *survivina*.

A presença da *survivina* nas células neoplásicas contribui para o desenvolvimento tumoral (ALLEN et al., 2003; SMALL et al., 2010) e a sua elevada transcrição tem sido reportada como um preditor de prognóstico desfavorável em várias neoplasias hematológicas (ADIDA et al., 2000; SCHLETTE et al., 2004; GUENOVA et al., 2010; ESH et al., 2011; AHMED et al., 2012). Contudo, apesar de estar frequentemente presente nas LAs (ADIDA et al., 2000; KAMIHIRA et al., 2001; CARTER et al., 2003; CHE et al., 2006; GUENOVA et al., 2010; ESH et al., 2011; AHMED et al., 2012; CHAUHAN et al., 2012), o impacto da transcrição de *survivina* neste tipo de neoplasia hematológica continua indefinido. Alguns estudos relatam que a *survivina* prediz um desfecho clínico desfavorável nas LAs (ADIDA et al., 2000; ESH et al., 2011; AHMED et al., 2012), enquanto outros não (CARTER et al., 2003; SUGAHARA et al., 2004; CHAUHAN et al., 2012). No presente estudo, apesar do pequeno número de pacientes avaliados, a transcrição de *survivina* ao diagnóstico não pareceu

relacionar-se à pior resposta ao tratamento ou ao pior prognóstico. Isso porque, dos seis pacientes que expressaram *survivina*, três encontram-se em remissão completa e, dos três que foram a óbito, dois já eram considerados de prognóstico desfavorável independentemente da transcrição de *survivina*, um devido à idade avançada e à presença de leucocitose no momento do diagnóstico (leucemia monoblástica aguda - 70 anos -  $39.550$  leucócitos/mm<sup>3</sup>) e o outro por ser um caso de LLA-T, o qual é um subtipo de LA de difícil tratamento e baixas taxas de remissão e cura (SWERDLOW et al., 2008).

Como já mencionado, a ativação constitutiva de receptores tirosina-cinase devido a mutações como a *JAK2V617F* tem sido observada em diversas neoplasias hematológicas e estudos vêm avaliando o uso da sua detecção como uma possível ferramenta de diagnóstico e prognóstico em portadores de LA (FURITSU et al., 1993; NAKAO et al., 1996; COOLS et al., 2003). Neste trabalho, nenhum paciente apresentou a mutação *JAK2V617F*, o que impossibilitou fazer qualquer tipo de avaliação sobre a importância dessa mutação no prognóstico dos pacientes. Como já ressaltado anteriormente, a *JAK2V617F* não é encontrada em casos de LLA, é infrequente nas LMAs *de novo*, sendo mais comum nas LMAs secundárias à NMP (LEVINE et al., 2005a; FROHLING et al., 2006; EGHTEGAR et al., 2012). Como no presente trabalho apenas um paciente foi diagnosticado com LMA secundária à NMP, a inexistência de amostras positivas para *JAK2V617F* na população estudada é esperada.

Como mencionado anteriormente, as LAs são doenças clinicamente heterogêneas, com diferenças marcantes de sobrevida após a quimioterapia intensiva (SWERDLOW et al., 2008; ABUTALIB; WETZLER; STOCK, 2009; FORAN, 2010). A escolha da terapia é baseada, principalmente, em fatores de prognóstico como a idade, a leucometria e as anormalidades citogenéticas (INCA/MS, 2002b; INCA/MS, 2002a; SWERDLOW et al., 2008; NCCN, 2012b; NCCN, 2012a). Quando analisados conjuntamente, os pacientes deste estudo apresentaram-se como um grupo de bom prognóstico, com mediana de idade inferior a 60 anos (41 anos), leucometria inferior a  $30.000$  leucócitos/mm<sup>3</sup> ( $5.700$  leucócitos/mm<sup>3</sup>), presença de muitos casos com citogenética de risco favorável, como a  $t(15;17)(q22;q12)$  (19 casos) e a  $t(8;21)(q22;q22)$  (três casos), e baixa frequência de mutações genéticas de mau prognóstico, como as mutações no *FLT3* (INCA/MS, 2002b; INCA/MS, 2002a; SWERDLOW et al., 2008; NCCN, 2012b; NCCN, 2012a). Contudo, as chances de cura dos pacientes com LA é dependente, não só desses fatores de prognóstico, mas também das

condições estruturais do serviço oncohematológico responsável pelo diagnóstico e tratamento do indivíduo. Além disso, outro fator que interfere na probabilidade de cura dos portadores de LA é a demora dos pacientes em buscar auxílio médico. Essa demora muitas vezes faz com que no momento que o paciente chegue ao serviço de oncohematologia para ser corretamente diagnosticado e tratado, a doença já se encontre em estágios mais avançados e com menor probabilidade de sucesso no tratamento. Dessa forma, a sobrevida dos pacientes com LA pode ser bastante variável entre os diferentes centros de tratamento.

Estudos internacionais com pacientes adultos com diagnóstico de LMA relatam medianas de sobrevida de 8,3 a 13,0 meses (BIENZ et al., 2005; CRIPE et al., 2010; CARTER et al., 2012; EGHTEDAR et al., 2012), enquanto estudos brasileiros citam sobrevidas de 2,9 a 27,0 meses (PAGNANO et al., 2000; REGO et al., 2003; BITTENCOURT et al., 2008; SANDES et al., 2011; SOUTO FILHO et al., 2011). A mediana de sobrevida dos casos de LMA incluídos no presente trabalho (três meses; Figura 18) é inferior à relatada por outros trabalhos (PAGNANO et al., 2000; REGO et al., 2003; BIENZ et al., 2005; BITTENCOURT et al., 2008; CRIPE et al., 2010; SOUTO FILHO et al., 2011; CARTER et al., 2012; EGHTEDAR et al., 2012), e comparável à sobrevida reportada por Pagnano et al. (2000), que foi de 2,9 meses.

Com relação às LLAs em adultos, a sobrevida relatada em trabalhos internacionais é de 4,7 a 13,0 meses (CANDONI et al., 2006; KANTARJIAN et al., 2010; FADERL et al., 2011; LIEW et al., 2012), enquanto um trabalho brasileiro relatou uma mediana de sobrevida de aproximadamente 25 meses (FOGLIATTO et al., 2002). Contudo, esses trabalhos calcularam as suas medianas de sobrevida sem levar em conta o subtipo de LLA (LLA-B ou LLA-T). De modo geral, as LLAs-T são menos responsivas à quimioterapia do que as LLAs-B, o que faz com que a sobrevida dos pacientes com diagnóstico de LLA-T seja menor do que a dos com LLA-B (SWERDLOW et al., 2008), a junção de todos os casos de LLA em um único grupo pode ter causado uma subestimação da sobrevida dos casos de LLA-B e a uma superestimação da dos casos de LLA-T (CANDONI et al., 2006; KANTARJIAN et al., 2010; FADERL et al., 2011; LIEW et al., 2012). De fato, estudos que avaliaram a mediana de sobrevida dos portadores de LLA-B e LLA-T separadamente reportam sobrevidas superiores a 10 meses nos casos de LLA-B (LUDWIG et al., 1998; CIMINO et al., 2003; GLEISSNER et al., 2005; INTERMESOLI et al., 2011) e inferiores a 12 meses nos de LLA-T (BITTENCOURT et al., 2007; BELTRAN et al., 2011;

GOLDBERG et al., 2013). O presente estudo encontrou medianas de sobrevida semelhantes a essas (LUDWIG et al., 1998; CIMINO et al., 2003; GLEISSNER et al., 2005; BITTENCOURT et al., 2007; BELTRAN et al., 2011; INTERMESOLI et al., 2011; GOLDBERG et al., 2013), 25 meses para os casos de LLA-B e cinco meses para os de LLA-T (Figura 18).

Como já mencionado, as chances de cura dos pacientes com diagnóstico de LA é influenciada por vários fatores, dentre eles a resistência à quimioterapia conferida pela expressão de genes e proteínas MDR (ABUTALIB; WETZLER; STOCK, 2009; SHAFFER et al., 2012). No presente trabalho, foi analisada a expressão dos genes *abcb1* (0,00; 0,00-1,32), *abcc1* (0,78; 0,00-7,35) e *lrp* (0,00; 0,00-1,38) e das proteínas ABCB1 (2,21; 0,00-116,15), ABCC1 (1,14; 0,00-7,54) e LRP (0,59; 0,00-39,93) em amostras de indivíduos com diagnóstico de LA. Como pode ser observado nas Tabelas 2 e 7, houve uma grande variabilidade na intensidade de expressão dos genes e proteínas MDR, sugerindo que os pacientes com diagnóstico de LA não apresentam um perfil *mdr*/MDR padrão (FEDASENKA et al., 2008; CORTEZ et al., 2009; SVIRNOVSKI et al., 2009; EL-SHARNOUBY et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012; SCHEINER et al., 2012).

## 5.2 RELAÇÃO DO PERFIL *mdr*/MDR COM OS FATORES DE PROGNÓSTICO

### 5.2.1 Relação do Perfil de Expressão de *abcb1*/ABCB1 com os Fatores de Prognóstico

A análise da associação entre a expressão *abcb1*/ABCB1 e os fatores de prognóstico mostrou que os pacientes com diagnóstico de LA e DRM negativa após a fase de indução da quimioterapia apresentaram apenas uma correlação moderada entre a expressão da proteína ABCB1 e a atividade da LDH ( $P=0,001$ ;  $R^2=0,577$ ; Tabela 8), enquanto que os indivíduos com diagnóstico de LLA-B com DRM negativa apresentaram forte correlação entre esses dois parâmetros ( $P=0,007$ ;  $R^2=0,929$ ; Tabela 8). Esse achado permite sugerir que a correlação encontrada no grupo de pacientes com diagnóstico de LA e DRM negativa é o reflexo da presença dos casos de LLA-B nesse grupo.

Diferente do observado no presente estudo, Damiani et al. (2002) não encontraram associação entre a expressão de ABCB1 e a LDH em indivíduos adultos com diagnóstico de LLA ( $n=95$ ). Uma possível explicação para a divergência entre os resultados de Damiani et al.

(2002) e os do presente trabalho é que, em sua análise, Damiani et al. (2002) optaram por expressar os resultados de ABCB1 e LDH de forma dicotômica (positivo/negativo e baixo/elevado, respectivamente), o que implica na utilização de métodos estatísticos diferentes dos empregados neste estudo. Além disso, Rao et al. (2010) demonstraram que determinados polimorfismos do gene *abcb1* estão associados com concentrações mais elevadas de LDH (RAO et al., 2010). Desta forma, outra possível explicação para o desacordo entre os resultados de Damiani et al. (2002) e os do presente trabalho seria a diferença na frequência de determinados polimorfismos nas duas populações estudadas.

Ainda em relação à expressão de *abcb1*/ABCB1 e sua relação com os fatores de prognóstico, verificou-se que houve forte correlação entre a transcrição de *abcb1* e a maior contagem de leucócitos nas LLAs-T ( $P=0,007$ ;  $R^2=0,967$ ; Tabela 9) e que essa correlação também foi significativa nos pacientes que não apresentavam DRM após a terapia de indução ( $P=0,030$ ;  $R^2=0,970$ ; Tabela 9). Essa mesma associação não foi encontrada para a expressão da proteína ABCB1 ( $P>0,05$ ; Tabela 8). De forma semelhante ao presente estudo, dois outros trabalhos que avaliaram a expressão fenotípica de ABCB1 em portadores adultos de LLA não encontraram associação entre esses dois parâmetros (TAFURI et al., 2002; ELSAYED; ISMAIL; MONEER, 2011). Contudo, Damiani et al. (2002) encontraram resultados diferentes. Em seu estudo, eles relataram a presença de uma associação diretamente proporcional entre a expressão de ABCB1 e a leucometria em indivíduos adultos com diagnóstico de LLA ( $n=95$ ) (DAMIANI et al., 2002). Chauhan et al. (2012) reportaram resultados diferentes do presente trabalho. Em seu estudo, eles verificaram que pacientes adultos com diagnóstico de LLA ( $n=30$ ) apresentavam associação inversamente proporcional entre a leucometria e a transcrição da *abcb1* (CHAUHAN et al., 2012). Entretanto, é importante ressaltar que tanto Damiani et al. (2002) quanto Chauhan et al. (2012) consideraram os pacientes com diagnóstico de LLA-B e de LLA-T como um único grupo, o que pode ter propiciado a diferença entre o resultado encontrado por eles e pelo presente trabalho. Infelizmente, não foram encontrados trabalhos que avaliassem a correlação entre a expressão de *abcb1*/ABCB1 e a leucometria exclusivamente em casos de LLA-T. Além disso, é importante ressaltar que o presente estudo analisou as amostras de apenas cinco pacientes com diagnóstico de LLA-T. Essa pequena amostragem pode ser considerado um fator limitante e ter influenciado na confiabilidade da análise estatística.

### 5.2.2 Relação do Perfil de Expressão de *abcc1*/ABCC1 com os Fatores de Prognóstico

A análise da expressão de *abcc1*/ABCC1 revelou várias associações entre a expressão desses e os fatores de prognóstico (Tabelas 4 e 9). Nos indivíduos com diagnóstico de LA, a maior transcrição de *abcc1* associou-se com a presença do marcador CD34 nos blastos leucêmicos ( $P=0,006$ ). Essa mesma associação foi encontrada para o grupo LA com DRM negativa ( $P=0,007$ ). Quando os pacientes foram divididos segundo o diagnóstico diferencial, nenhum grupo apresentou associação significativa entre a transcrição de *abcc1* e a presença do marcador CD34. No entanto, os pacientes com diagnóstico de LPA apresentaram uma tendência de associação entre esses dois parâmetros ( $P=0,055$ ). Esse achado sugere que a associação significativa encontrada para o grupo LA deve-se, em parte, a presença dos casos de LPA no grupo. De fato, estudos que analisaram a transcrição de *abcc1* em pacientes adultos com diagnóstico de LMA ou LLA também não encontraram relação entre a transcrição desse gene e a presença do marcador CD34 (KAKIHARA et al., 1999; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; CHAUHAN et al., 2012; MAHJOUBI; AKBARI, 2012). Infelizmente, não foram encontrados outros estudos que tenham avaliado especificamente a transcrição gênica de *abcc1* em pacientes com diagnóstico de LPA. Portanto, para confirmar se essa tendência de associação entre *abcc1* e presença do marcador CD34 nos portadores de LPA vai se tornar significativa ou não, são necessários estudos com um número maior de pacientes.

Ao avaliar-se a expressão de *abcc1*/ABCC1 nos portadores de LMA, encontrou-se uma correlação diretamente proporcional entre a transcrição do gene e a idade no grupo que não entrou em remissão após a terapia de indução ( $P=0,029$ ;  $R^2=0,718$ ; Tabela 4). Como já mencionado, pacientes idosos comumente superexpressam genes e proteínas de resistência (BORG et al., 1998; LEITH et al., 1999; FERRARA; PALMIERI; LEONI, 2008; KUENDGEN; GERMING, 2009). No entanto, estudos que avaliaram especificamente a transcrição de *abcc1* não conseguiram encontrar relação entre a sua transcrição e a idade dos pacientes, o que sugere que a transcrição de *abcc1* não influenciaria na pior resposta à quimioterapia de indução nos pacientes idosos (LEITH et al., 1999; SCHAICH et al., 2005; MAHJOUBI et al., 2008; CHAUHAN et al., 2012). De fato, como será posteriormente comentado, o presente estudo também não encontrou relação entre a transcrição de *abcc1* e a resposta à terapia de indução nos portadores de

LMA (Tabela 2). Contudo, é importante ressaltar que os pacientes idosos são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da quimioterapia, o que muitas vezes impossibilita aos clínicos indicarem doses intensivas de quimioterápicos, o que, conseqüentemente, aumenta o risco de surgimento de resistência ao tratamento devido à indução da superexpressão de genes de resistência (LEITH et al., 1999; BUCHNER et al., 2009; ESTEY, 2009; KRUG et al., 2011). Dessa forma, os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que os pacientes mais idosos estão mais susceptíveis a desenvolver a resistência induzida pela quimioterapia, pois, desde o momento do diagnóstico, já expressam mais *abcc1*.

Em relação ao grupo de pacientes com diagnóstico de LPA, aqueles que entraram em remissão após a terapia de indução apresentaram correlação entre a transcrição de *abcc1* e o percentual de promielócitos neoplásicos ao diagnóstico ( $P=0,019$ ;  $R^2=0,639$ ; Tabela 4), e entre a expressão da proteína ABCC1 e a LDH ( $P=0,018$ ;  $R^2=0,695$ ; Tabela 9). Não foram encontrados trabalhos que tenham avaliado a transcrição de *abcc1* exclusivamente em pacientes com LPA. Além disso, foram achados apenas três estudos que tenham avaliado a expressão fenotípica de ABCC1 nas LPAs (MICHIELI et al., 2000; CANDONI et al., 2003; DAMIANI et al., 2004). Ainda, nenhum desses estudos analisou a relação da ABCC1 com o percentual de blastos ou a atividade da LDH (MICHIELI et al., 2000; CANDONI et al., 2003; DAMIANI et al., 2004). Dessa forma, não foi possível realizar uma comparação de resultados.

A avaliação da expressão de *abcc1*/ABCC1 em portadores de LLA-B demonstrou forte correlação entre a transcrição de *abcc1* e a atividade da LDH nos pacientes que apresentaram DRM após a terapia de indução ( $P=0,017$ ;  $R^2=0,983$ ; Tabela 4). Além disso, também ocorreu uma correlação inversamente proporcional entre a expressão da proteína ABCC1 e a leucometria no momento do diagnóstico nos pacientes que não entraram em remissão ( $P=0,006$ ;  $R^2=-1,000$ ; Tabela 9). Ao contrário do que foi observado pelo presente trabalho, outros estudos não encontraram relação significativa entre a expressão *abcc1*/ABCC1 e a LDH (PALL et al., 1997; DAMIANI et al., 2002; PLASSCHAERT et al., 2005; EL-SHARNOUBY et al., 2010) ou a leucometria (PALL et al., 1997; DAMIANI et al., 2002; PLASSCHAERT et al., 2005; MAHJOUBI et al., 2008; CORTEZ et al., 2009; EL-SHARNOUBY et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012). No entanto, todos esses estudos avaliaram pacientes com diagnóstico de LLA-B e LLA-T conjuntamente, o que pode ter contribuído para a diferença entre os

resultados observados por eles e pelo presente trabalho (PALL et al., 1997; DAMIANI et al., 2002; PLASSCHAERT et al., 2005; MAHJOUBI et al., 2008; CORTEZ et al., 2009; EL-SHARNOUBY et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012). Interessantemente, Plasschaert et al. (2005) relataram uma correlação inversamente proporcional entre a leucometria e a transcrição de *abcc3*, *abcc4* e *abcc6*, mas não a de *abcc1* (n=189). No entanto, assim como no presente estudo, Plasschaert et al. (2005) também não encontraram explicação para essa correlação inversa.

### 5.2.3 Relação do Perfil de Expressão de *lrp*/LRP com os Fatores de Prognóstico

A análise da relação entre a expressão de *lrp*/LRP e os fatores de prognóstico revelou que os portadores de LA apresentam uma associação entre a maior transcrição de *lrp* e a ausência do marcador CD56 nas células neoplásicas (P=0,029; Tabela 5). Essa mesma associação não foi encontrada com a expressão da proteína LRP (P>0,05; Tabela 10). O antígeno CD56 é uma molécula de adesão de células neurais. Ele foi inicialmente descrito como um marcador de linfócitos *natural killer*, mas, subsequentemente, verificou-se que ele era expresso em várias neoplasias hematopoiéticas. Atualmente, estudos têm relatado que a presença do CD56 em células leucêmicas influencia negativamente na duração de remissão completa e na sobrevida dos pacientes com LA (RASPADORI et al., 2001; SUVANNASANKHA et al., 2004; TIFTIK et al., 2004; SWERDLOW et al., 2008; MONTESINOS et al., 2011; DJUNIC et al., 2012a). Não foram encontrados trabalhos que avaliassem especificamente a associação entre a transcrição de *lrp* e a presença do marcador CD56. Encontrou-se um estudo que avaliou a relação entre a expressão da proteína LRP e a presença do marcador CD56 em portadores de LMA. Nesse trabalho, assim como no presente estudo, não foi observada associação entre a transcrição de LRP e o marcador CD56 (SUVANNASANKHA et al., 2004). Outro fato interessante é que, no presente estudo, a associação entre a transcrição de *lrp* e a ausência do marcador CD56 também foi encontrada no grupo de pacientes com diagnóstico de LA que não apresentou DRM (P=0,043; Tabela 5). Esses dados sugerem que nos pacientes com diagnóstico de LA, a ausência do antígeno CD56 como um fator de bom prognóstico é mais importante do que a elevada transcrição de *lrp* é como um fator de mau prognóstico.

A maior transcrição de *lrp* também está associada com a ausência de transcrição de *survivina* no grupo de pacientes com diagnóstico de LA e de LMA (P=0,029 e P=0,040, respectivamente; Tabela 5). Chauhan et al. (2012) avaliaram a relação entre a transcrição de *lrp* e de *survivina* em pacientes com diagnóstico de LA e não encontraram relação entre essas duas variáveis tanto nos pacientes com diagnóstico de LMA (n=30), quanto nos com diagnóstico de LLA (n=30). Uma possível razão para essa divergência de resultado é que Chauhan et al. (2012) apresentaram a transcrição de *survivina* como uma variável contínua e não uma qualitativa (positivo/negativo) como foi o caso do presente trabalho. Além disso, é importante ressaltar que, apesar dos resultados de Chauhan et al. (2012) não terem sido significativos, as correlações calculadas por eles apresentaram sinais negativos, demonstrando que, no estudo deles, também houve uma maior transcrição de *lrp* nos indivíduos que menos expressavam *survivina*, resultado semelhante ao observado neste trabalho.

Em relação à expressão da proteína LRP, foi observada correlação inversamente proporcional entre a expressão dessa proteína e o percentual de promielócitos leucêmicos nos pacientes com diagnóstico de LPA (P=0,001;  $R^2=-0,924$ ; Tabela 10). Essa mesma correlação foi constatada para os pacientes com diagnóstico de LPA e que não apresentaram DRM (P=0,009;  $R^2=-0,880$ ; Tabela 10). Como mencionado anteriormente, não foram encontrados estudos que correlacionassem a expressão de *lrp*/LRP com outros fatores de prognóstico em pacientes com diagnóstico de LPA (MICHIELI et al., 2000; CANDONI et al., 2003; DAMIANI et al., 2004), o que impossibilitou que os resultados encontrados no presente estudo fossem comparados com outros trabalhos. No entanto, é interessante observar que a presença da maior expressão de LRP não suprimiu a influência favorável de um fator de bom prognóstico, que no caso, foi o baixo percentual de promielócitos (SWERDLOW et al., 2008) na resposta à terapia de indução.

Nos indivíduos com diagnóstico de LLA-B, foi observada uma associação entre a maior expressão de LRP e a presença da t(9;22)(q34;q11.2) (P=0,012; Tabela 10). Ramakers-Van Woerden et al. (2002) também verificaram se existia relação entre a presença da t(9;22)(q34;q11.2) e a expressão das proteínas ABCB1, ABCC1 e LRP; e, assim como neste trabalho, eles observaram associação significativa apenas entre a presença da translocação e a expressão de LRP. Esses achados sugerem que a maior expressão de LRP seja responsável, em parte, pela pior resposta ao tratamento apresentada pelos pacientes

portadores de LLA-B com t(9;22)(q34;q11.2) (RAMAKERS-VAN WOERDEN et al., 2002). Além disso, os pacientes portadores de LLA-B também apresentaram uma correlação positiva entre a expressão de LRP e a leucometria, tanto nos pacientes que entraram em remissão ( $P=0,001$ ;  $R^2=0,970$ ), quanto nos que não entraram ( $P=0,029$ ;  $R^2=0,999$ ; Tabela 10). Essa mesma correlação não foi observada para a transcrição do gene *lrp*. Outros estudos que avaliaram a relação entre o nível de transcrição de *lrp* e a leucometria também não encontraram correlação entre esses dois parâmetros em portadores de LLA (KOURTI et al., 2007; CORTEZ et al., 2009; EL-SHARNOUBY et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012). Não foram encontrados estudos que tivessem relacionado especificamente a expressão da proteína LRP com a leucometria.

### 5.3 RELAÇÃO DO PERFIL *mdr*/MDR COM O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DOS PACIENTES

Foi observada associação entre a maior expressão de LRP e o diagnóstico de LMA ( $P=0,025$ ). Izquierdo et al. (1996b) avaliaram a expressão de LRP em 61 linhagens de tumor humano e constataram que a LRP é pouco expressa nas células de linhagem de LA humana. No entanto, das cinco linhagens de LAs humana avaliadas, apenas a HL-60 (linhagem de LPA de origem humana) expressou fracamente LRP. As demais linhagens de LA analisadas, uma de leucemia mieloide crônica agudizada (K562) e três de LLA-T (CEM, MOLT-4 e SR), não expressaram LRP em qualquer intensidade (IZQUIERDO et al., 1996b). Em um estudo em crianças com diagnóstico de LA ( $n=168$ ), den Boer et al. (1998) verificaram que as crianças com diagnóstico de LMA expressavam, aproximadamente, duas vezes mais LRP do que as com diagnóstico de LLA. Além disso, outros trabalhos verificaram que, dentre os subtipos de LMA, a leucemia mielomonocítica aguda, a leucemia monoblástica aguda e a leucemia monocítica aguda são as que mais expressam LRP (LEITH et al., 1999; SUNNARAM et al., 2003), enquanto a LMA promielocítica com t(15;17)(q22;q12) é a que menos expressa (LEITH et al., 1999). Dessa forma, a associação entre a expressão de LRP e o diagnóstico de LMA encontrada no presente estudo pode ter sido propiciada pelo elevado percentual de pacientes com diagnóstico de leucemia mielomonocítica aguda, de leucemia monoblástica aguda ou de leucemia monocítica aguda (38,9%;  $n=7/18$ ) presentes na amostragem.

Além disso, é importante ressaltar que a relação encontrada entre o diagnóstico de LMA e a expressão da proteína LRP não foi observada para a transcrição do gene *lrp*. Chauhan et al. (2012) também avaliaram a transcrição gênica da *lrp* em portadores de LMA e LLA e não encontraram diferenças de transcrição entre esses dois grupos de pacientes (n=30 em ambos os grupos).

## 5.4 RELAÇÃO DO PERFIL *mdr*/MDR COM A RESPOSTA À TERAPIA DE INDUÇÃO

### 5.4.1 Relação do Perfil de Expressão de *abcb1*/ABCB1 com a Resposta à Terapia de Indução

O presente trabalho encontrou associação entre a maior transcrição de *abcb1* e a ausência de resposta completa à terapia de indução nos pacientes com diagnóstico de LA (P=0,004; Tabela 2). Essa associação provavelmente decorre da presença das LMAs neste grupo. De fato, o único grupo de pacientes com DRM positiva que apresentou uma mediana de transcrição de *abcb1* no momento do diagnóstico diferente de zero foi o dos pacientes com diagnóstico de LMA (*abcb1*=0,60; Tabela 2). Outro achado interessante, e que pode parecer incongruente, é a existência de uma diferença significativa entre os grupos DRM negativa e positiva nas LAs, uma vez que ambos apresentam medianas de transcrição de *abcb1* iguais à zero. Contudo, é importante ressaltar que os dados deste trabalho não são paramétricos e, por isso, o teste estatístico aplicado (Mann-Whitney U) também não é paramétrico. Os testes não paramétricos, diferentemente dos paramétricos, se baseiam na comparação da soma dos postos e não na comparação das médias. Dessa forma, apesar dos dois grupos terem em 50% ou mais dos casos a transcrição de *abcb1* de 0,00 (mediana), quando este gene é expresso, ele é mais transcrito no grupo DRM positiva, fazendo com que esse grupo tenha uma soma de postos maior e, portanto, significativamente diferente da soma dos postos do grupo negativo para DRM.

Ainda em relação à análise da transcrição de *abcb1*, observou-se que os indivíduos com diagnóstico de LMA que entraram em remissão apresentaram, no momento do diagnóstico, uma transcrição de *abcb1* significativamente menor do que os que não responderam à terapia de indução (P=0,005; Tabela 2). Curiosamente, não foi observada essa mesma associação entre a expressão da proteína ABCB1 e a resposta à

terapia de indução (Tabela 7). Também não houve diferença significativa na expressão de *abcb1*/ABCB1 entre os grupos DRM negativa e positiva com diagnóstico de LLA ( $P>0,05$ ; Tabelas 2 e 7). Resultados semelhantes foram descritos em outros trabalhos (WUCHTER et al., 2000; VITALE et al., 2006; CHAUHAN et al., 2012; SCHEINER et al., 2012). Chauhan et al. (2012) relataram que os portadores de LMA ( $n=30$ ) que não respondiam à terapia de indução apresentavam uma transcrição de *abcb1* significativamente maior do que aqueles que entravam em remissão completa após a indução. Além disso, esse mesmo estudo verificou que, nos casos de LLA ( $n=30$ ), não havia diferença de transcrição entre os pacientes que entraram em remissão e os que não entraram após a terapia de indução (CHAUHAN et al., 2012). Wuchter et al. (2000) e Scheiner et al. (2012) avaliaram a expressão da proteína ABCB1 em 121 e em 109 pacientes adultos com diagnóstico de LMA, respectivamente, e, como no presente trabalho, não encontraram relação entre a expressão de ABCB1 e a remissão completa. Do mesmo modo, estudos que avaliaram a expressão da proteína ABCB1 em portadores de LLA não encontraram correlação entre a sua expressão e a remissão completa (DAMIANI et al., 2002; VITALE et al., 2006).

O valor prognóstico da expressão de *abcb1*/ABCB1 nas LMAs está muito bem definido (CORNELL; PALMER, 2012; SHAFFER et al., 2012) e a análise da sua expressão nessas neoplasias é recomendada pela OMS e pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) (INCA/MS, 2002b; SWERDLOW et al., 2008; CORNELL; PALMER, 2012). Contudo, essa mesma recomendação não é estendida para os casos de LLA (INCA/MS, 2002a; SWERDLOW et al., 2008; CORNELL; PALMER, 2012). Como pode ser observado, os dados encontrados neste trabalho corroboram as recomendações propostas por essas duas instituições (INCA/MS, 2002b; INCA/MS, 2002a; SWERDLOW et al., 2008). Não obstante, um fato relevante é que essas mesmas instituições não sugerem qual metodologia deve ser utilizada, ou seja, não existe um consenso se deve ser realizada a avaliação da transcrição gênica ou da expressão fenotípica de ABCB1 (WUCHTER et al., 2000; INCA/MS, 2002b; VALERA et al., 2004; SWERDLOW et al., 2008; CHAUHAN et al., 2012; DE MORAES et al., 2012; SCHEINER et al., 2012; DE MORAES et al., 2013). No que se refere à influência da *abcb1*/ABCB1 na resposta à quimioterapia de indução, os resultados obtidos neste estudo indicam que a análise da transcrição gênica da *abcb1* forneceria uma informação de prognóstico melhor do que a expressão fenotípica. No entanto, é importante ressaltar que estudos já demonstraram que não

só a transcrição de *abcb1*, mas também a atividade da proteína, está relacionada com o prognóstico dos portadores de LA (TSIMBERIDOU et al., 2002; MAHADEVAN; LIST, 2004; LOURENCO et al., 2008; SHIPLEY; BUTERA, 2009; HIRSCH et al., 2012). Dessa forma, seria interessante a realização de estudos que avaliassem concomitantemente a transcrição de *abcb1* e a sua atividade, a fim de avaliar qual desses dois parâmetros teria maior impacto no prognóstico dos portadores de LA.

#### **5.4.2 Relação do Perfil de Expressão de *abcc1*/ABCC1 com a Resposta à Terapia de Indução**

Em relação à expressão da *abcc1*/ABCC1, o presente trabalho verificou que houve uma maior expressão da proteína ABCC1 no grupo de pacientes com diagnóstico de LMA que não entrou em remissão ( $P=0,017$ ; Tabela 7) e que essa mesma associação não foi observada para a transcrição de *abcc1* (Tabela 2). Estudos que avaliaram o impacto da expressão de *abcc1*/ABCC1 no prognóstico dos pacientes com diagnóstico de LMA apresentaram resultados controversos (BORG et al., 1998; LEGRAND et al., 1998; LEITH et al., 1999; VAN DER KOLK et al., 2000; LAUPEZE et al., 2002; TSIMBERIDOU et al., 2002; SCHAICH et al., 2005; MAHJoubi et al., 2008; ADVANI et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012). Enquanto trabalhos relatam que a alta expressão de *abcc1*/ABCC1 influencia na resposta clínica dos pacientes com diagnóstico de LMA (SCHNEIDER et al., 1995; SCHAICH et al., 2005; MAHJoubi et al., 2008), outros autores não encontraram tal relação (BORG et al., 1998; LEITH et al., 1999; TSIMBERIDOU et al., 2002; ADVANI et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012). Mahjoubi et al. (2008) relataram que pacientes com diagnóstico de LMA que entraram em remissão completa após a terapia de indução expressaram menos *abcc1* do que os que não entraram em remissão ( $n=35$ ). De modo contrário, Chauhan et al. (2012) não encontraram diferença significativa entre os níveis de transcrição de *abcc1* nos pacientes que entraram em remissão e os que não responderam completamente à quimioterapia de indução ( $n=30$ ). Não foram encontrados trabalhos que, assim como o presente estudo, reportassem alguma relação entre remissão completa após a terapia de indução e a expressão da proteína ABCC1 (BORG et al., 1998; LEGRAND et al., 1998; LEITH et al., 1999; TSIMBERIDOU et al., 2002; ADVANI et al., 2010). Por fim, os resultados aqui encontrados sugerem que a elevada expressão de ABCC1, no momento do diagnóstico, pode ter um valor de mau prognóstico nos portadores de

LMA. No entanto, é importante ressaltar que o número de pacientes com diagnóstico de LMA avaliados neste estudo é pequeno (n=18) e seria interessante aumentar a amostragem para confirmar os resultados observados neste trabalho.

#### **5.4.3 Relação do Perfil de Expressão de *lrp*/LRP com a Resposta à Terapia de Indução**

No que se refere à análise da expressão de *lrp*/LRP, o presente estudo não encontrou diferenças significativas entre o grupo de pacientes com DRM negativa e positiva (Tabelas 2 e 7). Assim como para a *abcc1*/ABCC1, os estudos que avaliaram a influência dos níveis de expressão de *lrp*/LRP no prognóstico de indivíduos com diagnóstico de LA apresentam resultados controversos (BORG et al., 1998; DEN BOER et al., 1998; MICHIELI et al., 1999; DAMIANI et al., 2002; TSIMBERIDOU et al., 2002; VALERA et al., 2004; HUH et al., 2006; KOURTI et al., 2007; STYCZYNSKI et al., 2007; YASUNAMI et al., 2007; FEDASENKA et al., 2008; CORTEZ et al., 2009; ADVANI et al., 2010; EL-SHARNOUBY et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012). Estudos que avaliaram tanto a transcrição do gene *lrp* (HUH et al., 2006; YASUNAMI et al., 2007), quanto a expressão da sua proteína (BORG et al., 1998; YASUNAMI et al., 2007) em pacientes adultos com diagnóstico de LA encontraram associação entre a *lrp*/LRP e a presença de resistência à quimioterapia de indução, a menor sobrevida livre de doença e a menor sobrevida global. No entanto, outros trabalhos encontraram resultados semelhantes ao do presente estudo, ou seja, não encontraram qualquer relação entre a expressão genotípica (ADVANI et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012) ou fenotípica (MICHIELI et al., 1999; DAMIANI et al., 2002; TSIMBERIDOU et al., 2002) de LRP e o prognóstico de pacientes com diagnóstico de LA. Essa divergência de resultados pode ser explicada por variações étnicas, demográficas ou metodológicas (VALERA et al., 2004)

#### **5.5 RELAÇÃO DO PERFIL *mdr*/MDR COM A OCORRÊNCIA DE ÓBITOS**

Apesar de o presente estudo ter encontrado várias associações entre a expressão dos genes e proteínas de resistência e os fatores de prognóstico dos pacientes com diagnóstico de LA, não foi encontrada relação entre a expressão de *abcb1*/ABCB1, *abcc1*/ABCC1 e *lrp*/LRP e a ocorrência de óbitos. Esses resultados corroboram os de outros estudos

que também não foram capazes de relacionar a taxa de óbito com o perfil *mdr*/MDR (FILIPITS et al., 1998; DHOOGHE et al., 1999; DAMIANI et al., 2002; DE MOERLOOSE et al., 2003; VAN GROTEL et al., 2008; CORTEZ et al., 2009). Dessa forma, é possível sugerir que, apesar da expressão dos genes e proteínas MDR relacionar-se com fatores de prognóstico e influenciarem na probabilidade de atingir remissão completa nos pacientes com diagnóstico de LA (VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; EL-SHARNOUBY et al., 2010; PALLIS et al., 2011; CHAUHAN et al., 2012; HIRSCH et al., 2012), essa expressão não está relacionada com a ocorrência de óbitos (FILIPITS et al., 1998; DHOOGHE et al., 1999; DAMIANI et al., 2002; DE MOERLOOSE et al., 2003; VAN GROTEL et al., 2008; CORTEZ et al., 2009).

## 5.6 O PERFIL *mdr*/MDR COMO FERRAMENTA DE DETECÇÃO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA

Como mencionado anteriormente, a resposta do paciente à terapia de indução é considerada, se não o mais importante, um dos mais importantes fatores de prognóstico dos pacientes com LA (DWORZAK et al., 2002; SWERDLOW et al., 2008; NCCN, 2012b; NCCN, 2012a). Por isso, cada vez mais, métodos para avaliar a resposta do paciente à quimioterapia têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados (KERN et al., 2005; WEISSER et al., 2005a; WEISSER et al., 2005b; ABDELHAMID et al., 2012). Neste estudo, foi avaliado se a expressão dos genes e proteínas MDR poderia ser utilizada como marcador de resposta ao tratamento (Tabelas 6 e 11). Como pode ser observado na Tabela 6, houve diminuição significativa na transcrição de *abcc1* após a terapia de indução no total de casos de LMA (P=0,016). No entanto, essa diferença não foi observada quando os pacientes foram divididos quanto a sua resposta ao tratamento (DRM positiva e DRM negativa). Sendo assim, a transcrição de *abcc1* não pode ser utilizada como um marcador de DRM.

Além disso, houve um aumento significativo na expressão de LRP após o tratamento nos pacientes com LPA (P=0,012; Tabela 11). Curiosamente, esse mesmo aumento foi encontrado nos pacientes com diagnóstico de LPA que entraram em remissão após o tratamento (P=0,012; Tabela 11), o que sugere que o aumento da expressão de LRP induzido pelo tratamento não influenciou na probabilidade do paciente atingir remissão completa. Estudos *in vitro* demonstraram que o trióxido de arsênio, o fármaco de escolha para o tratamento dos pacientes com

diagnóstico de LPA, é capaz de contornar a resistência à quimioterapia proporcionada pela superexpressão de ABCB1 e ABCC1 (SEO et al., 2005; DIAZ et al., 2008; SERTEL et al., 2012). Não foram encontrados estudos que avaliassem a capacidade citotóxica do trióxido de arsênio frente a células de linhagem que superexpressassem LRP. No entanto, os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que o trióxido de arsênio também seja capaz de contornar a resistência à quimioterapia que ocorre devido à elevada expressão de LRP.

Apesar desse achado, o presente estudo não foi capaz de verificar se a expressão de LRP poderia ser utilizada como uma ferramenta de detecção de DRM. Isso se deve ao fato de que apenas um caso de LPA não entrou em remissão após a terapia de indução. Dessa forma, não foi possível verificar se esse aumento da expressão de LRP é exclusivo dos pacientes que entraram em remissão ou não.

Não foram encontrados outros estudos que avaliassem o perfil *mdr*/MDR antes e após a terapia de indução em indivíduos com diagnóstico de LA. No entanto, foi encontrado um estudo que analisou a transcrição de *abcb1* e *lrp* antes e após a quimioterapia em portadores de mieloma múltiplo (NAKAGAWA et al., 2006). Nesse trabalho, Nakagawa et al. (2006) verificaram que as expressões *abcb1* e *lrp* tendem a aumentar após a quimioterapia. Adicionalmente, outros trabalhos demonstraram que pacientes que apresentam recidiva após a quimioterapia apresentam expressão mais elevada dos genes e proteínas MDR do que aqueles que se mantêm em remissão completa (DEN BOER et al., 1998; MICHIELI et al., 2000; CANDONI et al., 2003; DAMIANI et al., 2004; PLASSCHAERT et al., 2005). Esses dados sugerem que o perfil *mdr*/MDR possa ser utilizado como um marcador de DRM e recidiva. No entanto, estudos com um número maior de pacientes se fazem necessários para confirmar essa hipótese.

## 5.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como pôde ser visto, nos últimos anos, vários grupos de pesquisa têm investigado a associação entre o fenótipo MDR e o prognóstico dos pacientes com diagnóstico de LA, encontrando resultados contraditórios (SAMDANI et al., 1996; LEITH et al., 1999; MICHIELI et al., 1999; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; SHMAN et al., 2008; CORTEZ et al., 2009; EL-SHARNOUBY et al., 2010; ELSAYED; ISMAIL; MONEER, 2011; CHAUHAN et al., 2012). Enquanto alguns trabalhos encontraram correlação entre a expressão dos genes ou proteínas MDR e a idade, o diagnóstico, a contagem de leucócitos, a

expressão de CD34 e a resposta à terapia (SAMDANI et al., 1996; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; SHMAN et al., 2008; EL-SHARNOUBY et al., 2010; PALLIS et al., 2011; CHAUHAN et al., 2012), outros não encontraram essas mesmas relações (LEITH et al., 1999; MICHIELI et al., 1999; CORTEZ et al., 2009; ROCKOVA et al., 2011; MAHJOUBI; AKBARI, 2012). Essa grande divergência de resultados pode ser explicada por variações étnicas, demográficas, mas, principalmente, por diferenças metodológicas (VALERA et al., 2004). Um exemplo desse fato são os resultados encontrados por van den Heuvel-Eibrink et al. (2007), por Samdani et al. (1996), por Michieli et al. (1999) e pelo presente estudo. Ao avaliar a transcrição de *abcb1* por RT-PCR, Heuvel-Eibrink et al. (2007) encontraram associação positiva entre a transcrição de *abcb1* e a presença do marcador CD34 nos blastos leucêmicos, mas não conseguiram estabelecer uma correlação entre a transcrição do gene e a idade dos pacientes. Alternativamente, ao avaliarem a expressão da proteína ABCB1 por citometria de fluxo, Samdani et al. (1996) relataram uma associação dessa com a idade dos pacientes e com a expressão de CD34. Em seu estudo, Michieli et al. (1999) utilizaram uma metodologia para a detecção de ABCB1 semelhante à empregada por Samdani et al. (1996), mas diferiram quanto aos critérios de determinação de superexpressão, o que fez com que eles não encontrassem qualquer associação entre a expressão da proteína ABCB1 e a idade dos pacientes ou expressão de CD34 nas células neoplásicas. Outro exemplo que pode ser citado é o dos resultados encontrados por Dhooge et al. (1999) e Wutcher et al. (2000). Enquanto o trabalho de Dhooge et al. (1999) demonstrou a existência de uma forte correlação entre a expressão da proteína ABCB1 detectada por imunohistoquímica e o curso clínico desfavorável da LLA, Wutcher et al. (2000) obtiveram resultados contrários ao utilizar a citometria de fluxo para avaliar a expressão da proteína. No entanto, esses estudos foram realizados em populações de diferentes origens étnicas e sócio-econômicas, o que permitiria supor que as diferenças nos resultados encontrados seriam de origem demográfica e não metodológica (SAMDANI et al., 1996; DHOOGHE et al., 1999; MICHIELI et al., 1999; WUCHTER et al., 2000; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007).

O presente trabalho avaliou o perfil de expressão dos genes e proteínas MDR de um grupo de portadores de LA por duas metodologias diferentes, RT-PCR semiquantitativo (perfil gênico) e citometria de fluxo (perfil fenotípico), e verificou se havia alguma associação desse perfil *mdr*/MDR com o prognóstico e a resposta clínica dos pacientes. Como pode ser observado, diversas associações e

correlações significativas foram encontradas e, interessante, não houve concordância entre as associações encontradas para os genes e as proteínas. Esses dados evidenciam que, muito mais que as diferenças populacionais, são as diferenças metodológicas que interferem na avaliação do impacto do perfil MDR no prognóstico dos pacientes com LA. De fato, no presente trabalho, a análise da transcrição dos genes foi realizada em células mononucleares separadas por Ficoll-Hypaque. Apesar de no momento do diagnóstico a maioria das células mononucleadas dos pacientes serem blastos, muitas vezes alguns linfócitos e monócitos podem estar presentes na amostra e serem indevidamente separados junto com os blastos. Diante disso, não é possível afirmar que a RT-PCR semiquantitativa realizada neste estudo tenha efetivamente avaliado apenas a transcrição gênica das células neoplásicas. Por outro lado, a metodologia de citometria de fluxo empregada neste trabalho utilizou os anticorpos monoclonais anti-CD45 e anti-CD34 e as características de FSC e SSC para separar os blastos neoplásicos dos demais tipos celulares, o que garantiu que o fenótipo MDR que estava sendo analisado fosse apenas o das células neoplásicas. Dessa forma, poder-se-ia supor que o único motivo para a diferença entre as relações encontradas para a expressão dos genes e das proteínas seja a diferença de células que estão sendo avaliadas e não a metodologia empregada. No entanto, um estudo que realizou a avaliação da expressão de *abcb1*/ABCB1 e *abcc1*/ABCC1 por RT-PCR e por citometria de fluxo em células de linhagem de leucemia aguda humana demonstrou que não havia correlação entre a transcrição de *abcc1* e sua respectiva proteína e que, para algumas linhagens, a correlação entre a expressão de *abcb1* e ABCB1 era apenas moderada (HIROSE, 2009).

Dessa forma, os resultados encontrados por estes trabalhos e pelo presente estudo sugerem que existem fatores ainda não completamente compreendidos que influenciam na modulação do processo de transcrição e tradução das proteínas MDR (SAMDANI et al., 1996; DHOOGHE et al., 1999; MICIELI et al., 1999; WUCHTER et al., 2000; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK et al., 2007; HIROSE, 2009) e que mais estudos comparativos são necessários para um completo entendimento do papel do perfil *mdr*/MDR nas LAs.

## 6 CONCLUSÃO

As compilações de evidências obtidas neste estudo são:

1. Os pacientes portadores de LA (n=75) que não entraram em remissão (n=56/75) após a quimioterapia de indução apresentaram mediana de idade superior a dos pacientes que entraram em remissão (n=19/75);
2. As medianas de sobrevida dos pacientes portadores de LMA, LLA-B e LLA-T foram de três meses, 25 meses e cinco meses, respectivamente;
3. A mediana de sobrevida dos portadores de LPA (n=19) foi superior a 60 meses;
4. As mutações *FLT3-DIT* (5,8%) e *FLT3-D835* (8,4%) foram raras;
5. A mutação *JAK2V617F* não foi detectada em nenhum paciente;
6. Apenas seis indivíduos expressaram *survivina* (9,4%);
7. O perfil de expressão dos genes e proteínas MDR nos portadores de LA foi heterogêneo;
8. Nos casos de LA, a expressão de ABCB1 e a atividade da LDH correlacionaram-se positivamente, a presença do marcador CD34 associou-se com a maior transcrição de *abcc1*, e a maior transcrição de *lrp* associou-se com a ausência do marcador CD56 e com a ausência de transcrição de *survivina*;
9. Nos portadores de LMA (n=28/75), a transcrição de *abcc1* e a idade dos pacientes correlacionaram-se positivamente, e a ausência de transcrição de *survivina* associou-se com a maior transcrição de *lrp*;
10. Nos pacientes com diagnóstico de LPA (n=19/75), as expressões de *abcc1* e de LRP correlacionaram-se positivamente com o percentual de promielócitos leucêmicos ao diagnóstico, e a expressão de ABCC1 correlacionou-se positivamente com a atividade da LDH;
11. Nos casos de LLA-B (n=19/75), as expressões de ABCB1 e de *abcc1* correlacionaram-se positivamente com a atividade da LDH, a expressão de ABCC1 correlacionou-se negativamente com a contagem de leucócitos ao diagnóstico, e a expressão de LRP correlacionou-se positivamente com o número de leucócitos ao diagnóstico e associou-se com a presença da t(9;22)(q34;q11.2);
12. Nos casos de LLA-T (n=7/75), a transcrição de *abcc1* e a contagem de leucócitos correlacionaram-se positivamente;

13. A maior expressão de LRP associou-se com o diagnóstico de LMA;
14. Os pacientes com diagnóstico de LA e de LMA que não entraram em remissão após a terapia de indução expressaram mais *abcb1* do que aqueles que apresentaram remissão completa após a quimioterapia de indução;
15. Os portadores de LMA que não responderam à terapia de indução expressaram mais *ABCC1* do que os que apresentaram remissão completa após a terapia de indução;
16. Não houve associação entre a expressão de *abcb1/ABCB1*, *abcc1/ABCC1* e *lrp/LRP* e a ocorrência de óbitos;
17. Os pacientes com diagnóstico de LMA expressaram menos *abcc1* após a terapia de indução;
18. Os portadores de LPA expressaram mais LRP após a quimioterapia de indução.

Esses resultados sugerem que a expressão de *abcb1/ABCB1*, *abcc1/ABCC1* e *lrp/LRP* apresenta relação com fatores de prognóstico, como idade, leucometria ao diagnóstico, percentual de blastos neoplásicos, LDH, presença do marcador CD34 e da *t(9;22)(q34;q11.2)*, nos casos de LA e que a elevada expressão de *abcb1* e de *ABCC1* influencia na resposta à terapia de indução nos pacientes com diagnóstico de LMA. Além disso, pôde-se perceber que a análise da transcrição dos genes de resistência à quimioterapia fornece informações de prognóstico diferentes da análise das proteínas de resistência à quimioterapia. Diante disso, o presente estudo recomenda que no momento do diagnóstico dos portadores de LA seja realizada a avaliação simultânea da transcrição dos genes (*abcb1*, *abcc1* e *lrp*) e das proteínas (*ABCB1*, *ABCC1* e *LRP*) de resistência à quimioterapia.

## 7 PERSPECTIVAS

Para elucidar mais detalhadamente o papel da expressão de *abcb1*/ABCB1, *abcc1*/ABCC1 e *lrp*/LRP como marcadores moleculares de diagnóstico diferencial, estratificação de prognóstico e detecção de DRM em portadores de LAs é necessário aumentar a população estudada, dando continuidade à coleta e análise de amostras de SP ou MO de pacientes recém-diagnosticados com LA e de indivíduos que já iniciaram a quimioterapia. Além disso, tem-se como perspectiva:

- Analisar o perfil de transcrição de *abcb1*, *abcc1*, *lrp* e *survivina* por qRT-PCR;
- Determinar o perfil de expressão normal de *abcb1*/ABCB1, *abcc1*/ABCC1 e *lrp*/LRP em blastos de indivíduos adultos saudáveis e utilizar esse perfil de expressão como ponto de corte para a determinação de superexpressão desses genes e proteínas;
- Verificar se a análise da expressão do perfil *mdr*/MDR pode ser utilizada como ferramenta de diagnóstico de recidiva;
- Avaliar o efeito citotóxico do trióxido de arsênio em linhagens de células de leucemia aguda humana que superexpressam LRP para elucidar o papel da expressão dessa proteína na resistência ao tratamento de portadores de LPA.



## REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, O.; PATEL, J.; LEVINE, R. L. Clinical implications of novel mutations in epigenetic modifiers in AML. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 25, n. 6, p. 1119-1133, 2011.

ABDELHAMID, E.; PREUDHOMME, C.; HELEVAUT, N.; NIBOUREL, O.; GARDIN, C.; ROUSSELOT, P.; CASTAIGNE, S.; GRUSON, B.; BERTHON, C.; SOUA, Z.; RENNEVILLE, A. Minimal residual disease monitoring based on FLT3 internal tandem duplication in adult acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v. 36, n. 3, p. 316-23, 2012.

ABUTALIB, S. A.; WETZLER, M.; STOCK, W. Looking toward the future: novel strategies based on molecular pathogenesis of acute lymphoblastic leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 23, n. 5, p. 1099-119, vii, 2009.

ADIDA, C.; RECHER, C.; RAFFOUX, E.; DANIEL, M. T.; TAKSIN, A. L.; ROUSSELOT, P.; SIGAUX, F.; DEGOS, L.; ALTIERI, D. C.; DOMBRET, H. Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**, v. 111, n. 1, p. 196-203, 2000.

ADVANI, A. S.; SHADMAN, M.; ALI-OSMAN, F.; BARKER, A.; RYBICKI, L.; KALAYCIO, M.; SEKERES, M. A.; DE CASTRO, C. M.; DIEHL, L. F.; MOORE, J. O.; BEAVEN, A.; COPELAN, E.; SOBECKS, R.; TALEA, P.; RIZZIERI, D. A. A Phase II trial of gemcitabine and mitoxantrone for patients with acute myeloid leukemia in first relapse. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 10, n. 6, p. 473-6, 2010.

AHMED, M. B.; SHEHATA, H. H.; MOUSSA, M.; IBRAHIM, T. M. Prognostic significance of survivin and tumor necrosis factor-alpha in adult acute lymphoblastic leukemia. **Clin Biochem**, v. 45, n. 1-2, p. 112-6, 2012.

AKAGI, T.; SHIH, L. Y.; KATO, M.; KAWAMATA, N.; YAMAMOTO, G.; SANADA, M.; OKAMOTO, R.; MILLER, C. W.; LIANG, D. C.; OGAWA, S.; KOEFFLER, H. P. Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) acute promyelocytic leukemia (APL) based on genomic alterations. **Blood**, v. 113, n. 8, p. 1741-8, 2009.

ALBANO, F.; MESTICE, A.; PANNUNZIO, A.; LANZA, F.; MARTINO, B.; PASTORE, D.; FERRARA, F.; CARLUCCIO, P.; NOBILE, F.; CASTOLDI, G.; LISO, V.; SPECCHIA, G. The biological characteristics of CD34+ CD2+ adult acute promyelocytic leukemia and the CD34 CD2 hypergranular (M3) and microgranular (M3v) phenotypes. **Haematologica**, v. 91, n. 3, p. 311-6, 2006.

ALLEN, S. M.; FLORELL, S. R.; HANKS, A. N.; ALEXANDER, A.; DIEDRICH, M. J.; ALTIERI, D. C.; GROSSMAN, D. Survivin expression in mouse skin prevents papilloma regression and promotes chemical-induced tumor progression. **Cancer Res**, v. 63, n. 3, p. 567-72, 2003.

AU, W. Y.; FUNG, A.; CHIM, C. S.; LIE, A. K.; LIANG, R.; MA, E. S.; CHAN, C. H.; WONG, K. F.; KWONG, Y. L. FLT-3 aberrations in acute promyelocytic leukaemia: clinicopathological associations and prognostic impact. **Br J Haematol**, v. 125, n. 4, p. 463-9, 2004.

BALCERCZAK, E.; PANCZYK, M.; PIASKOWSKI, S.; PASZ-WALCZAK, G.; SALAGACKA, A.; MIROWSKI, M. ABCB1/MDR1 gene polymorphisms as a prognostic factor in colorectal cancer. **Int J Colorectal Dis**, v. 25, n. 10, p. 1167-76, 2010.

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.

BAO, L.; WANG, X.; RYDER, J.; JI, M.; CHEN, Y.; CHEN, H.; SUN, H.; YANG, Y.; DU, X.; KERZIC, P.; GROSS, S. A.; YAO, L.; LV, L.; FU, H.; LIN, G.; IRONS, R. D. Prospective study of 174 de novo acute myelogenous leukemias according to the WHO classification: subtypes, cytogenetic features and FLT3 mutations. **Eur J Haematol**, v. 77, n. 1, p. 35-45, 2006.

BARCELOS, M. M.; SANTOS-SILVA, M. C. Molecular approach to diagnose BCR/ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 33, n. 4, p. 290-296, 2011.

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

BAXTER, E. J.; SCOTT, L. M.; CAMPBELL, P. J.; EAST, C.; FOUROUCLAS, N.; SWANTON, S.; VASSILIOU, G. S.; BENCH, A. J.; BOYD, E. M.; CURTIN, N.; SCOTT, M. A.; ERBER, W. N.; GREEN, A. R. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v. 365, n. 9464, p. 1054-1061, 2005.

BELTRAN, B.; QUINONES, P.; MORALES, D.; COTRINA, E.; CASTILLO, J. J. Different prognostic factors for survival in acute and lymphomatous adult T-cell leukemia/lymphoma. **Leuk Res**, v. 35, n. 3, p. 334-339, 2011.

BENCH, A. J.; ERBER, W. N.; SCOTT, M. A. Molecular genetic analysis of haematological malignancies: I. Acute leukaemias and myeloproliferative disorders. **Clin Lab Haematol**, v. 27, n. 3, p. 148-71, 2005.

BENE, M. C.; PORWIT, A. Acute leukemias of ambiguous lineage. **Semin Diagn Pathol**, v. 29, n. 1, p. 12-8, 2012.

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.

BERGER, W.; STEINER, E.; GRUSCH, M.; ELBLING, L.; MICKSCHE, M. Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 1, p. 43-61, 2009.

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.

BITTENCOURT, A. L.; DA GRACAS VIEIRA, M.; BRITES, C. R.; FARRE, L.; BARBOSA, H. S. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Bahia, Brazil: analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. **Am J Clin Pathol**, v. 128, n. 5, p. 875-82, 2007.

BITTENCOURT, R. I.; FERNANDES, F. B.; PAZ, A. A.; FOGLIATTO, L.; ASTIGARRAGA, C. C.; FRIEDERICH, J. R.; LEUGHEUR, D. S.; SILLA, L. M. R. Leucemia mielóide aguda: o olhar dos anos 2000 no Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-RS. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, n. 3, p. 202-207, 2008.

BITTERMAN, P. B.; POLUNOVSKY, V. A. Translational control of cell fate: from integration of environmental signals to breaching anticancer defense. **Cell Cycle**, v. 11, n. 6, p. 1097-107, 2012.

BOISSEL, N.; LEROY, H.; BRETHON, B.; PHILIPPE, N.; DE BOTTON, S.; AUVRIGNON, A.; RAFFOUX, E.; LEBLANC, T.; THOMAS, X.; HERMINE, O.; QUESNEL, B.; BARUCHEL, A.; LEVERGER, G.; DOMBRET, H.; PREUDHOMME, C. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). **Leukemia**, v. 20, n. 6, p. 965-70, 2006.

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.; 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.

BRASIL. **Portaria GM/MS nº 2.439, de 8 de dezembro de 2005.** Brasília, DF. 2005.

BUCHNER, T.; BERDEL, W. E.; HAFERLACH, C.; HAFERLACH, T.; SCHNITTGER, S.; MULLER-TIDOW, C.; BRAESS, J.; SPIEKERMANN, K.; KIENAST, J.; STAIB, P.; GRUNEISEN, A.; KERN, W.; REICHLER, A.; MASCHMEYER, G.; AUL, C.; LENGFELDER, E.; SAUERLAND, M. C.; HEINECKE, A.; WORMANN, B.; HIDDEMANN, W. Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 1, p. 61-9, 2009.

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.

BURNETT, A. K. New induction and postinduction strategies in acute myeloid leukemia. **Curr Opin Hematol**, v. 19, n. 2, p. 76-81, 2012.

CALLENS, C.; CHEVRET, S.; CAYUELA, J. M.; CASSINAT, B.; RAFFOUX, E.; DE BOTTON, S.; THOMAS, X.; GUERCI, A.; FEGUEUX, N.; PIGNEUX, A.; STOPPA, A. M.; LAMY, T.; RIGAL-HUGUET, F.; VEKHOFF, A.; MEYER-MONARD, S.; FERRAND, A.; SANZ, M.; CHOMIENNE, C.; FENAUX, P.; DOMBRET, H. Prognostic implication of FLT3 and Ras gene mutations in patients with acute promyelocytic leukemia (APL): a retrospective study from the European APL Group. **Leukemia**, v. 19, n. 7, p. 1153-60, 2005.

CALLERA, F.; BRASIL, A. A.; CASALI, A. R.; MULIN, C. C.; ROSA, E. S.; BARBOSA MDE, A.; VIEIRA, T. D. Survival of patients diagnosed with subsets of lymphoid neoplasms and acute myeloid leukemia from 2000 to 2010 in the Vale do Paraiba, State of Sao Paulo are we going the right way? **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 34, n. 2, p. 168-70, 2012.

CAMPBELL, P. J.; SCOTT, L. M.; BAXTER, E. J.; BENCH, A. J.; GREEN, A. R.; ERBER, W. N. Methods for the detection of the JAK2 V617F mutation in human myeloproliferative disorders. **Methods Mol Med**, v. 125, p. 253-264, 2006.

CANDONI, A.; DAMIANI, D.; MICHELUTTI, A.; MASOLINI, P.; MICIELI, M.; MICHELUTTI, T.; GEROMIN, A.; FANIN, R. Clinical characteristics, prognostic factors and multidrug-resistance related protein expression in 36 adult patients with acute promyelocytic leukemia. **Eur J Haematol**, v. 71, n. 1, p. 1-8, 2003.

CANDONI, A.; MICHELUTTI, A.; SIMEONE, E.; DAMIANI, D.; BACCARANI, M.; FANIN, R. Efficacy of liposomal daunorubicin and cytarabine as reinduction chemotherapy in relapsed acute lymphoblastic leukaemia despite expression of multidrug resistance-related proteins. **Eur J Haematol**, v. 77, n. 4, p. 293-9, 2006.

CARE, R. S.; VALK, P. J.; GOODEVE, A. C.; ABU-DUHIER, F. M.; GEERTSMA-KLEINEKOORT, W. M.; WILSON, G. A.; GARI, M. A.; PEAKE, I. R.; LOWENBERG, B.; REILLY, J. T. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. **Br J Haematol**, v. 121, n. 5, p. 775-7, 2003.

CARTER, B. Z.; KORNBLAU, S. M.; TSAO, T.; WANG, R. Y.; SCHOBER, W. D.; MILELLA, M.; SUNG, H. G.; REED, J. C.; ANDREEFF, M. Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition in vitro with pan-caspase inhibitors or in vivo by XIAP or Survivin does not affect cell survival or prognosis. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 4179-86, 2003.

CARTER, B. Z.; QIU, Y.; HUANG, X.; DIAO, L.; ZHANG, N.; COOMBES, K. R.; MAK, D. H.; KONOPLEVA, M.; CORTES, J.; KANTARJIAN, H. M.; MILLS, G. B.; ANDREEFF, M.; KORNBLAU, S. M. Survivin is highly expressed in CD34(+)38(-) leukemic stem/progenitor cells and predicts poor clinical outcomes in AML. **Blood**, v. 120, n. 1, p. 173-80, 2012.

CHAUHAN, P. S.; BHUSHAN, B.; SINGH, L. C.; MISHRA, A. K.; SALUJA, S.; MITTAL, V.; GUPTA, D. K.; KAPUR, S. Expression of genes related to multiple drug resistance and apoptosis in acute leukemia: response to induction chemotherapy. **Exp Mol Pathol**, v. 92, n. 1, p. 44-9, 2012.

CHE, X. F.; ZHENG, C. L.; OWATARI, S.; MUTOH, M.; GOTANDA, T.; JEUNG, H. C.; FURUKAWA, T.; IKEDA, R.; YAMAMOTO, M.; HARAGUCHI, M.; ARIMA, N.; AKIYAMA, S. Overexpression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ATL cell lines. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4880-7, 2006.

CHEN, C. J.; CHIN, J. E.; UEDA, K.; CLARK, D. P.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M.; RONINSON, I. B. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. **Cell**, v. 47, n. 3, p. 381-9, 1986.

CHURCH, D. N.; TALBOT, D. C. Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors. **Curr Oncol Rep**, v. 14, n. 2, p. 120-8, 2012.

CIMINO, G.; ELIA, L.; MANCINI, M.; ANNINO, L.; ANACLERICO, B.; FAZI, P.; VITALE, A.; SPECCHIA, G.; DI RAIMONDO, F.; RECCHIA, A.; CUNEO, A.; MECUCCI, C.; PANE, F.; SAGLIO, G.; FOA, R.; MANDELLI, F. Clinico-biologic features and treatment outcome of adult pro-B-ALL patients enrolled in the GIMEMA 0496 study: absence of the ALL1/AF4 and of the BCR/ABL fusion genes correlates with a significantly better clinical outcome. **Blood**, v. 102, n. 6, p. 2014-20, 2003.

COLE, S. P.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J. H.; MACKIE, J. E.; GRANT, C. E.; ALMQUIST, K. C.; STEWART, A. J.; KURZ, E. U.; DUNCAN, A. M.; DEELEY, R. G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**, v. 258, n. 5088, p. 1650-4, 1992.

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.

COLOVIC, N.; TOMIN, D.; VIDOVIC, A.; SUVAJDZIC, N.; JANKOVIC, G.; PALIBRK, V.; DJUNIC, I.; DJURASINOVIC, V.; VIRIJEVIC, M. Pretreatment prognostic factors for overall survival in primary resistant acute myeloid leukemia. **Biomed Pharmacother**, v. 66, n. 8, p. 578-82, 2012.

COOLS, J.; DEANGELO, D. J.; GOTLIB, J.; STOVER, E. H.; LEGARE, R. D.; CORTES, J.; KUTOK, J.; CLARK, J.; GALINSKY, I.; GRIFFIN, J. D.; CROSS, N. C.; TEFFERI, A.; MALONE, J.; ALAM, R.; SCHRIER, S. L.; SCHMID, J.; ROSE, M.; VANDENBERGHE, P.; VERHOEF, G.; BOOGAERTS, M.; WLODARSKA, I.; KANTARJIAN, H.; MARYNEN, P.; COUTRE, S. E.; STONE, R.; GILLILAND, D. G. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. **N Engl J Med**, v. 348, n. 13, p. 1201-14, 2003.

CORNELL, R. F.; PALMER, J. Adult acute leukemia. **Dis Mon**, v. 58, n. 4, p. 219-38, 2012.

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.

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.

CRIFE, L. D.; UNO, H.; PAIETTA, E. M.; LITZOW, M. R.; KETTERLING, R. P.; BENNETT, J. M.; ROWE, J. M.; LAZARUS, H. M.; LUGER, S.; TALLMAN, M. S. Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. **Blood**, v. 116, n. 20, p. 4077-85, 2010.

CURTA, J. C.; DE MORAES, A. C.; LICINIO, M. A.; COSTA, A.; SANTOS-SILVA, M. C. Effect of nitric oxide on the daunorubicin efflux mechanism in K562 cells. **Cell Biol Int**, v. 36, n. 6, p. 529-35, 2012.

DA GRACA ROCHA, G.; SIMOES, M.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A.; GATTASS, C. R. Effects of 3beta-Acetyl Tormentonic Acid (3ATA) on ABCC Proteins Activity. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 6, p. 6757-71, 2012.

DALAL, B. I.; MANSOOR, S.; MANNA, M.; PI, S.; SAURO, G. D.; HOGGE, D. E. Detection of CD34, TdT, CD56, CD2, CD4, and CD14 by flow cytometry is associated with NPM1 and FLT3 mutation status in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 12, n. 4, p. 274-9, 2012.

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.

DAMIANI, D.; MICIELI, M.; MICHELUTTI, A.; CANDONI, A.; STOCCHI, R.; MASOLINI, P.; GEROMIN, A.; MICHELUTTI, T.; RASPADORI, D.; IPPOLITI, M.; LAURIA, F.; FANIN, R. Antibody binding capacity for evaluation of MDR-related proteins in acute promyelocytic leukemia: Onset versus relapse expression. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 59, n. 1, p. 40-5, 2004.

DAMIANI, D.; TIRIBELLI, M.; MICHELUTTI, A.; GEROMIN, A.; CAVALLIN, M.; FABBRO, D.; PIANTA, A.; MALAGOLA, M.; DAMANTE, G.; RUSSO, D.; FANIN, R. Fludarabine-based induction therapy does not overcome the negative effect of ABCG2 (BCRP) over-expression in adult acute myeloid leukemia patients. **Leuk Res**, v. 34, n. 7, p. 942-5, 2010.

DANG, C. V. MYC on the path to cancer. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 22-35, 2012.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12-27, 2012.

DE JONGE-PEETERS, S. D.; KUIPERS, F.; DE VRIES, E. G.; VELLENGA, E. ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 62, n. 3, p. 214-26, 2007.

- DE MOERLOOSE, B.; SWERTS, K.; BENOIT, Y.; LAUREYS, G.; LOEYS, T.; PHILIPPE, J.; DHOOGHE, C. The combined analysis of P-glycoprotein expression and activity predicts outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Hematol Oncol**, v. 20, n. 5, p. 381-91, 2003.
- DE MORAES, A. C.; LICINIO, M. A.; ZAMPIROLO, J. A.; LIEDKE, S. C.; DEL MORAL, J. A.; MACHADO, M. J.; BAZZO, M. L.; DA SILVA, M. C. Evaluation of multidrug resistance in 46 newly diagnosed patients with acute leukemia. **Hematology**, v. 17, n. 2, p. 59-65, 2012.
- DE MORAES, A. C.; MARANHO, C. K.; RAUBER, G. S.; SANTOS-SILVA, M. C. Importance of detecting multidrug resistance proteins in acute leukemia prognosis and therapy. **J Clin Lab Anal**, v. 27, n. 1, p. 62-71, 2013.
- 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.
- DEAN, M.; FOJO, T.; BATES, S. Tumour stem cells and drug resistance. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 4, p. 275-84, 2005.
- 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.
- 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.

DIAZ, Z.; MANN, K. K.; MARCOUX, S.; KOURELIS, M.; COLOMBO, M.; KOMARNITSKY, P. B.; MILLER, W. H., JR. A novel arsenical has antitumor activity toward As2O3-resistant and MRP1/ABCC1-overexpressing cell lines. **Leukemia**, v. 22, n. 10, p. 1853-63, 2008.

DJUNIC, I.; VIRIJEVIC, M.; DJURASINOVIC, V.; NOVKOVIC, A.; COLOVIC, N.; KRAGULJAC-KURTOVIC, N.; VIDOVIC, A.; SUVAJDZIC-VUKOVIC, N.; TOMIN, D. Prognostic significance of CD56 antigen expression in patients with acute myeloid leukemia. **Med Oncol**, v. 29, n. 3, p. 2077-82, 2012a.

DJUNIC, I.; VIRIJEVIC, M.; NOVKOVIC, A.; DJURASINOVIC, V.; COLOVIC, N.; VIDOVIC, A.; SUVAJDZIC-VUKOVIC, N.; TOMIN, D. Comorbidity as a risk factor for overall survival and decision criteria for intensity of chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia. **Med Oncol**, v. 29, n. 2, p. 1077-81, 2012b.

DUFFY, M. J.; O'DONOVAN, N.; BRENNAN, D. J.; GALLAGHER, W. M.; RYAN, B. M. Survivin: a promising tumor biomarker. **Cancer Lett**, v. 249, n. 1, p. 49-60, 2007.

DUFOUR, A.; SCHNEIDER, F.; METZELER, K. H.; HOSTER, E.; SCHNEIDER, S.; ZELLMEIER, E.; BENTHAUS, T.; SAUERLAND, M. C.; BERDEL, W. E.; BUCHNER, T.; WORMANN, B.; BRAESS, J.; HIDDEMANN, W.; BOHLANDER, S. K.; SPIEKERMANN, K. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 4, p. 570-7, 2010.

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.

DWORZAK, M. N.; FROSCHL, G.; PRINTZ, D.; MANN, G.; POTSCHEGER, U.; MUHLEGGER, N.; FRITSCH, G.; GADNER, H. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 1952-8, 2002.

EGHTEDAR, A.; VERSTOVSEK, S.; ESTROV, Z.; BURGER, J.; CORTES, J.; BIVINS, C.; FADERL, S.; FERRAJOLI, A.; BORTHAKUR, G.; GEORGE, S.; SCHERLE, P. A.; NEWTON, R. C.; KANTARJIAN, H. M.; RAVANDI, F. Phase 2 study of the JAK kinase inhibitor ruxolitinib in patients with refractory leukemias, including postmyeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 119, n. 20, p. 4614-8, 2012.

EL-SHARNOUBY, J. A.; ABOU EL-ENEIN, A. M.; EL GHANNAM, D. M.; EL-SHANSHORY, M. R.; HAGAG, A. A.; YAHIA, S.; ELASHRY, R. Expression of lung resistance protein and multidrug resistance-related protein (MRP1) in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **J Oncol Pharm Pract**, v. 16, n. 3, p. 179-88, 2010.

ELSAYED, G. M.; ISMAIL, M. M.; MONEER, M. M. Expression of P-glycoprotein, Cyclin D1 and Ki-67 in Acute Lymphoblastic Leukemia: Relation with Induction Chemotherapy and Overall Survival. **Indian J Hematol Blood Transfus**, v. 27, n. 3, p. 157-63, 2011.

ESH, A. M.; ATFY, M.; AZIZI, N. A.; EL NAGGAR, M. M.; KHALIL, E. E.; SHERIEF, L. Prognostic significance of survivin in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Indian J Hematol Blood Transfus**, v. 27, n. 1, p. 18-25, 2011.

ESTEY, E. AML in older patients: are we making progress? **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 22, n. 4, p. 529-36, 2009.

ESTEY, E. H. Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. **Am J Hematol**, v. 87, n. 1, p. 89-99, 2012.

- FADERL, S.; THOMAS, D. A.; O'BRIEN, S.; RAVANDI, F.; GARCIA-MANERO, G.; BORTHAKUR, G.; FERRAJOLI, A.; VERSTOVSEK, S.; AYOUBI, M.; RYTTING, M.; FELIU, J.; KANTARJIAN, H. M. Augmented hyper-CVAD based on dose-intensified vincristine, dexamethasone, and asparaginase in adult acute lymphoblastic leukemia salvage therapy. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 11, n. 1, p. 54-9, 2011.
- FEDASENKA, U. U.; SHMAN, T. V.; SAVITSKI, V. P.; BELEVCEV, M. V. Expression of MDR1, LRP, BCRP and Bcl-2 genes at diagnosis of childhood ALL: comparison with MRD status after induction therapy. **Exp Oncol**, v. 30, n. 3, p. 248-52, 2008.
- FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-917, 2010.
- FERRARA, F.; PALMIERI, S.; LEONI, F. Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 66, n. 3, p. 181-93, 2008.
- 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.
- FOGLIATTO, L.; BITTENCOURT, H.; NUNES, A. S.; SALENAVE, P. R.; SILVA, G. S.; DAUDT, L. E.; JOB, F. M.; BITTENCOURT, R.; ONSTEN, T.; SILLA, L. M. Outcome of treatment in adult acute lymphoblastic leukemia in southern Brazil using a modified German multicenter acute lymphoblastic leukemia protocol. **Acta Haematol**, v. 107, n. 4, p. 203-7, 2002.
- FOJO, A. T.; WHANG-PENG, J.; GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Amplification of DNA sequences in human multidrug-resistant KB carcinoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 22, p. 7661-5, 1985.

FORAN, J. M. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2010, p. 47-55, 2010.

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.

FROHLING, S.; LIPKA, D. B.; KAYSER, S.; SCHOLL, C.; SCHLENK, R. F.; DOHNER, H.; GILLILAND, D. G.; LEVINE, R. L.; DOHNER, K. Rare occurrence of the JAK2 V617F mutation in AML subtypes M5, M6, and M7. **Blood**, v. 107, n. 3, p. 1242-3, 2006.

FUKUDA, S.; SINGH, P.; MOH, A.; ABE, M.; CONWAY, E. M.; BOSWELL, H. S.; YAMAGUCHI, S.; FU, X. Y.; PELUS, L. M. Survivin mediates aberrant hematopoietic progenitor cell proliferation and acute leukemia in mice induced by internal tandem duplication of Flt3. **Blood**, v. 114, n. 2, p. 394-403, 2009.

FURITSU, T.; TSUJIMURA, T.; TONO, T.; IKEDA, H.; KITAYAMA, H.; KOSHIMIZU, U.; SUGAHARA, H.; BUTTERFIELD, J. H.; ASHMAN, L. K.; KANAYAMA, Y.; ET AL. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. **J Clin Invest**, v. 92, n. 4, p. 1736-44, 1993.

GILLILAND, D. G.; GRIFFIN, J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1532-42, 2002.

GLEISSNER, B.; GOKBUGET, N.; BARTRAM, C. R.; JANSSEN, B.; RIEDER, H.; JANSSEN, J. W.; FONATSCH, C.; HEYLL, A.; VOLIOTIS, D.; BECK, J.; LIPP, T.; MUNZERT, G.; MAURER, J.; HOELZER, D.; THIEL, E. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. **Blood**, v. 99, n. 5, p. 1536-43, 2002.

GLEISSNER, B.; GOEKBUGET, N.; RIEDER, H.; ARNOLD, R.; SCHWARTZ, S.; DIEDRICH, H.; SCHOCH, C.; HEINZE, B.; FONATSCH, C.; BARTRAM, C. R.; HOELZER, D.; THIEL, E. CD10-pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of MLL aberrations: results of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL). **Blood**, v. 106, n. 13, p. 4054-6, 2005.

GOLDBERG, J. D.; LINKER, A.; KUK, D.; RATAN, R.; JURCIC, J.; BARKER, J. N.; CASTRO-MALASPINA, H.; GIRALT, S.; HSU, K.; JAKUBOWSKI, A. A.; JENQ, R.; KOEHNE, G.; PAPADOPOULOS, E. B.; VAN DEN BRINK, M. R.; YOUNG, J. W.; BOULAD, F.; KERNAN, N. A.; O'REILLY, R. J.; PROCKOP, S. E.; YAHALOM, J.; HELLER, G.; PERALES, M. A. T Cell-Depleted Stem Cell Transplantation for Adults with High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia: Long-Term Survival for Patients in First Complete Remission with a Decreased Risk of Graft-versus-Host Disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 19, n. 2, p. 208-13, 2013.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48-58, 2002.

GRANT, C. E.; VALDIMARSSON, G.; HIPFNER, D. R.; ALMQUIST, K. C.; COLE, S. P.; DEELEY, R. G. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. **Cancer Res**, v. 54, n. 2, p. 357-61, 1994.

GREAVES, W.; XIAO, L.; SANCHEZ-ESPIRIDION, B.; KUNKALLA, K.; DAVE, K. S.; LIANG, C. S.; SINGH, R. R.; YOUNES, A.; MEDEIROS, L. J.; VEGA, F. Detection of ABCC1 expression in classical Hodgkin lymphoma is associated with increased risk of treatment failure using standard chemotherapy protocols. **J Hematol Oncol**, v. 5, n. 1, p. 47, 2012.

GRIMWADE, D.; HILLS, R. K. Independent prognostic factors for AML outcome. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 385-95, 2009.

GRIMWADE, D.; HILLS, R. K.; MOORMAN, A. V.; WALKER, H.; CHATTERS, S.; GOLDSTONE, A. H.; WHEATLEY, K.; HARRISON, C. J.; BURNETT, A. K. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. **Blood**, v. 116, n. 3, p. 354-65, 2010.

GUENOVA, M. L.; BALATZENKO, G. N.; NIKOLOVA, V. R.; SPASSOV, B. V.; KONSTANTINOV, S. M. An anti-apoptotic pattern correlates with multidrug resistance in acute myeloid leukemia patients: a comparative study of active caspase-3, cleaved PARPs, Bcl-2, Survivin and MDR1 gene. **Hematology**, v. 15, n. 3, p. 135-43, 2010.

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.

HAMPTRAS, S. S.; SUCHESTON, L.; WEISS, J.; BAER, M. R.; ZIRPOLI, G.; SINGH, P. K.; WETZLER, M.; CHENNAMANENI, R.; BLANCO, J. G.; FORD, L.; MOYSICH, K. B. Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette (ABC) proteins, overall survival and drug toxicity in patients with Acute Myeloid Leukemia. **Int J Mol Epidemiol Genet**, v. 1, n. 3, p. 201-207, 2010.

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

\_\_\_\_\_. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HARRISON, C. J. Acute lymphoblastic leukemia. **Clin Lab Med**, v. 31, n. 4, p. 631-47, ix, 2011.

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.

HIRSCH, P.; TANG, R.; MARZAC, C.; PERROT, J. Y.; FAVA, F.; BERNARD, C.; JEZIOROWSKA, D.; MARIE, J. P.; LEGRAND, O. Prognostic impact of high ABC transporter activity in 111 adult acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics when compared to FLT3, NPM1, CEBPA and BAALC. **Haematologica**, v. 97, n. 2, p. 241-5, 2012.

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/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** Rio de Janeiro: INCA, 2007. 96p.

\_\_\_\_\_. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118p.

INCA/MS. Leucemia Linfóide Aguda em Adulto. **Rev Bras Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 309-312, 2002a.

\_\_\_\_\_. Leucemia Mielóide Aguda em Adultos. **Rev Bras Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 313-315, 2002b.

INTERMESOLI, T.; KRISHNAN, S.; MACDOUGALL, F.; JENNER, M.; LISTER, A.; ROHATINER, A. Efficacy of an intensive post-induction chemotherapy regimen for adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia, given predominantly in the out-patient setting. **Ann Hematol**, v. 90, n. 9, p. 1059-65, 2011.

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.

ISLAM, A.; KAGEYAMA, H.; TAKADA, N.; KAWAMOTO, T.; TAKAYASU, H.; ISOGAI, E.; OHIRA, M.; HASHIZUME, K.; KOBAYASHI, H.; KANEKO, Y.; NAKAGAWARA, A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. **Oncogene**, v. 19, n. 5, p. 617-23, 2000.

IZQUIERDO, M. A.; SCHEFFER, G. L.; FLENS, M. J.; SCHROEIJERS, A. B.; VAN DER VALK, P.; SCHEPER, R. J. Major vault protein LRP-related multidrug resistance. **Eur J Cancer**, v. 32A, n. 6, p. 979-84, 1996a.

IZQUIERDO, M. A.; SHOEMAKER, R. H.; FLENS, M. J.; SCHEFFER, G. L.; WU, L.; PRATHER, T. R.; SCHEPER, R. J. Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer-cell lines. **Int J Cancer**, v. 65, n. 2, p. 230-7, 1996b.

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. 352p.

JAMES, C.; UGO, V.; LE COUEDIC, J. P.; STAERK, J.; DELHOMMEAU, F.; LACOUT, C.; GARCON, L.; RASLOVA, H.; BERGER, R.; BENNACEUR-GRISCELLI, A.; VILLEVAL, J. L.; CONSTANTINESCU, S. N.; CASADEVALL, N.; VAINCHENKER, W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature**, v. 434, n. 7037, p. 1144-1148, 2005.

JELINEK, J.; OKI, Y.; GHARIBYAN, V.; BUESO-RAMOS, C.; PRCHAL, J. T.; VERSTOVSEK, S.; BERAN, M.; ESTEY, E.; KANTARJIAN, H. M.; ISSA, J. P. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. **Blood**, v. 106, n. 10, p. 3370-3373, 2005.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; XU, J.; WARD, E. Cancer statistics, 2010. **CA Cancer J Clin**, v. 60, n. 5, p. 277-300, 2010.

JOHNSTONE, R. W.; CRETNEY, E.; SMYTH, M. J. P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. **Blood**, v. 93, n. 3, p. 1075-85, 1999.

JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochim Biophys Acta**, v. 455, n. 1, p. 152-62, 1976.

JULIUSSON, G.; ANTUNOVIC, P.; DEROLF, A.; LEHMANN, S.; MOLLGARD, L.; STOCKELBERG, D.; TIDEFELT, U.; WAHLIN, A.; HOGLUND, M. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. **Blood**, v. 113, n. 18, p. 4179-87, 2009.

JURCIC, J. G.; SOIGNET, S. L.; MASLAK, A. P. Diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia. **Curr Oncol Rep**, v. 9, n. 5, p. 337-44, 2007.

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.

KAMIHIRA, S.; YAMADA, Y.; HIRAKATA, Y.; TOMONAGA, M.; SUGAHARA, K.; HAYASHI, T.; DATEKI, N.; HARASAWA, H.; NAKAYAMA, K. Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukaemia: survivin is an important determinant for prognosis. **Br J Haematol**, v. 114, n. 1, p. 63-9, 2001.

KANTARJIAN, H. M.; THOMAS, D.; RAVANDI, F.; FADERL, S.; JABBOUR, E.; GARCIA-MANERO, G.; PIERCE, S.; SHAN, J.; CORTES, J.; O'BRIEN, S. Defining the course and prognosis of adults with acute lymphocytic leukemia in first salvage after induction failure or short first remission duration. **Cancer**, v. 116, n. 24, p. 5568-5574, 2010.

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.

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.

KERN, W.; SCHOCH, C.; HAFERLACH, T.; SCHNITTGER, S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 56, n. 2, p. 283-309, 2005.

KIYOI, H.; NAOE, T.; NAKANO, Y.; YOKOTA, S.; MINAMI, S.; MIYAWAKI, S.; ASOU, N.; KURIYAMA, K.; JINNAI, I.; SHIMAZAKI, C.; AKIYAMA, H.; SAITO, K.; OH, H.; MOTOJI, T.; OMOTO, E.; SAITO, H.; OHNO, R.; UEDA, R. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 93, n. 9, p. 3074-80, 1999.

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

KOLITZ, J. E.; GEORGE, S. L.; MARCUCCI, G.; VIJ, R.; POWELL, B. L.; ALLEN, S. L.; DEANGELO, D. J.; SHEA, T. C.; STOCK, W.; BAER, M. R.; HARS, V.; MAHARRY, K.; HOKE, E.; VARDIMAN, J. W.; BLOOMFIELD, C. D.; LARSON, R. A. P-glycoprotein inhibition using valsopodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808. **Blood**, v. 116, n. 9, p. 1413-1421, 2010.

KOLLI, S.; ZITO, C. I.; MOSSINK, M. H.; WIEMER, E. A.; BENNETT, A. M. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. **J Biol Chem**, v. 279, n. 28, p. 29374-85, 2004.

KOTTARIDIS, P. D.; GALE, R. E.; FREW, M. E.; HARRISON, G.; LANGABEER, S. E.; BELTON, A. A.; WALKER, H.; WHEATLEY, K.; BOWEN, D. T.; BURNETT, A. K.; GOLDSTONE, A. H.; LINCH, D. C. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1752-9, 2001.

KOTTARIDIS, P. D.; GALE, R. E.; LINCH, D. C. Flt3 mutations and leukaemia. **Br J Haematol**, v. 122, n. 4, p. 523-38, 2003.

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.

KOZLOV, G.; VAVELYUK, O.; MINAILIUC, O.; BANVILLE, D.; GEHRING, K.; EKIEL, I. Solution structure of a two-repeat fragment of major vault protein. **J Mol Biol**, v. 356, n. 2, p. 444-52, 2006.

KRALOVICS, R.; PASSAMONTI, F.; BUSER, A. S.; TEO, S. S.; TIEDT, R.; PASSWEG, J. R.; TICHELLI, A.; CAZZOLA, M.;

SKODA, R. C. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, v. 352, n. 17, p. 1779-1790, 2005.

KRUG, U.; ROLLIG, C.; KOSCHMIEDER, A.; HEINECKE, A.; SAUERLAND, M. C.; SCHAICH, M.; THIEDE, C.; KRAMER, M.; BRAESS, J.; SPIEKERMANN, K.; HAFERLACH, T.; HAFERLACH, C.; KOSCHMIEDER, S.; ROHDE, C.; SERVE, H.; WORMANN, B.; HIDDEMANN, W.; EHNINGER, G.; BERDEL, W. E.; BUCHNER, T.; MULLER-TIDOW, C. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2000-2008, 2010.

KRUG, U.; BUCHNER, T.; BERDEL, W. E.; MULLER-TIDOW, C. The treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. **Dtsch Arztebl Int**, v. 108, n. 51-52, p. 863-70, 2011.

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

KRUM, E. A.; YAMAMOTO, M.; CHAUFFAILLE MDE, L. Prevalence of FMS-like tyrosine kinase 3/internal tandem duplication (FLT3/ITD+) in de novo acute myeloid leukemia patients categorized according to cytogenetic risk. **Sao Paulo Med J**, v. 127, n. 1, p. 23-7, 2009.

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.

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.

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.

KWEON, S. H.; SONG, J. H.; KIM, T. S. Resveratrol-mediated reversal of doxorubicin resistance in acute myeloid leukemia cells via downregulation of MRP1 expression. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 395, n. 1, p. 104-110, 2010.

LARA, P. C.; PRUSCHY, M.; ZIMMERMANN, M.; HENRIQUEZ-HERNANDEZ, L. A. MVP and vaults: a role in the radiation response. **Radiat Oncol**, v. 6, p. 148, 2011.

LARSEN, A. K.; ESCARGUEIL, A. E.; SKLADANOWSKI, A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. **Pharmacol Ther**, v. 85, n. 3, p. 217-29, 2000.

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.

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.

LEE, G. R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N.; PARASKEVAS, F.; GREER, J. P.; RODGERS, G. M. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10th. Williams & Wilkins, 1999. 2680p.

LEGRAND, O.; SIMONIN, G.; PERROT, J. Y.; ZITTOUN, R.; MARIE, J. P. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. **Blood**, v. 91, n. 12, p. 4480-8, 1998.

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.; 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.

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. 1086-1099, 1999.

LEONARD, G. D.; FOJO, T.; BATES, S. E. The role of ABC transporters in clinical practice. **Oncologist**, v. 8, n. 5, p. 411-24, 2003.

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.

LEVINE, R. L.; LORIAUX, M.; HUNTLY, B. J.; LOH, M. L.; BERAN, M.; STOFFREGEN, E.; BERGER, R.; CLARK, J. J.; WILLIS, S. G.; NGUYEN, K. T.; FLORES, N. J.; ESTEY, E.; GATTERMANN, N.; ARMSTRONG, S.; LOOK, A. T.; GRIFFIN, J. D.; BERNARD, O. A.; HEINRICH, M. C.; GILLILAND, D. G.; DRUKER, B.; DEININGER, M. W. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 106, n. 10, p. 3377-3379, 2005a.

LEVINE, R. L.; WADLEIGH, M.; COOLS, J.; EBERT, B. L.; WERNIG, G.; HUNTLY, B. J.; BOGGON, T. J.; WLODARSKA, I.; CLARK, J. J.; MOORE, S.; ADELSPERGER, J.; KOO, S.; LEE, J. C.; GABRIEL, S.; MERCHER, T.; D'ANDREA, A.; FROHLING, S.; DOHNER, K.; MARYNEN, P.; VANDENBERGHE, P.; MESA, R. A.; TEFFERI, A.; GRIFFIN, J. D.; ECK, M. J.; SELLERS, W. R.; MEYERSON, M.; GOLUB, T. R.; LEE, S. J.; GILLILAND, D. G. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, v. 7, n. 4, p. 387-397, 2005b.

LEVINE, R. L.; PARDANANI, A.; TEFFERI, A.; GILLILAND, D. G. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 9, p. 673-683, 2007.

LIANG, D. C.; SHIH, L. Y.; HUNG, I. J.; YANG, C. P.; CHEN, S. H.; JAING, T. H.; LIU, H. C.; WANG, L. Y.; CHANG, W. H. FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 17, n. 5, p. 883-6, 2003.

LICÍNIO, M. A.; SANTOS-SILVA, M. C. Importance of detecting FLT3 and NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia - World Health Organization Classification 2008. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, n. 6, p. 476-481, 2010.

LIEW, E.; ATENAFU, E. G.; SCHIMMER, A. D.; YEE, K. W.; SCHUH, A. C.; MINDEN, M. D.; GUPTA, V.; BRANDWEIN, J. M. Outcomes of adult patients with relapsed acute lymphoblastic leukemia following frontline treatment with a pediatric regimen. **Leuk Res**, v. 36, n. 12, p. 1517-20, 2012.

LIPPKE, J. A.; STRZEMPKO, M. N.; RAIA, F. F.; SIMON, S. L.; FRENCH, C. K. Isolation of intact high-molecular-weight DNA by using guanidine isothiocyanate. **Appl Environ Microbiol**, v. 53, n. 10, p. 2588-9, 1987.

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.

LIU, J. J.; HUANG, R. W.; LIN, D. J.; PENG, J.; WU, X. Y.; LIN, Q.; PAN, X. L.; SONG, Y. Q.; ZHANG, M. H.; HOU, M.; CHEN, F. Expression of survivin and bax/bcl-2 in peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands induces apoptosis on human myeloid leukemia cells in vitro. **Ann Oncol**, v. 16, n. 3, p. 455-9, 2005.

LO-COCO, F.; AVVISATI, G.; VIGNETTI, M.; BRECCIA, M.; GALLO, E.; RAMBALDI, A.; PAOLONI, F.; FIORITONI, G.; FERRARA, F.; SPECCHIA, G.; CIMINO, G.; DIVERIO, D.; BORLENGHI, E.; MARTINELLI, G.; DI RAIMONDO, F.; DI BONA, E.; FAZI, P.; PETA, A.; BOSI, A.; CARELLA, A. M.; FABBIANO, F.; POGLIANI, E. M.; PETTI, M. C.; AMADORI, S.; MANDELLI, F. Front-line treatment of acute promyelocytic leukemia with AIDA induction followed by risk-adapted consolidation for adults younger than 61 years: results of the AIDA-2000 trial of the GIMEMA Group. **Blood**, v. 116, n. 17, p. 3171-3179, 2010.

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.

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.

LUCENA-ARAUJO, A. R.; SOUZA, D. L.; MORATO DE OLIVEIRA, F.; BENICIO, M. T.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L.; SANTANA-LEMONS, B. A.; DOS SANTOS, G. A.; JACOMO, R. H.; DINARTE-SANTOS, A. R.; YAMAMOTO, M.; SILVA-JR, W. A.; DE LOURDES CHAUFFAILLE, M.; REGO, E. M. Results of FLT3 mutation screening and correlations with immunophenotyping in 169 Brazilian patients with acute myeloid leukemia. **Ann Hematol**, v. 89, n. 2, p. 225-228, 2010.

LUDWIG, W. D.; RIEDER, H.; BARTRAM, C. R.; HEINZE, B.; SCHWARTZ, S.; GASSMANN, W.; LOFFLER, H.; HOSSFELD, D.; HEIL, G.; HANDT, S.; HEYLL, A.; DIEDRICH, H.; FISCHER, K.; WEISS, A.; VOLKERS, B.; AYDEMIR, U.; FONATSCH, C.; GOKBUGET, N.; THIEL, E.; HOELZER, D. Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. **Blood**, v. 92, n. 6, p. 1898-909, 1998.

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.

MAHJOUBI, F.; AKBARI, S. Multidrug resistance-associated protein 1 predicts relapse in Iranian childhood acute lymphoblastic leukemia. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 5, p. 2285-9, 2012.

MAO, Q.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Functional reconstitution of substrate transport by purified multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) in phospholipid vesicles. **J Biol Chem**, v. 275, n. 44, p. 34166-72, 2000.

MARCHESI, F.; ANNIBALI, O.; CERCHIARA, E.; TIRINDELLI, M. C.; AVVISATI, G. Cytogenetic abnormalities in adult non-promyelocytic acute myeloid leukemia: a concise review. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 80, n. 3, p. 331-346, 2011.

MARZOLINI, C.; PAUS, E.; BUCLIN, T.; KIM, R. B. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. **Clin Pharmacol Ther**, v. 75, n. 1, p. 13-33, 2004.

MCGRATH, T.; CENTER, M. S. Adriamycin resistance in HL60 cells in the absence of detectable P-glycoprotein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 145, n. 3, p. 1171-6, 1987.

MCGREGOR, S.; MCNEER, J.; GURBUXANI, S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. **Semin Diagn Pathol**, v. 29, n. 1, p. 2-11, 2012.

MEAD, A. J.; LINCH, D. C.; HILLS, R. K.; WHEATLEY, K.; BURNETT, A. K.; GALE, R. E. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1262-70, 2007.

MESHINCHI, S.; WOODS, W. G.; STIREWALT, D. L.; SWEETSER, D. A.; BUCKLEY, J. D.; TJOA, T. K.; BERNSTEIN, I. D.; RADICH, J. P. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 89-94, 2001.

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.

MICHELIELI, M.; DAMIANI, D.; ERMACORA, A.; GEROMIN, A.; MICHELUTTI, A.; MASOLINI, P.; BACCARANI, M. P-glycoprotein (PGP), lung resistance-related protein (LRP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in acute promyelocytic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 108, n. 4, p. 703-9, 2000.

MIRSKI, S. E.; GERLACH, J. H.; COLE, S. P. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. **Cancer Res**, v. 47, n. 10, p. 2594-8, 1987.

MITA, A. C.; MITA, M. M.; NAWROCKI, S. T.; GILES, F. J. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 16, p. 5000-5, 2008.

MONTESINOS, P.; RAYON, C.; VELLENGA, E.; BRUNET, S.; GONZALEZ, J.; GONZALEZ, M.; HOLOWIECKA, A.; ESTEVE, J.; BERGUA, J.; GONZALEZ, J. D.; RIVAS, C.; TORMO, M.; RUBIO, V.; BUENO, J.; MANSO, F.; MILONE, G.; DE LA SERNA, J.; PEREZ, I.; PEREZ-ENCINAS, M.; KRSNIK, I.; RIBERA, J. M.; ESCODA, L.; LOWENBERG, B.; SANZ, M. A. Clinical significance of CD56 expression in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based regimens. **Blood**, v. 117, n. 6, p. 1799-805, 2011.

MORENO, I.; MARTIN, G.; BOLUFER, P.; BARRAGAN, E.; RUEDA, E.; ROMAN, J.; FERNANDEZ, P.; LEON, P.; MENA, A.; CERVERA, J.; TORRES, A.; SANZ, M. A. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 88, n. 1, p. 19-24, 2003.

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.

NAKAGAWA, Y.; ABE, S.; KURATA, M.; HASEGAWA, M.; YAMAMOTO, K.; INOUE, M.; TAKEMURA, T.; SUZUKI, K.; KITAGAWA, M. IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. **Am J Hematol**, v. 81, n. 11, p. 824-31, 2006.

NAKAO, M.; YOKOTA, S.; IWAI, T.; KANEKO, H.; HORIIKE, S.; KASHIMA, K.; SONODA, Y.; FUJIMOTO, T.; MISAWA, S. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 10, n. 12, p. 1911-8, 1996.

NARAYANAN, S.; SHAMI, P. J. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 81, n. 1, p. 94-102, 2012.

NCCN. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Lymphoblastic Leukemia. 2012a.

Disponível em: <

[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/all.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/all.pdf) >. Acesso em: 28 de agosto de 2012.

\_\_\_\_\_. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Myeloid Leukemia. 2012b. Disponível em: < [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/aml.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf) >. Acesso em: 28 de agosto de 2012.

NORGAARD, J. M.; OLESEN, L. H.; HOKLAND, P. Changing picture of cellular drug resistance in human leukemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 50, n. 1, p. 39-49, 2004.

NORONHA, E. P.; MARINHO, H. T.; THOMAZ, E. B.; SILVA, C. A.; VERAS, G. L.; OLIVEIRA, R. A. Immunophenotypic characterization of acute leukemia at a public oncology reference center in Maranhao, northeastern Brazil. **Sao Paulo Med J**, v. 129, n. 6, p. 392-401, 2011.

PAGNANO, K. B.; TRAINA, F.; TAKAHASHI, T.; OLIVEIRA, G. B.; ROSSINI, M. S.; LORAND-METZE, I.; VIGORITO, A. C.; MIRANDA, E. C.; DE SOUZA, C. A. Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience. **Sao Paulo Med J**, v. 118, n. 6, p. 173-8, 2000.

PALL, G.; SPITALER, M.; HOFMANN, J.; THALER, J.; LUDESCHER, C. Multidrug resistance in acute leukemia: a comparison of different diagnostic methods. **Leukemia**, v. 11, n. 7, p. 1067-72, 1997.

PALLIS, M.; HILLS, R.; WHITE, P.; GRUNDY, M.; RUSSELL, N.; BURNETT, A. Analysis of the interaction of induction regimens with p-glycoprotein expression in patients with acute myeloid leukaemia: results from the MRC AML15 trial. **Blood Cancer J**, v. 1, n. 6, p. e23, 2011.

PARK, S. W.; LOMRI, N.; SIMEONI, L. A.; FRUEHAUF, J. P.; MECHETNER, E. Analysis of P-glycoprotein-mediated membrane transport in human peripheral blood lymphocytes using the UIC2 shift assay. **Cytometry A**, v. 53, n. 2, p. 67-78, 2003.

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.

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

PENG, H. L.; ZHANG, G. S.; GONG, F. J.; SHEN, J. K.; ZHANG, Y.; XU, Y. X.; ZHENG, W. L.; DAI, C. W.; PEI, M. F.; YANG, J. J. Fms-like tyrosine kinase (FLT) 3 and FLT3 internal tandem duplication in different types of adult leukemia: analysis of 147 patients. **Croat Med J**, v. 49, n. 5, p. 650-69, 2008.

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.

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.

PLESA, C.; CHELGHOUM, Y.; PLESA, A.; ELHAMRI, M.; TIGAUD, I.; MICHALLET, M.; DUMONTET, C.; THOMAS, X. Prognostic value of immunophenotyping in elderly patients with acute myeloid leukemia: a single-institution experience. **Cancer**, v. 112, n. 3, p. 572-80, 2008.

PULTE, D.; GONDOS, A.; BRENNER, H. Expected long-term survival of patients diagnosed with acute myeloblastic leukemia during 2006-2010. **Ann Oncol**, v. 21, n. 2, p. 335-341, 2010.

PULTE, D.; REDANIEL, M. T.; JANSEN, L.; BRENNER, H.; JEFFREYS, M. Recent trends in survival of adult patients with acute leukemia: overall improvements, but persistent and partly increasing disparity in survival of patients from minority groups. **Haematologica**, v. 98, n. 2, p. 222-9, 2013.

RAMAKERS-VAN WOERDEN, N. L.; PIETERS, R.; HOELZER, D.; SLATER, R. M.; DEN BOER, M. L.; LOONEN, A. H.; HARBOTT, J.; JANKA-SCHAUB, G. E.; LUDWIG, W. D.; OSSENKOPPELE, G. J.; VAN WERING, E. R.; VEERMAN, A. J. In vitro drug resistance profile of Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia is heterogeneous and related to age: a report of the Dutch and German Leukemia Study Groups. **Med Pediatr Oncol**, v. 38, n. 6, p. 379-86, 2002.

RAO, D. N.; ANURADHA, C.; VISHNUPRIYA, S.; SAILAJA, K.; SUREKHA, D.; RAGHUNADHARAO, D.; RAJAPPA, S. Association of an MDR1 gene (C3435T) polymorphism with acute leukemia in India. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 11, n. 4, p. 1063-6, 2010.

RASPADORI, D.; DAMIANI, D.; LENOCI, M.; RONDELLI, D.; TESTONI, N.; NARDI, G.; SESTIGIANI, C.; MARIOTTI, C.; BIRTOLO, S.; TOZZI, M.; LAURIA, F. CD56 antigenic expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor clinical prognosis. **Leukemia**, v. 15, n. 8, p. 1161-4, 2001.

REGO, M. F.; PINHEIRO, G. S.; METZE, K.; LORAND-METZE, I. Acute leukemias in Piauí: comparison with features observed in other regions of Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 3, p. 331-7, 2003.

RIBEIRO, R. C.; REGO, E. Management of APL in developing countries: epidemiology, challenges and opportunities for international collaboration. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 162-8, 2006.

RIBERA, J. M.; ORIOL, A.; SANZ, M. A.; TORMO, M.; FERNANDEZ-ABELLAN, P.; DEL POTRO, E.; ABELLA, E.; BUENO, J.; PARODY, R.; BASTIDA, P.; GRANDE, C.; HERAS, I.; BETHENCOURT, C.; FELIU, E.; ORTEGA, J. J. Comparison of the results of the treatment of adolescents and young adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia with the Programa Espanol de Tratamiento en Hematologia pediatric-based protocol ALL-96. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 11, p. 1843-9, 2008.

RIBERA, J. M. Optimal approach to treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: how to best use all the available tools. **Leuk Lymphoma**, v. 54, n. 1, p. 21-7, 2013.

RINALDI, C. R.; RINALDI, P.; GEMEI, M.; GRIMALDI, F.; BATTIPAGLIA, G.; DEL VECCHIO, L.; MARTINO, B.; SPECCHIA, G.; CANDONI, A.; GUGLIOTTA, L.; VANNUCCHI, A. M.; BARBUI, T.; PANE, F. JAK2V617F mutation persists in blasts and mature cells of transformed JAK2V617F-positive-myeloproliferative neoplasia: a European Leukemia Net (ENL) study. **Am J Hematol**, v. 85, n. 5, p. 383-386, 2010.

ROBEY, R. W.; SHUKLA, S.; FINLEY, E. M.; OLDHAM, R. K.; BARNETT, D.; AMBUDKAR, S. V.; FOJO, T.; BATES, S. E. Inhibition of P-glycoprotein (ABCB1)- and multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1)-mediated transport by the orally administered inhibitor, CBT-1((R)). **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 6, p. 1302-12, 2008.

ROBOZ, G. J. Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2011, p. 43-50, 2011.

ROCKOVA, V.; ABBAS, S.; WOUTERS, B. J.; ERPELINCK, C. A.; BEVERLOO, H. B.; DELWEL, R.; VAN PUTTEN, W. L.; LOWENBERG, B.; VALK, P. J. Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. **Blood**, v. 118, n. 4, p. 1069-76, 2011.

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.

RUMJANEK, V. M.; TRINDADE, G. S.; WAGNER-SOUZA, K.; MELETTI-DE-OLIVEIRA, M. C.; MARQUES-SANTOS, L. F.; MAIA, R. C.; CAPELLA, M. A. M. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **An. Acad. Bras. Ci**, v. 73, n. 1, p. 58-69, 2000.

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.

SANDES, A. F.; RIBEIRO, J. C.; BARROSO, R. S.; SILVA, M. R.; CHAUFFAILLE, M. L. Improving the outcomes of elderly patients with acute myeloid leukemia in a Brazilian University Hospital. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 66, n. 8, p. 1335-40, 2011.

SANTOS, F. P.; JONES, D.; QIAO, W.; CORTES, J. E.; RAVANDI, F.; ESTEY, E. E.; VERMA, D.; KANTARJIAN, H.; BORTHAKUR, G. Prognostic value of FLT3 mutations among different cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 10, p. 2145-55, 2011.

SANZ, M. A.; MONTESINOS, P.; RAYON, C.; HOLOWIECKA, A.; DE LA SERNA, J.; MILONE, G.; DE LISA, E.; BRUNET, S.; RUBIO, V.; RIBERA, J. M.; RIVAS, C.; KRSNIK, I.; BERGUA, J.; GONZALEZ, J.; DIAZ-MEDIAVILLA, J.; ROJAS, R.; MANSO, F.; OSSENKOPPELE, G.; GONZALEZ, J. D.; LOWENBERG, B. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia based on all-trans retinoic acid and anthracycline with addition of cytarabine in consolidation therapy for high-risk patients: further improvements in treatment outcome. **Blood**, v. 115, n. 25, p. 5137-5146, 2010.

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.

SCHEINER, M. A.; DA CUNHA VASCONCELOS, F.; DA MATTA, R. R.; DAL BELLO FIGUEIRA, R., JR.; MAIA, R. C. ABCB1 genetic variation and P-glycoprotein expression/activity in a cohort of Brazilian acute myeloid leukemia patients. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 138, n. 6, p. 959-69, 2012.

SCHELLONGOWSKI, P.; STAUDINGER, T.; KUNDI, M.; LACZIKA, K.; LOCKER, G. J.; BOJIC, A.; ROBAK, O.; FUHRMANN, V.; JAGER, U.; VALENT, P.; SPERR, W. R. Prognostic factors for intensive care unit admission, intensive care outcome, and post-intensive care survival in patients with de novo acute myeloid leukemia: a single center experience. **Haematologica**, v. 96, n. 2, p. 231-7, 2011.

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.

SCHLENK, R. F.; DOHNER, K.; KRAUTER, J.; FROHLING, S.; CORBACIOGLU, A.; BULLINGER, L.; HABDANK, M.; SPATH, D.; MORGAN, M.; BENNER, A.; SCHLEGELBERGER, B.; HEIL, G.; GANSER, A.; DOHNER, H. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 358, n. 18, p. 1909-18, 2008.

SCHLETTE, E. J.; MEDEIROS, L. J.; GOY, A.; LAI, R.; RASSIDAKIS, G. Z. Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 9, p. 1682-8, 2004.

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. 186-93, 1995.

SCHNITTGER, S.; SCHOCH, C.; DUGAS, M.; KERN, W.; STAIB, P.; WUCHTER, C.; LOFFLER, H.; SAUERLAND, C. M.; SERVE, H.; BUCHNER, T.; HAFERLACH, T.; HIDDEMANN, W. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. **Blood**, v. 100, n. 1, p. 59-66, 2002.

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.

SEO, T.; URASAKI, Y.; TAKEMURA, H.; UEDA, T. Arsenic trioxide circumvents multidrug resistance based on different mechanisms in human leukemia cell lines. **Anticancer Res**, v. 25, n. 2A, p. 991-8, 2005.

SERTEL, S.; TOME, M.; BRIEHL, M. M.; BAUER, J.; HOCK, K.; PLINKERT, P. K.; EFFERTH, T. Factors determining sensitivity and resistance of tumor cells to arsenic trioxide. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35584, 2012.

SHAFFER, B. C.; GILLET, J. P.; PATEL, C.; BAER, M. R.; BATES, S. E.; GOTTESMAN, M. M. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. **Drug Resist Updat**, v. 15, n. 1-2, p. 62-9, 2012.

SHEIKHHA, M. H.; AWAN, A.; TOBAL, K.; LIU YIN, J. A. Prognostic significance of FLT3 ITD and D835 mutations in AML patients. **Hematol J**, v. 4, n. 1, p. 41-6, 2003.

SHIH, L. Y.; KUO, M. C.; LIANG, D. C.; HUANG, C. F.; LIN, T. L.; WU, J. H.; WANG, P. N.; DUNN, P.; LAI, C. L. Internal tandem duplication and Asp835 mutations of the FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) gene in acute promyelocytic leukemia. **Cancer**, v. 98, n. 6, p. 1206-16, 2003.

SHINOHARA, E. T.; GONZALEZ, A.; MASSION, P. P.; CHEN, H.; LI, M.; FREYER, A. S.; OLSON, S. J.; ANDERSEN, J. J.; SHYR, Y.; CARBONE, D. P.; JOHNSON, D. H.; HALLAHAN, D. E.; LU, B. Nuclear survivin predicts recurrence and poor survival in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer**, v. 103, n. 8, p. 1685-92, 2005.

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

SHMAN, T. V.; FEDASENKA, U. U.; SAVITSKI, V. P.; ALEINIKOVA, O. V. CD34+ leukemic subpopulation predominantly displays lower spontaneous apoptosis and has higher expression levels of Bcl-2 and MDR1 genes than CD34- cells in childhood AML. **Ann Hematol**, v. 87, n. 5, p. 353-60, 2008.

SILLA, L. M. R.; DULLEY, F.; SABOYA, R.; PATON, E.; KERBAUY, F.; ARANTES, A. M.; HAMERSCHLAK, N. Transplante de células-tronco hematopoéticas e leucemia mieloide aguda: diretrizes brasileiras. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n. Supl. 1, p. 61-65, 2010.

SIVA, A. C.; RAVAL-FERNANDES, S.; STEPHEN, A. G.; LAFEMINA, M. J.; SCHEPER, R. J.; KICKHOEFER, V. A.; ROME, L. H. Up-regulation of vaults may be necessary but not sufficient for multidrug resistance. **Int J Cancer**, v. 92, n. 2, p. 195-202, 2001.

SMALL, D. Targeting FLT3 for the treatment of leukemia. **Semin Hematol**, v. 45, n. 3 Suppl 2, p. S17-21, 2008.

SMALL, S.; KEERTHIVASAN, G.; HUANG, Z.; GURBUXANI, S.; CRISPINO, J. D. Overexpression of survivin initiates hematologic malignancies in vivo. **Leukemia**, v. 24, n. 11, p. 1920-1926, 2010.

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

SOUTO FILHO, J. T.; PORTUGAL, R. D.; LOUREIRO, M.; PULCHERI, W.; NUCCI, M. Characterization and analysis of the outcome of adults with acute myeloid leukemia treated in a Brazilian University hospital over three decades. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 7, p. 660-5, 2011.

STEINBACH, D.; LEGRAND, O. ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra? **Leukemia**, v. 21, n. 6, p. 1172-6, 2007.

STOCK, W.; JOHNSON, J. L.; STONE, R. M.; KOLITZ, J. E.; POWELL, B. L.; WETZLER, M.; WESTERVELT, P.; MARCUCCI, G.; DEANGELO, D. J.; VARDIMAN, J. W.; MCDONNELL, D.; MROZEK, K.; BLOOMFIELD, C. D.; LARSON, R. A. Dose intensification of daunorubicin and cytarabine during treatment of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Cancer and Leukemia Group B Study 19802. **Cancer**, v. 119, n. 1, p. 90-8, 2013.

STYCZYNSKI, J.; WYSOCKI, M.; DEBSKI, R.; CZYZEWSKI, K.; KOŁODZIEJ, B.; RAFINSKA, B.; KUBICKA, M.; KOLTAN, S.; KOLTAN, A.; POGORZALA, M.; KURYŁAK, A.; OLSZEWSKA-SŁONINA, D.; BALWIERZ, W.; JURASZEWSKA, E.; WIECZOREK, M.; OLEJNIK, I.; KRAWCZUK-RYBAK, M.; KUZMICZ, M.; KOWALCZYK, J.; STEFANIAK, J.; BADOWSKA, W.; SONTA-JAKIMCZYK, D.; SZCZEPANSKI, T.; MATYSIAK, M.; MALINOWSKA, I.; STANCZAK, E.; WACHOWIAK, J.; KONATKOWSKA, B.; GIL, L.; BALCERSKA, A.; MACIEJKA-KAPUSCINSKA, L. Predictive value of multidrug resistance proteins and cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 133, n. 11, p. 875-93, 2007.

SUGAHARA, K.; UEMURA, A.; HARASAWA, H.; NAGAI, H.; HIRAKATA, Y.; TOMONAGA, M.; MURATA, K.; SOHDA, H.; NAKAGOE, T.; SHIBASAKI, S.; YAMADA, Y.; KAMIHIRA, S. Clinical relevance of survivin as a biomarker in neoplasms, especially in adult T-cell leukemias and acute leukemias. **Int J Hematol**, v. 80, n. 1, p. 52-8, 2004.

SUNNARAM, B. L.; GANDEMER, V.; SEBILLOT, M.; GRANDGIRARD, N.; AMIOT, L.; LERAY, E.; GOASGUEN, J. E. LRP overexpression in monocytic lineage. **Leuk Res**, v. 27, n. 8, p. 755-9, 2003.

SUVANNASANKHA, A.; MINDERMAN, H.; O'LOUGHLIN, K. L.; SAIT, S. N.; STEWART, C. C.; GRECO, W. R.; BAER, M. R. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is not associated with P-glycoprotein overexpression in core-binding factor acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v. 28, n. 5, p. 449-55, 2004.

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. 439p.

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.

TAKAHASHI, S. Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. **J Hematol Oncol**, v. 4, p. 13, 2011.

TAKENOKUCHI, M.; KAWANO, S.; NAKAMACHI, Y.; SAKOTA, Y.; SYAMPURNAWATI, M.; SAIGO, K.; TATSUMI, E.; KUMAGAI, S. FLT3/ITD associated with an immature immunophenotype in PML-RAR $\alpha$  leukemia. **Hematol Rep**, v. 4, n. 4, p. e22, 2012.

TANAKA, H.; KATO, K.; YAMASHITA, E.; SUMIZAWA, T.; ZHOU, Y.; YAO, M.; IWASAKI, K.; YOSHIMURA, M.; TSUKIHARA, T. The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution. **Science**, v. 323, n. 5912, p. 384-8, 2009.

THIEDE, C.; STEUDEL, C.; MOHR, B.; SCHAICH, M.; SCHAKEL, U.; PLATZBECKER, U.; WERMKE, M.; BORNHAUSER, M.; RITTER, M.; NEUBAUER, A.; EHNINGER, G.; ILLMER, T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. **Blood**, v. 99, n. 12, p. 4326-35, 2002.

TIFTIK, N.; BOLAMAN, Z.; BATUN, S.; AYYILDIZ, O.; ISIKDOGAN, A.; KADIKOYLU, G.; MUFTUOGLU, E. The importance of CD7 and CD56 antigens in acute leukaemias. **Int J Clin Pract**, v. 58, n. 2, p. 149-52, 2004.

TOFT, N.; SCHMIEGELOW, K.; KLAUSEN, T. W.; BIRGENS, H. Adult acute lymphoblastic leukaemia in Denmark. A national population-based retrospective study on acute lymphoblastic leukaemia in Denmark 1998-2008. **Br J Haematol**, v. 157, n. 1, p. 97-104, 2012.

TONG, X. Z.; WANG, F.; LIANG, S.; ZHANG, X.; HE, J. H.; CHEN, X. G.; LIANG, Y. J.; MI, Y. J.; TO, K. K.; FU, L. W. Apatinib (YN968D1) enhances the efficacy of conventional chemotherapeutical drugs in side population cells and ABCB1-overexpressing leukemia cells. **Biochem Pharmacol**, v. 83, n. 5, p. 586-97, 2012.

TSIMBERIDOU, A. M.; PATERAKIS, G.; ANDROUTSOS, G.; ANAGNOSTOPOULOS, N.; GALANOPOULOS, A.; KALMANTIS, T.; MELETIS, J.; ROMBOS, Y.; SAGRITIS, 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.

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.

VAN DER KOLK, D. M.; DE VRIES, E. G.; VAN PUTTEN, W. J.; VERDONCK, L. F.; OSSENKOPPELE, G. J.; VERHOEF, G. E.; VELLENGA, E. P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 8, p. 3205-14, 2000.

VAN DONGEN, J. J.; MACINTYRE, E. A.; GABERT, J. A.; DELABESSE, E.; ROSSI, V.; SAGLIO, G.; GOTTARDI, E.; RAMBALDI, A.; DOTTI, G.; GRIESINGER, F.; PARREIRA, A.; GAMEIRO, P.; DIAZ, M. G.; MALEC, M.; LANGERAK, A. W.; SAN MIGUEL, J. F.; BIONDI, A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. **Leukemia**, v. 13, n. 12, p. 1901-28, 1999.

VAN GROTEL, M.; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; VAN WERING, E. R.; VAN NOESEL, M. M.; KAMPS, W. A.; VEERMAN, A. J.; PIETERS, R.; MEIJERINK, J. P. CD34 expression is associated with poor survival in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia.

**Pediatr Blood Cancer**, v. 51, n. 6, p. 737-40, 2008.

VAN ZON, A.; MOSSINK, M. H.; SCHOESTER, M.; SCHEPER, R. J.; SONNEVELD, P.; WIEMER, E. A. Efflux kinetics and intracellular distribution of daunorubicin are not affected by major vault protein/lung resistance-related protein (vault) expression. **Cancer Res**, v. 64, n. 14, p. 4887-92, 2004.

VARMA, N.; VARMA, S. Proliferative indices, cytogenetics, immunophenotype and other prognostic parameters in myelodysplastic syndromes. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 51, n. 1, p. 97-101, 2008.

VELCULESCU, V. E.; MADDEN, S. L.; ZHANG, L.; LASH, A. E.; YU, J.; RAGO, C.; LAL, A.; WANG, C. J.; BEAUDRY, G. A.; CIRIELLO, K. M.; COOK, B. P.; DFAULT, M. R.; FERGUSON, A. T.; GAO, Y.; HE, T. C.; HERMEKING, H.; HIRALDO, S. K.; HWANG, P. M.; LOPEZ, M. A.; LUDERER, H. F.; MATHEWS, B.; PETROZIELLO, J. M.; POLYAK, K.; ZAWEL, L.; KINZLER, K. W.; ET AL. Analysis of human transcriptomes. **Nat Genet**, v. 23, n. 4, p. 387-8, 1999.

VITALE, A.; GUARINI, A.; ARIOLA, C.; MANCINI, M.; MECUCCI, C.; CUNEO, A.; PANE, F.; SAGLIO, G.; CIMINO, G.; TAFURI, A.; MELONI, G.; FABBIANO, F.; RECCHIA, A.; KROPP, M. G.; KRAMPERA, M.; CASCAVILLA, N.; FERRARA, F.; ROMANO, A.; MAZZA, P.; FOZZA, C.; PAOLONI, F.; VIGNETTI, M.; FOA, R. Adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: biologic profile at presentation and correlation with response to induction treatment in patients enrolled in the GIMEMA LAL 0496 protocol. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 473-9, 2006.

WANG, W.; WANG, X. Q.; XU, X. P.; LIN, G. W. Prevalence and prognostic significance of FLT3 gene mutations in patients with acute leukaemia: analysis of patients from the Shanghai Leukaemia Co-operative Group. **J Int Med Res**, v. 38, n. 2, p. 432-442, 2010.

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

WEISSER, M.; KERN, W.; RAUHUT, S.; SCHOCH, C.; HIDDEMANN, W.; HAFERLACH, T.; SCHNITTGER, S. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 19, n. 8, p. 1416-23, 2005a.

WEISSER, M.; KERN, W.; SCHOCH, C.; HIDDEMANN, W.; HAFERLACH, T.; SCHNITTGER, S. Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the MLL gene in acute myeloid leukemia during therapy. **Haematologica**, v. 90, n. 7, p. 881-9, 2005b.

WHITMAN, S. P.; RUPPERT, A. S.; RADMACHER, M. D.; MROZEK, K.; PASCHKA, P.; LANGER, C.; BALDUS, C. D.; WEN, J.; RACKE, F.; POWELL, B. L.; KOLITZ, J. E.; LARSON, R. A.; CALIGIURI, M. A.; MARCUCCI, G.; BLOOMFIELD, C. D. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1552-9, 2008.

WONG, I. L.; CHAN, K. F.; TSANG, K. H.; LAM, C. Y.; ZHAO, Y.; CHAN, T. H.; CHOW, L. M. Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1)-mediated multidrug resistance by bivalent apigenin homodimers and their derivatives. **J Med Chem**, v. 52, n. 17, p. 5311-22, 2009.

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.

YAGHMAIE, M.; ALIMOGHADDAM, K.; MOZDARANI, H.; GHAVAMZADEH, A.; HAJHASHEMI, M.; AZNAB, M.; GHAFFARI, S. H. Cytogenetic and FMS-like tyrosine kinase 3 mutation analyses in acute promyelocytic leukemia patients. **Iran Biomed J**, v. 16, n. 1, p. 10-7, 2012.

YAMAMOTO, J. F.; GOODMAN, M. T. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. **Cancer Causes Control**, v. 19, n. 4, p. 379-90, 2008.

YAMAMOTO, Y.; KIYOI, H.; NAKANO, Y.; SUZUKI, R.; KODERA, Y.; MIYAWAKI, S.; ASOU, N.; KURIYAMA, K.; YAGASAKI, F.; SHIMAZAKI, C.; AKIYAMA, H.; SAITO, K.; NISHIMURA, M.; MOTOJI, T.; SHINAGAWA, K.; TAKESHITA, A.; SAITO, H.; UEDA, R.; OHNO, R.; NAOE, T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2434-9, 2001.

YASUNAMI, T.; WANG, Y. H.; TSUJI, K.; TAKANASHI, M.; YAMADA, Y.; MOTOJI, T. Multidrug resistance protein expression of adult T-cell leukemia/lymphoma. **Leuk Res**, v. 31, n. 4, p. 465-70, 2007.

YE, C. G.; WU, W. K.; YEUNG, J. H.; LI, H. T.; LI, Z. J.; WONG, C. C.; REN, S. X.; ZHANG, L.; FUNG, K. P.; CHO, C. H. Indomethacin and SC236 enhance the cytotoxicity of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma cells via inhibiting P-glycoprotein and MRP1 expression. **Cancer Lett**, v. 304, n. 2, p. 90-6, 2011.

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.

ZHAO, R.; XING, S.; LI, Z.; FU, X.; LI, Q.; KRANTZ, S. B.; ZHAO, Z. J. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. **J Biol Chem**, v. 280, n. 24, p. 22788-22792, 2005.



**APÊNDICE A – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo**

<b>Caso</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Idade (anos)	44	47	17	73	15
Gênero	F	F	M	F	F
Diagnóstico	LMA mielomonocítica	LPA	LLA-B comum	LMA c/ maturação	LPA
Leuco (x10 <sup>3</sup> /µL)	160,4	3,1	24,5	7,5	81,9
Blastos (%)	40,0	52,0	45,0	77,0	97,2
LDH	3060	399	329	177	469
CD34	+	-	-/+	++	-/+
CD56	+fr	-/+		-	-
<i>abcb1</i>	0,00	0,77	1,10	0,60	0,00
<i>abcc1</i>	0,85	0,92	1,09	0,99	0,80
<i>lrp</i>	0,61	0,77	0,74	0,69	0,00
ABCBI	NR	NR	NR	NR	2,09
ABCC1	NR	NR	NR	NR	0,61
LRP	NR	NR	NR	NR	0,00
<i>FLT3-DIT</i>	NR	NR	NR	NR	NR
<i>survivina</i>	-	-	-	-	-
DRM	-	-	-	+	-
Material	MO	SP	SP	MO	SP
Progressão	Ob em R	vivo	vivo	Ob sem R	vivo

Caso	6	7	8	9	10
Idade (anos)	29	32	20	46	58
Gênero	M	F	M	F	F
Diagnóstico	LLA-B t(9;22)	LMA c/ maturação	LLA-B comum	Eritroleucemia	LPA
Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	25,6	10,7	13,3	1,9	3,1
Blastos (%)	70,6	36,0	73,0	15,0	39,0
LDH	748	326	1609	131	378
CD34	+	++	-/+	-/+	NR
CD56	NR	5	NR	NR	NR
<i>abcb1</i>	0,00	1,32	0,00	0,67	0,00
<i>abcc1</i>	0,99	0,00	0,83	0,00	0,89
<i>lrp</i>	0,66	0,00	0,69	0,83	0,76
ABCBI	NR	62,67	116,15	49,20	6,20
ABCCI	NR	2,82	1,32	2,58	0,75
LRP	NR	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>FLT3-DIT</i>	NR	NR	NR	NR	NR
<i>survivina</i>	-	-	+	-	-
DRM	-	+	-	+	+
Material	SP	SP	SP	MO	SP
Progressão	Ob em R	Ob sem R	vivo	Ob sem R	Ob sem R

Caso	11	12	13	14	15
Idade (anos)	48	60	46	20	84
Gênero	M	M	M	M	M
Diagnóstico	LMA com maturação	LLA-B comum	LPA	LLA-T	LMA com maturação
Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	59,7	0,7	1,0	3,0	76,7
Blastos (%)	69,0	60,2	61,0	NR	24,0
LDH	0	137	152	147	201
CD34	-	+	-	NR	+
CD56	NR	NR	NR	NR	+
<i>abcb1</i>	0,54	1,09	0,00	NR	1,18
<i>abcc1</i>	0,74	0,62	0,50	NR	0,98
<i>lrp</i>	0,89	0,62	0,00	NR	0,99
ABCBI	1,65	NR	2,98	1,51	1,48
ABCC1	1,06	NR	1,14	0,65	2,37
LRP	0,00	NR	0,00	0,00	0,00
<i>FLT3-DIT</i>	NR	NR	NR	NR	NR
<i>survivina</i>	+	-	-	NR	-
DRM	-	+	-	-	+
Material	SP	MO	MO	MO	SP
Progressão	Ob em R	Ob sem R	vivo	Ob em R	Ob sem R

Caso	16	17	18	19	20
Idade (anos)	22	28	63	41	17
Gênero	M	M	F	F	F
Diagnóstico	LPA	LLA-B comum	LMA secundária à NMP	LLA-B pró-B	LLA-B pré-B
Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,9	1,8	4,2	4,0	1,3
Blastos (%)	75,0		80,0	5,4	6,0
LDH	178	244	195	345	17
CD34	-/+	++	-	++	+
CD56	NR	NR	-	NR	NR
<i>abcb1</i>	0,00	0,00	0,82	NR	NR
<i>abcc1</i>	0,94	0,87	0,00	NR	NR
<i>irp</i>	1,12	0,86	0,00	NR	NR
ABCBI	NR	NR	83,70	14,51	4,46
ABCCI	NR	NR	3,02	1,40	1,57
LRP	NR	NR	0,00	0,00	0,00
<i>FLT3-DIT</i>	NR	NR	NR	NR	-
<i>survivina</i>	-	+	-	NR	NR
DRM	-	-	+	+	-
Material	SP	SP	SP	SP	MO
Progressão	vivo	vivo	Ob sem R	Ob sem R	Ob em R

<b>Caso</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>
Idade (anos)	34	64	52	46	16
Gênero	M	M	M	F	F
Diagnóstico	LPA	LMA s/ maturação	LMA c/ maturação	LLA-T	LLA-T
Leuco (x103/ $\mu$ L)	1,4	1,1	143,0	33,3	10,6
Blastos (%)	72,0	NR	56,0	90,0	89,0
LDH	151	NR	736	244	16
CD34	-	NR	-/+	+ /+++	++
CD56	-/+	NR	-	-	-
<i>abcb1</i>	0,00	NR	0,00	0,00	NR
<i>abcc1</i>	0,75	NR	0,86	0,00	NR
<i>lrp</i>	0,00	NR	0,00	0,00	NR
ABCBI	NR	1,35	2,74	2,02	4,99
ABCCI	NR	1,13	1,66	1,24	1,74
LRP	NR	0,00	0,00	0,00	0,00
FLT3-DIT	NR	NR	-	-	-
<i>survivina</i>	-	NR	-	NR	NR
DRM	-	-	+	+	-
Material	MO	MO	SP	SP	SP
Progressão	Ob em R	Ob em R	Ob sem R	Ob sem R	vivo

Caso	26	27	28	29	30
Idade (anos)	55	25	55	45	54
Gênero	F	F	F	M	M
Diagnóstico	LMA c/ mínima diferenciação	LPA	LPA	LPA	LMA monocítica
Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	25,2	0,3	1,3	4,5	34,8
Blastos (%)	48,5			74,0	7,0
LDH	254	192	273	257	183
CD34	+	NR	NR	-	-
CD56	-	NR	NR	-	-
<i>abcb1</i>	NR	1,08	0,00	0,00	0,00
<i>abcc1</i>	NR	0,00	0,00	0,67	0,74
<i>irp</i>	NR	0,00	0,00	0,00	0,00
ABCB1	3,52	1,87	4,90	29,46	26,77
ABCC1	1,57	1,25	1,29	2,00	1,59
LRP	0,00	1,69	0,32	0,10	0,13
<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-	-	-
<i>survivina</i>	NR	-	-	-	-
DRM	-	-	-	-	+
Material	SP	MO	SP	SP	SP
Progressão	Ob em R	vivo	vivo	vivo	Ob sem R

<b>Caso</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>
Idade (anos)	23	25	23	77	87
Gênero	M	F	M	M	M
Diagnóstico	LPA	LPA	LPA	LMA s/ maturação	LMA secundária à SMD
Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1,9	0,7	44,6	2,2	1,2
Blastos (%)	64,0		90,0	45,0	0,1
LDH	327	381	871	268	173
CD34	-	NR	+ /+++	+	+
CD56	-	NR	-	- /+	+
<i>abcb1</i>	0,00	NR	0,00	0,00	NR
<i>abcc1</i>	0,00	NR	0,86	1,08	NR
<i>irp</i>	0,00	NR	0,00	0,00	NR
ABCB1	2,31	21,48	4,71	NR	1,16
ABCC1	1,05	5,32	5,64	NR	0,49
LRP	0,39	0,04	0,59	NR	1,41
<i>FLT3-DIT</i>	-	-	DIT	-	NR
<i>survivina</i>	-	NR	-	-	NR
DRM	-	-	-	+	-
Material	SP	MO	SP	MO	MO
Progressão	vivo	Ob em R	vivo	Ob sem R	vivo

Caso	36	37	38	39	40
Idade (anos)	65	58	35	51	57
Gênero	F	F	M	F	F
Diagnóstico	LMA megacarioblástica	LMA com maturação	LMA secundária à SMD	LLA-B comum	LMA s/ maturação
Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	5,9	3,4	2,0	288,7	19,3
Blastos (%)	32,0	55,0	10,0	96,0	13,0
LDH	277	194	405	875	414
CD34	NR	-/+	+	NR	++
CD56	+/++	-	-	NR	-/+
<i>abcb1</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>abcc1</i>	0,96	0,96	7,35	0,74	0,90
<i>irp</i>	0,00	0,00	0,00	0,91	0,91
ABCBI	4,29	10,77	NR	NR	NR
ABCCI	1,14	0,00	NR	NR	NR
LRP	9,34	39,93	NR	NR	NR
<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-	DIT	DIT
<i>survivina</i>	-	-	-	-	-
DRM	-	-	-	+	-
Material	MO	SP	MO	SP	MO
Progressão	Ob em R	vivo	Ob em R	Ob sem R	vivo

Caso	41	42	43	44	45
Idade (anos)	29	39	31	40	70
Gênero	F	F	M	F	M
Diagnóstico	LMA com t(8;21)	LMA com t(8;21)	LLA-B pré-B	LLA-B t(9;22)	LMA monoblastica
Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	56,1	13,0	2,8	12,0	39,6
Blastos (%)	78,0		25,0	47,0	NR
LDH	584	1792	367	407	1455
CD34	+/++	++	-/+	++	NR
CD56	+	+	NR	NR	NR
<i>abcb1</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57
<i>abcc1</i>	1,17	0,89	1,08	1,10	0,73
<i>irp</i>	0,82	0,00	0,00	0,00	1,01
ABCB1	1,20	9,40	NR	13,74	5,04
ABCC1	1,02	1,32	NR	7,54	1,02
LRP	3,49	17,60	NR	1,00	11,40
<i>FLT3-DIT</i>	-	D835	-	-	-
<i>survivalina</i>	-	-	-	-	+
DRM	-	-	-	-	+
Material	SP	MO	MO	SP	MO
Progressão	vivo	vivo	vivo	vivo	Ob sem R

Caso	46	47	48	49	50
Idade (anos)	70	36	42	25	17
Gênero	M	F	F	M	F
Diagnóstico	LMA	LMA s/ maturação	LLA-T	LPA	LLA-B comum
Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	29,8	2,4	2,3	1,3	2,3
Blastos (%)	NR	20,0	93,1	24,0	54,0
LDH	NR	188	567	189	572
CD34	NR	++	-	-	-
CD56	NR	NR	-	-	NR
<i>abcb1</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>abcc1</i>	0,89	0,84	0,78	0,00	0,79
<i>lrp</i>	1,01	0,91	0,73	0,00	1,38
ABCBI	NR	0,00	NR	1,68	1,21
ABCCI	NR	0,00	NR	1,06	0,88
LRP	NR	8,51	NR	2,48	0,00
<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-	-	-
<i>survivina</i>	-	-	+	-	-
DRM	-	-	-	-	-
Material	SP	MO	MO	SP	SP
Progressão	Ob em R	vivo	Ob em R	vivo	vivo

Caso	51	52	53	54	55
Idade (anos)	29	58	19	81	23
Gênero	M	M	F	F	M
Diagnóstico	LMA monoblástica	LLA-B comum	LPA	LBA	LPA
Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	5,2	13,7	1,6	1,6	2,2
Blastos (%)	52,2	85,6	82,2	56,3	79,5
LDH	645	472	180	218	NR
CD34	-/+	++	-/+	++	-
CD56	+	NR	-	-/+	-
<i>abcb1</i>	NR	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>abcc1</i>	NR	1,08	0,92	0,75	0,95
<i>irp</i>	NR	1,18	0,87	0,67	0,72
ABCB1	1,57	1,61	4,06	2,12	1,42
ABCC1	1,00	1,04	1,16	1,08	1,12
LRP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>FLT3-DIT</i>	-	NR	-	-	-
<i>survivina</i>	NR	-	-	-	-
DRM	+	-	-	+	-
Material	SP	SP	MO	MO	MO
Progressão	Ob sem R	Ob em R	vivo	Ob sem R	Ob em R

<b>Caso</b>	<b>56</b>	<b>57</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>60</b>
Idade (anos)	26	28	58	29	48
Gênero	M	M	F	F	M
Diagnóstico	LPA	LLA-B comum	LLA-B t(9;22)	LLA-B comum	LLA-B t(9;22)
Leuco (x10 <sup>3</sup> /μL)	89,4	1,9	0,6	11,1	142,3
Blastos (%)	98,8	23,5	55,8	51,5	89,9
LDH	315	204	373	2111	3197
CD34	-	++	-/+	-/+	-/+
CD56	-/+		NR	NR	NR
<i>abcb1</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>abcc1</i>	0,44	0,54	0,76	0,81	0,92
<i>lrp</i>	0,66	0,81	0,68	0,87	0,86
ABCBI	1,49	NR	NR	1,51	1,78
ABCCI	0,98	NR	NR	1,37	0,91
LRP	0,00	NR	NR	0,00	2,61
<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-	-	-
<i>survivina</i>	-	-	-	-	-
DRM	-	-	-	+	+
Material	SP	MO	MO	SP	SP
Progressão	vivo	vivo	Ob em R	Ob sem R	Ob sem R

Caso	61	62	63	64	65
Idade (anos)	15	34	41	58	17
Gênero	M	M	M	M	F
Diagnóstico	LLA-B pré-B	LLA-T	LPA	LMA mielomonocítica	LLA-B t(9;22)
Leuco (x10 <sup>3</sup> /μL)	6,0	46,5	2,2	2,0	61,6
Blastos (%)	21,0	64,2		42,5	84,6
LDH	302	174	353	265	340
CD34	-/+	-	-	++	++
CD56	NR	-	-	-	NR
<i>abcb1</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>abcc1</i>	1,13	1,01	0,68	0,64	0,00
<i>lrp</i>	0,83	0,52	0,00	0,00	0,00
ABCBI	NR	NR	NR	2,08	1,55
ABCCI	NR	NR	NR	1,08	1,04
LRP	NR	NR	NR	0,00	6,74
<i>FLT3-DIT</i>	-	-	D835	-	-
<i>survivalina</i>	-	+	-	-	-
DRM	-	-	-	-	-
Material	MO	SP	MO	MO	SP
Progressão	vivo	vivo	vivo	Ob em R	vivo

Caso	66	67	68	69	70
Idade (anos)	87	37	48	76	25
Gênero	F	M	M	M	F
Diagnóstico	LPA	LLA-T	LLA-B pré-B	LMA mielomonocítica	LLA-T
Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	20,7	7,7	1,1	35,5	177,2
Blastos (%)	24,6	14,8	64,3	31,8	95,7
LDH		401	89	349	300
CD34	-	-	-	++	-/+
CD56	-	-	NR	-	NR
<i>abcb1</i>	NR	0,00	0,00	0,00	0,57
<i>abcc1</i>	NR	0,00	0,00	0,75	0,00
<i>irp</i>	NR	0,00	0,00	0,00	0,00
ABCBI	0,87	1,19	NR	NR	NR
ABCCI	1,23	1,05	NR	NR	NR
LRP	2,79	1,17	NR	NR	NR
<i>FLT3-DIT</i>	-	-	-	D835	-
<i>survivina</i>	NR	-	-	-	-
DRM	+	-	-	-	-
Material	SP	MO	MO	MO	MO
Progressão	Ob sem R	vivo	vivo	vivo	Ob em R

Caso	71	72	73	74	75
Idade (anos)	18	44	38	59	67
Gênero	M	F	M	F	M
Diagnóstico	LMA com t(8;21)	LMA monocítica	LMA s/ maturação	LPA	LBA
Leuco ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	25,7	14,9	25,4	1,6	5,7
Blastos (%)	62,0	7,8	28,5	26,1	83,4
LDH	273	490	1194	208	
CD34	+	-/+	-	-	+ /+++
CD56	-	NR	-	-	-
<i>abcb1</i>	0,84	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>abcc1</i>	0,00	0,75	0,64	0,00	0,00
<i>lrp</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ABC1	NR	NR	NR	NR	NR
ABCC1	NR	NR	NR	NR	NR
LRP	NR	NR	NR	NR	NR
<i>FLT3-DIT</i>	D835	-	-	-	-
<i>survivina</i>	-	-	-	-	-
DRM	-	-	-	-	-
Material	MO	MO	MO	MO	MO
Progressão	vivo	vivo	vivo	vivo	vivo

M – Masculino; F – Feminino; LMA – leucemia mieloide aguda; LLA – leucemia linfóide aguda; LPA – Leucemia promielocítica com t(15;17); LBA – Leucemia bifonotípica aguda; Leuco – Leucocitria; LDH – Lactato desidrogenase; DRM – Doença residual mínima; DIT – *FLT3-DIT*; D835 – *FLT3-D835*; (-) – negativo; (+) – positivo; NR – Não realizado; MO – Medula óssea; SP – Sangue periférico; Ob. Sem R – Óbito sem remissão; Ob. Em R – Óbito em remissão



**APÊNDICE B – Perfil *mdr*/MDR dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo no momento do diagnóstico e após o primeiro ciclo de terapia de indução**

Caso	2	3	5	6	8	10
Diagnóstico	LPA	LLA-B comum	LPA	LLA-B t(9;22)	LLA-B comum	LPA
<i>abcb1</i> 1° amostra	0,77	1,10	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>abcb1</i> 2° amostra	0,00	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>abcc1</i> 1° amostra	0,92	1,09	0,80	0,99	0,83	0,89
<i>abcc1</i> 2° amostra	0,74	0,00	0,00	0,75	0,95	0,94
<i>lrp</i> 1° amostra	0,77	0,74	0,00	0,66	0,69	0,76
<i>lrp</i> 2° amostra	0,00	0,95	0,00	0,84	1,02	0,00
ABCBI 1° amostra	NR	NR	2,09	NR	116,15	6,20
ABCBI 2° amostra	NR	NR	1,36	NR	57,60	43,64
ABCCI 1° amostra	NR	NR	0,61	NR	1,32	0,75
ABCCI 2° amostra	NR	NR	1,17	NR	3,21	1,82
LRP 1° amostra	NR	NR	0,00	NR	0,00	0,00
LRP 2° amostra	NR	NR	7,88	NR	0,00	0,00

Caso	12	13	16	17	18	21
Diagnóstico	LLA-B comum	LPA	LPA	LLA-B comum	LLA-B pró-B	LPA
<i>abcbI</i> 1° amostra	1,09	0,00	0,00	0,00	NR	0,00
<i>abcbI</i> 2° amostra	1,18	0,00	0,00	0,00	NR	1,01
<i>abccI</i> 1° amostra	0,62	0,50	0,94	0,87	NR	0,75
<i>abccI</i> 2° amostra	0,67	0,78	0,00	0,80	NR	0,74
<i>Irp</i> 1° amostra	0,62	0,00	1,12	0,86	NR	0,00
<i>Irp</i> 2° amostra	0,79	0,00	0,00	0,62	NR	0,95
ABCBI 1° amostra	NR	2,98	NR	NR	14,51	NR
ABCBI 2° amostra	NR	12,83	NR	NR	2,08	NR
ABCCI 1° amostra	NR	1,14	NR	NR	1,40	NR
ABCCI 2° amostra	NR	2,15	NR	NR	1,66	NR
LRP 1° amostra	NR	0,00	NR	NR	0,00	NR
LRP 2° amostra	NR	0,00	NR	NR	3,76	NR

<b>Caso</b>	<b>23</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>
<b>Diagnóstico</b>	LMA c/ maturação	LPA	LPA	LPA	LMA monocítica	LPA
<i>abcbl</i> 1° amostra	0,00	1,08	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>abcbl</i> 2° amostra	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,76
<i>abcc1</i> 1° amostra	0,86	0,00	0,00	0,67	0,74	0,00
<i>abcc1</i> 2° amostra	0,85	0,00	0,65	0,00	0,00	0,89
<i>lrp</i> 1° amostra	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>lrp</i> 2° amostra	0,00	0,00	0,73	0,00	1,10	0,00
ABCBI 1° amostra	2,74	1,87	4,90	29,46	26,77	2,31
ABCBI 2° amostra	NR	1,36	1,49	1,15	14,13	32,93
ABCCI 1° amostra	1,66	1,25	1,29	2,00	1,59	1,05
ABCCI 2° amostra	NR	1,14	1,07	0,33	2,96	4,42
LRP 1° amostra	0,00	1,69	0,32	0,10	0,13	0,39
LRP 2° amostra	NR	12,14	6,90	2,53	0,68	8,22

<b>Caso</b>	<b>33</b>	<b>37</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>44</b>
<b>Diagnóstico</b>	<b>LPA</b>	<b>LMA c/ maturação</b>	<b>LMA com t(8;21)</b>	<b>LMA com t(8;21)</b>	<b>LMA c/ maturação</b>	<b>LLA-B t(9;22)</b>
<i>abcb1</i> 1° amostra	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NR
<i>abcb1</i> 2° amostra	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NR
<i>abcc1</i> 1° amostra	0,86	0,96	0,90	1,17	0,89	NR
<i>abcc1</i> 2° amostra	0,91	0,00	0,88	0,73	0,00	NR
<i>lrp</i> 1° amostra	0,00	0,00	0,91	0,82	0,00	NR
<i>lrp</i> 2° amostra	0,95	0,98	1,11	0,60	0,96	NR
ABC <i>B1</i> 1° amostra	4,71	10,77	NR	1,20	9,40	13,74
ABC <i>B1</i> 2° amostra	1,76	3,51	NR	NR	0,58	25,16
ABC <i>CC1</i> 1° amostra	5,64	0,00	NR	1,02	1,32	7,54
ABC <i>CC1</i> 2° amostra	0,99	0,79	NR	NR	0,83	1,01
LRP 1° amostra	0,59	39,93	NR	3,49	17,60	1,00
LRP 2° amostra	8,24	12,97	NR	NR	0,00	10,92

<b>Caso</b>	<b>53</b>	<b>55</b>	<b>56</b>	<b>60</b>	<b>63</b>	<b>65</b>
Diagnóstico	LPA	LPA	LPA	LLA-B t(9;22)	LPA	LLA-B t(9;22)
<i>abcb1</i> 1° amostra	0,00	NR	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>abcb1</i> 2° amostra	0,00	NR	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>abcc1</i> 1° amostra	0,92	NR	0,44	0,92	0,68	0,00
<i>abcc1</i> 2° amostra	0,60	NR	0,42	0,79	0,83	0,00
<i>lrp</i> 1° amostra	0,87	NR	0,66	0,86	0,00	0,00
<i>lrp</i> 2° amostra	0,66	NR	0,00	1,11	0,00	0,00
ABCB1 1° amostra	4,06	1,42	1,49	1,78	NR	1,55
ABCB1 2° amostra	1,72	3,25	1,39	NR	NR	NR
ABCC1 1° amostra	1,16	1,12	0,98	0,91	NR	1,04
ABCC1 2° amostra	1,10	1,06	0,93	NR	NR	NR
LRP 1° amostra	0,00	0,00	0,00	2,61	NR	6,74
LRP 2° amostra	0,00	1,02	11,65	NR	NR	NR

1° amostra - Amostra coletada no momento do diagnóstico; 2° amostra - Amostra coletada após o primeiro ciclo de terapia de indução; LMA - Leucemia mieloide aguda; LLA - Leucemia linfóide aguda; LPA - Leucemia promielocítica com t(15;17); NR - Não realizado.



## ANEXO A – Aprovações do projeto de pesquisa pelo comitê de ética de pesquisa em seres humanos – CEPESH/UFSC



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - TELEFONE: 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: 738/03

**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 CEPESH: 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 CEPESH:**

- 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 CEPESH

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



**ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Departamento de Análises Clínicas - CCS  
Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil  
Tel: (048) 3721 9712  
Profa. Dra Maria Cláudia Santos da Silva  
email: maclau@ccs.ufsc.br

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Meu nome é Ana Carolina Rabello de Moraes e estou desenvolvendo a pesquisa “Estudo dos mecanismos de transdução de sinais envolvidos na resistência a múltiplas drogas em leucemias agudas”, que tem como objetivo estudar o funcionamento das células leucêmicas presentes no seu sangue, que são as células causadoras da sua doença. Este estudo é necessário, pois conhecendo melhor a resposta as suas células podemos estudar uma forma melhor de diagnóstico e tratamento. Para isso eu peço permissão para utilizar a sua amostra de sangue ou medula óssea coletada para o exame de imunofenotipagem. Isto não traz nenhum desconforto, pois não haverá duas coletas de sangue, pois aproveitaremos o sangue após a realização dos exames laboratoriais. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone (XX) XXXX-XXXX. Se você estiver de acordo em participar, posso garantir que as informações fornecidas serão confidenciais e o material coletado, só será utilizado neste trabalho.

---

Ana Carolina Rabello de Moraes

---

Profa Dra Maria Cláudia Santos da Silva  
Orientadora

**CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecido sobre a pesquisa “Estudo dos mecanismos de transdução de sinais envolvidos na resistência a múltiplas drogas em leucemias agudas”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Assinatura: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

## ANEXO C – Protocolo de tratamento para as leucemias mieloides agudas (LMA<sub>s</sub>)

Planilha 1 - Protocolo de tratamento para as leucemias mieloides agudas (LMAs) não leucemia promielocítica aguda (LPA)

Fase	Ciclos de QT	Esquema de dose
Indução	1 a 2*	Ara-C: 120mg/m <sup>2</sup> /dia – D1-D7 + Mitoxantrona: 12mg/m <sup>2</sup> /dia – D2-D4
Consolidação	1 a 2*	Igual ao ciclo de indução
Intensificação	2	Ara-C: 1g/m <sup>2</sup> de 12/12h – D1-D4 + Mitoxantrona: 12mg/m <sup>2</sup> /dia

QT – Quimioterapia; Ara-C – Citorabina; D – dia. \*Repetir mais um ciclo se não entrar em remissão após o primeiro ciclo

Planilha 2 - Protocolo de tratamento para a leucemia promielocítica aguda (LPA)

Fase	Ciclos de QT	Esquema de dose
Indução	Até RC	ATRA: 45mg/m <sup>2</sup> de 12/12h por dia até RC + Ara-C: 200mg/m <sup>2</sup> por 7 dias + Daunorubicina: 60mg/m <sup>2</sup> por 3 dias
Consolidação	3	Igual a indução ou Daunorubicina: 45mg/m <sup>2</sup> por 3 dias + Ara-C: 1g/m <sup>2</sup> de 12/12h por 4 dias
Manutenção	*	ATRA 45mg/m <sup>2</sup> por 15 dias cada 3 meses + 6-mercaptopurina: 90mg/m <sup>2</sup> por dia + MTX: 15mg/m <sup>2</sup> por semana

QT – Quimioterapia; ATRA – ácido all-trans retinóico; RC – Remissão hematológica. \*Manter por dois anos.



## ANEXO D – Protocolo de tratamento para as leucemias linfoides agudas (LLAS)

### PROCOLO DE QUIMIOTERAPIA PARA LLA DO ADULTO BFM-93

**IDADE ACEITÁVEL:** 15 a 65 anos

**OBJETIVOS:**

1. Expandir os parâmetros diagnósticos de LLA entre morfologia, imunologia e citogenética para incluir investigações de biologia molecular do rearranjo bcr-abl.
2. DESENVOLVER UMA TERAPIA CONFORME LLA DE BAIXO RISCO (bcr-abl negativo), LLA DE ALTO RISCO (bcr-abl positivo), LLA-T com ou sem envolvimento medastinal, e LLA-B.
3. Aumentar a taxa de RC usando nova estratégia terapêutica: dose aumentada de CTX durante a indução e re-indução, uso precoce de altas doses de Citarabina/ Mitoxantrone em pacientes de alto risco, e aumentar a dose de MTX em LLA-B.
4. Prolongar a duração de remissão e sobrevida dos pacientes com LLA pela consolidação intensificada durante os primeiros 12 meses para todos os grupos de risco e pela adição de subtipos específicos de quimioterapia.
5. Conduzir uma comparação randomizada de terapia de manutenção intensificada versus convencional em todos os grupos de risco.

**PROCOLO:**

**REGIME 1 (baixo risco):** LLA - common, LLA pré-B  
 todos os pacientes entre 51 e 65 anos  
 pacientes entre 15 e 50 anos que são: Ph1/bcr-abl neg.  
 Leuco < 30.000  
 RC durante 1ª indução

**OBS: SE NÃO ATINGIR RC APÓS FASE 1 DA INDUÇÃO SERÃO CONSIDERADOS ALTO RISCO E CONTINUARÃO A TERAPIA NO REGIME 3.**

**REGIME 3 (alto risco):** LLA - common, LLA pré-B  
 pacientes entre 15 e 50 anos  
 Ph1/bcr-abl positivo  
 Doença pré-pré-B (ex. t(4;11))  
 Leuco > 30.000  
 RC somente durante ou após Fase 2 da Indução

**REGIME 2:** LLA -T ou tumores medastinais

**REGIME 4:** LLA -B

⇒ Pacientes enquadrados nos Regimes 1, 2 e 3 que tiverem doença em SNC ao diagnóstico serão tratados com **REGIME A** (pacientes de alto risco não receberão irradiação do neuroeixo desde que recebam QT IT na indução Fase 2).

**REGIME A:** TIT (MTX 15 mg, ARA-C 40 mg, Dexa 4 mg) 2 a 3x/sem até 5 doses após o clareamento do liquor (ausência de blastos). Irradiação do neuroeixo será realizada durante a Fase 2 da Indução nos pacientes em Regimes 1 e 2: 24 Gy e frações diárias de 1,5 - 1,8 Gy, 5 dias por semana.

**Exames:** hemograma, função hepática e renal, AMO e BMO para morfologia, imunologia, citogenética, e biologia molecular, avaliação de toxicidade e infecção.

**ESQUEMA DE DOSAGEM:**

⇒ Nos Regimes 1, 2 e 3 a dose de CTX de  $1\text{g/m}^2$  pode ser reduzida para  $650\text{ mg/m}^2$  em pacientes acima de 50 anos.

**PRE-INDUÇÃO:** PREDNISONA  $20\text{ mg/m}^2/\text{dia}$  VO D1-7  
( se leuco > 25.000) VINCRISTINA  $2,0\text{ mg}$  EV no D1  
A Indução deverá começar impreterivelmente no D8

**REGIME 1:**

**INDUÇÃO FASE 1:** semanas 1-4

PREDNISONA:	$60\text{ mg/m}^2$ VO dividido em 3 doses	D1-28
L-ASPARAGINASE:	$5.000\text{ U/m}^2$ EV em 30 minutos	D15-28
VINCRISTINA:	$2,0\text{ mg}$ EV	D1, 8, 15, 22
DAUNORUBICINA:	$45\text{ mg/m}^2$ EV em 30 minutos	D1, 8, 15, 22
METOTREXATE IT:	$15\text{ mg}$ IT	D1

**INDUÇÃO FASE 2:** semanas 5-8

CICLOFOSFAMIDA:	$1\text{ g/m}^2$ EV	D29, 43 e 57
ARA-C:	$75\text{ mg/m}^2$ EV em 1h ou SC	D31-34 D38-41 D45-48 D52-55
MERCAPTOPURINA:	$60\text{ mg/m}^2$ VO	D29-57
MTX IT:	$15\text{ mg}$ IT	D31, 38, 45, 52
PROFILAXIA SNC:	$24\text{ Gy}$ c/ $2\text{Gy}/\text{dia}$ - 5 dias/sem	após RC, a partir da Sem.9

**CONSOLIDAÇÃO 1:** semanas 13-17

Semana 13:

HD MTX:	$1,5\text{ g/m}^2$ EV em 24hs (10% da dose em 30 min)	D1
LEUCOVORIM:	resgate	D1 e D15
L-ASPARAGINASE:	$10.000\text{ U/m}^2$ EV em 1h	D2 e D16
MERCAPTOPURINA:	$25\text{ mg/m}^2$ VO	D1-5 D15-19

Semana 17:

ARA -C:	$150\text{ mg/m}^2$ EV em 1h	D1-5
VUMON (VM-26):	$100\text{ mg/m}^2$ EV em 1h	D1-5
TIT:	ARA-C, MTX, DEXA IT	D1

**RE-INDUÇÃO FASE 1:** semanas 21-24

PREDNISONA:	$60\text{ mg/m}^2$ VO dividido em 3 doses	D1-28
VINCRISTINA:	$2,0\text{ mg}$ EV	D1, 8, 15, 22
DOXORUBICINA:	$25\text{ mg/m}^2$ EV em 30 minutos	D1, 8, 15, 22
TIT:	ARA-C, MTX, DEXA IT	D1

**RE-INDUÇÃO FASE 2:** semanas 25 e 26

CICLOFOSFAMIDA:	$1\text{ g/m}^2$ EV	D29
ARA-C:	$75\text{ mg/m}^2$ EV em 1h ou SC	D31-34 D38-41
MERCAPTOPURINA:	$60\text{ mg/m}^2$ VO	D29-42
TIT:	ARA-C, MTX, DEXA IT	D29

**CONSOLIDAÇÃO 2:** semanas 29-52

MERCAPTOPURINA:	$60\text{ mg/m}^2/\text{d}$	S29-52
-----------------	-----------------------------	--------

**METOTREXATE:** 20 mg/m<sup>2</sup>/sem S29-S2

EXCETO DURANTE ESTES PULSOS DE QT:

**HD MTX/ASP/MP: S33 e S45**

HD MTX:	1,5 g/m <sup>2</sup> EV em 24hs (10% da dose em 30 min)	D1
LEUCOVORIM:	resgate	D1 e D15
L-ASPARAGINASE:	10.000 U/m <sup>2</sup> EV em 1h	D2 e D16
MERCAPTOPURINA:	25 mg/m <sup>2</sup> VO	D1-5, 15-19
<b>VM-26/ARA-C/TIT: S39 e S51</b>		
ARA-C:	150 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h	D1-5
VUMON (VM-26):	100 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h	D1-5
TIT:	ARA-C, MTX, DEXA IT	D1

**MANUTENÇÃO:**

**BRACO A:** MP 60 mg/m<sup>2</sup>/d VO e MTX 20 mg/m<sup>2</sup>/sem do mês 13 ao mês 30,

EXCETO DURANTE ESTES PULSOS DE QT:

**CTX/ARA-C/TIT: meses 14, 20 e 26**

CICLOFOSFAMIDA:	1 g/m <sup>2</sup> EV	D1
ARA-C:	500 mg/m <sup>2</sup> EV em 24hs	D1
TIT:	QT IT	D1

**VM-26/ARA-C/TIT: meses 16, 22 e 28**

ARA-C:	150 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h	D1-5
VUMON (VM-26):	100 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h	D1-5
TIT:	ARA-C, MTX, DEXA IT	D1

**HD MTX/ASP: meses 18, 24 e 30**

HD MTX:	1,5 g/m <sup>2</sup> EV em 24hs (10% da dose em 30 min)	D1
LEUCOVORIM:	resgate	D1 e D15
L-ASPARAGINASE:	10.000 U/m <sup>2</sup> EV em 1h	D2 e D16

**BRACO B:** MP 60 mg/m<sup>2</sup>/d VO e MTX 20 mg/m<sup>2</sup>/sem do mês 13 ao mês 30,  
TIT a cada 2 meses

## REGIME 2:

**INDUÇÃO FASE 1: semanas 1-4**

PREDNISONA:	60 mg/m <sup>2</sup> VO dividido em 3 doses	D1-28
L-ASPARAGINASE:	5.000 U/m <sup>2</sup> EV em 30 minutos	D15-28
VINCRISTINA:	2,0 mg EV	D1, 8, 15, 22
DAUNORUBICINA:	45 mg/m <sup>2</sup> EV em 30 minutos	D1, 8, 15, 22
METOTREXATE IT:	15 mg IT	D1

**INDUÇÃO FASE 2: semanas 5-8**

CICLOFOSFAMIDA:	1 g/m <sup>2</sup> EV	D29, 43 e 57
ARA-C:	75 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h ou SC	D31-34 D38-41 D45-48 D52-55 D29-57
MERCAPTOPURINA:	60 mg/m <sup>2</sup> VO	D31, 38, 45, 52
MTX IT:	15 mg IT	] simultâneo, a partir da Sem.9
Rxt PROFILAXIA SNC:	24 Gy c/ 2,0 Gy/dia - 5 dias/sem	
Rxt MEDIASINAL:	24 gY C/ 1,8-2,0 Gy/dia - 5 dias/sem	

**CONSOLIDAÇÃO 1: semanas 13-17**

**Semana 13:**

HD ARA-C:	1 g/m <sup>2</sup> EV em 3hs 12/12hs x 8 doses	D1-4
MITOXANTRONE:	10 mg/m <sup>2</sup> EV em 30 minutos	D3, 4 e 5
<b>Semana 17:</b>		
HD MTX:	1,5 g/m <sup>2</sup> EV em 24hs (10% da dose em 30 min)	D1
LEUCOVORIM:	resgate	D1 e D15
L-ASPARAGINASE:	10.000 U/m <sup>2</sup> EV em 1h	D2 e D16
MERCAPTOPURINA:	25 mg/m <sup>2</sup> VO	D1-5, 15-19
<b>RE-INDUÇÃO FASE 1: semanas 21-24</b>		
PREDNISONA:	60 mg/m <sup>2</sup> VO dividido em 3 doses	D1-28
VINCRISTINA:	2,0 mg EV	D1, 8, 15, 22
DOXORUBICINA:	25 mg/m <sup>2</sup> EV em 30 minutos	D1, 8, 15, 22
TIT:	ARA-C, MTX, DEXA IT	D1
<b>RE-INDUÇÃO FASE 2: semanas 25 e 26</b>		
CICLOFOSFAMIDA:	1 g/m <sup>2</sup> EV	D29
ARA-C:	75 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h ou SC	D31-34
		D38-41
MERCAPTOPURINA:	60 mg/m <sup>2</sup> VO	D29-42
TIT:	ARA-C, MTX, DEXA IT	D29
<b>CONSOLIDAÇÃO 2: semanas 29-52</b>		
MERCAPTOPURINA:	60 mg/m <sup>2</sup> /d	S29-52
METOTREXATE:	20 mg/m <sup>2</sup> /sem	S29-52
<u>EXCETO DURANTE ESTES PULSOS DE QT:</u>		
<b>CTX/ARA-C/TIT: S33 e S45</b>		
CICLOFOSFAMIDA:	1 g/m <sup>2</sup> EV	D1
ARA-C:	500 mg/m <sup>2</sup> EV em 24hs	D1
TIT:	QT IT	D1
<b>VM-26/ARA-C/TIT: S39 e S51</b>		
ARA -C:	150 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h	D1-5
VUMON (VM-26):	100 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h	D1-5
TIT:	ARA-C, MTX, DEXA IT	D1
<b>MANUTENÇÃO: BRAÇO A OU BRAÇO B (Idem Regime 1)</b>		
<b>BRAÇO A:</b> MP 60 mg/m <sup>2</sup> /d VO e MTX 20 mg/m <sup>2</sup> /sem do mês 13 ao mês 30,		
<u>EXCETO DURANTE ESTES PULSOS DE QT:</u>		
<b>CTX/ARA-C/TIT: meses 14, 20 e 26</b>		
CICLOFOSFAMIDA:	1 g/m <sup>2</sup> EV	D1
ARA-C:	500 mg/m <sup>2</sup> EV em 24hs	D1
TIT:	QT IT	D1
<b>VM-26/ARA-C/TIT: meses 16, 22 e 28</b>		
ARA -C:	150 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h	D1-5
VUMON (VM-26):	100 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h	D1-5
TIT:	ARA-C, MTX, DEXA IT	D1
<b>HD MTX/ASP: meses 18, 24 e 30</b>		
HD MTX:	1,5 g/m <sup>2</sup> EV em 24hs (10% da dose em 30 min)	D1
LEUCOVORIM:	resgate	D1 e D15
L-ASPARAGINASE:	10.000 U/m <sup>2</sup> EV em 1h	D2 e D16
<b>BRAÇO B:</b> MP 60 mg/m <sup>2</sup> /d VO e MTX 20 mg/m <sup>2</sup> /sem do mês 13 ao mês 30,		
TIT a cada 2 meses		

**REGIME 3:****INDUÇÃO FASE 1: semanas 1-4**

PREDNISONA:	60 mg/m <sup>2</sup> VO dividido em 3 doses	D1-28
L-ASPARAGINASE:	5.000 U/m <sup>2</sup> EV em 30 minutos	D15-28
VINCRISTINA:	2,0 mg EV	D1, 8, 15, 22
DAUNORUBICINA:	45 mg/m <sup>2</sup> EV em 30 minutos	D1, 8, 15, 22
METOTREXATE IT:	15 mg IT	D1

**INDUÇÃO FASE 2: Semana 6**

ARA-C:	3000 mg/m <sup>2</sup> EV 12/12hs ( 8 doses)	D1-4
MITOXANTRONE:	10 mg/m <sup>2</sup> EV em 30 min	D3, 4 e 5

**CONSOLIDAÇÃO 1: Semanas 13 - 17****Semana 13: HD MTX/ASP**

HD MTX:	1,5 g/m <sup>2</sup> EV em 24hs (10% da dose em 30 min)	D1
LEUCOVORIM:	resgate	D1 e D15
L-ASPARAGINASE:	10.000 U/m <sup>2</sup> EV em 1h	D2 e D16
MERCAPTOPURINA:	25 mg/m <sup>2</sup> VO	D1-5, 15-19

**Semana 17: CTX/ARA-C/TIT**

CICLOFOSFAMIDA:	1 g/m <sup>2</sup> EV	D1
ARA-C:	500 mg/m <sup>2</sup> EV em 24hs	D1
TIT:	QT IT	D1

**RE-INDUÇÃO FASE 1: Semanas 21-24**

PREDNISONA:	60 mg/m <sup>2</sup> VO dividido em 3 doses	D1-28
VINCRISTINA:	2,0 mg EV	D1, 8, 15, 22
DOXORUBICINA:	25 mg/m <sup>2</sup> EV em 30 minutos	D1, 8, 15, 22
TIT:	ARA-C, MTX, DEXA IT	D1

**RE-INDUÇÃO FASE 2: Semanas 25-26**

CICLOFOSFAMIDA:	1 g/m <sup>2</sup> EV	D29
ARA-C:	75 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h ou SC	D31-34 D38-41
MERCAPTOPURINA:	60 mg/m <sup>2</sup> VO	D29-42
TIT:	ARA-C, MTX, DEXA IT	D29

**CONSOLIDAÇÃO 2: Semanas 29-52**

MERCAPTOPURINA:	60 mg/m <sup>2</sup> /d	S29-52
METOTREXATE:	20 mg/m <sup>2</sup> /sem	S29-52

**Semana 33: HD ARA-C/DHAD**

ARA-C:	3000 mg/m <sup>2</sup> EV 12/12hs ( 8 doses)	D1-4
MITOXANTRONE:	10 mg/m <sup>2</sup> EV em 30 min	D3, 4 e 5

**Semana 39: HD MTX/ASP/IMP**

HD MTX:	1,5 g/m <sup>2</sup> EV em 24hs (10% da dose em 30 min)	D1
LEUCOVORIM:	resgate	D1 e D15
L-ASPARAGINASE:	10.000 U/m <sup>2</sup> EV em 1h	D2 e D16
MERCAPTOPURINA:	25 mg/m <sup>2</sup> VO	D1-5, 15-19

**Semana 45: CTX/ARA-C/TIT**

CICLOFOSFAMIDA:	1 g/m <sup>2</sup> EV	D1
ARA-C:	500 mg/m <sup>2</sup> EV em 24hs	D1
TIT:	QT IT	D1

**Semana 51: VM-26/ARA-C/TIT**

ARA-C:	150 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h	D1-5
VUMON (VM-26):	100 mg/m <sup>2</sup> EV em 1h	D1-5

TIT: ARA-C, MTX, DEXA IT D1

Pacientes até 50 anos em primeira RC com doador apropriado recebe TMO alogênico. Pacientes com Ph<sup>+</sup>/bcr-abl<sup>+</sup> que não têm doador recebem TMO autólogo em lugar da terapia de re-indução durante primeira RC.

**REGIME 4:**

**PRE-TRATAMENTO:**

CICLOFOSFAMIDA: 200 mg/m<sup>2</sup> EV em 1h D1-5  
 PREDNISONA: 60 mg/m<sup>2</sup>/d VO dividido em 3 doses D1-5

**TRATAMENTO:**

**BLOCO A:**

VINCRISTINA: 2 mg EV D1  
 METOTREXATE: 3000 mg/m<sup>2</sup> EV por 24hs D1  
 (10% em 30 min)  
 LEUCOVORIN: 15 mg/m<sup>2</sup> EV/VO (resgate)  
 IFOSFAMIDA: 800 mg/m<sup>2</sup> EV em 1h D1-5  
 VM-26 (VUMON): 100 mg/m<sup>2</sup> EV em 1h D4 e 5  
 ARA-C: 150 mg/m<sup>2</sup> EV em 1h de 12/12hs D4 e 5  
 DEXAMETASONA: 10 mg/m<sup>2</sup> VO D1-5  
 TIT: MTX 15mg/ARA-C 40mg/Dexa 4mg D1 e 5

**BLOCO B:**

VINCRISTINA: 2 mg EV D1  
 METOTREXATE: 3000 mg/m<sup>2</sup> EV por 24hs D1  
 (10% em 30 min)  
 LEUCOVORIN: 15 mg/m<sup>2</sup> EV/VO (resgate)  
 CICLOFOSFAMIDA: 200 mg/m<sup>2</sup> EV em 1h D1-5  
 DOXORUBICINA: 25 mg/m<sup>2</sup> EV em 15 min D4 e 5  
 DEXAMETASONA: 10 mg/m<sup>2</sup> VO D1 a 5  
 TIT: MTX 15mg/ARA-C 40mg/Dexa 4mg D1 e 5

⇒ Blocos A e B repetem a cada 21 dias (do início de cada curso) por um total de 6 cursos. Alternando a cada 21 dias Bloco A e Bloco B.

⇒ Pacientes que não alcançaram RC após 3 cursos ou que desenvolvem doença progressiva a qualquer momento, pode opcionalmente ser tratado com DAVA/ARA-C/VP-16/DM.

⇒ Pacientes com doença em SNC recebem radioterapia crânio-espinhal (24 Gy) após 2 cursos de quimioterapia sistêmica (Bloco A e Bloco B); eles recebem TIT (2-3 vezes/sem até clarear SNC) após Bloco A somente se resposta for insatisfatória.

⇒ Modificação de dosagem conforme toxicidade pode ocorrer neste protocolo.

ORGANIZADO POR: Universidade de Frankfurt  
 (dez/95) Dieter Hoelzer  
 069-6301-5194