

Influência de Polimorfismos e Metilação na Expressão de MDR1 e do Choque Térmico em Genes de Resistência a Múltiplas Drogas*

The Influence of Polymorphisms and Methylation on MDR1 Expression and the Heat Shock on Multi-drug Resistance Genes

Juliano Javert Lourenço¹, Miguel Ângelo Martins Moreira²

Resumo

A proteína P-gp1 é codificada pelo gene *MDR1* humano e está envolvida com o desenvolvimento de resistência a quimioterápicos, não relacionados entre si, em tumores, o que caracteriza a "resistência a múltiplas drogas" (MDR). A expressão aumentada de P-gp1 é atribuída a mecanismos moleculares que podem alterar a regulação transcricional desse gene. Entre os mecanismos, está a alteração do *status* metilacional nos sítios CpG e polimorfismos genéticos no promotor de *MDR1*, além das respostas ao estresse causado, entre outros fatores, por exposição ao calor. A expressão e atividade elevada de P-gp1 na Leucemia Mielóide Aguda (LMA) pode ser utilizada como fator prognóstico. Um total de 20% dos pacientes com LMA de novo e 75% dos casos de LMA secundária expressam P-gp1. Embora 60% a 70% dos pacientes com LMA de novo apresentem remissão completa frente à quimioterapia, apenas 25% a mantêm, os remanescentes recaem e/ou morrem devido à MDR. Neste trabalho, foram analisadas a associação entre polimorfismos na região promotora de *MDR1* em células leucêmicas de 72 pacientes com LMA e a atividade e expressão de P-gp1. Também foi analisada a associação entre a densidade metilacional e a atividade e expressão de P-gp1 em um trecho funcional da região promotora de *MDR1* em células leucêmicas de 14 pacientes e em duas linhagens celulares com (Lucena) e sem (K562) o fenótipo MDR. Também foi comparada a expressão gênica dos genes de resistência *MDR1*, *MRP1*, *BCRP* e do fator de transcrição *HSF1*, nas linhagens celulares leucêmicas, K562 e Lucena, tratadas e não tratadas com 5-Azacitidina, antes e após a exposição a choque térmico (2 horas a 43° C). A análise de 665pb da região promotora do gene *MDR1* revelou um SNP denominado -129T/C e uma substituição não descrita na posição 68 do íntron 1. A frequência dos genótipos do SNP -129T/C foram: 83,3% TT (60/72), 15,7% T/C, (11/72) e 1,3% C/C (1/72). O ensaio com Rodamina-123 executado em 64 pacientes mostrou um fenótipo MDR em 52% dos pacientes analisados. A expressão de P-gp1 foi analisada em 58% dos pacientes com LMA e a superexpressão de P-gp1 foi encontrada em 81% do total de pacientes analisados. Nenhuma associação estatística significativa foi encontrada entre qualquer um dos genótipos, -129T/T ou -129T/C, e a atividade ou expressão de P-gp1. O padrão de metilação foi analisado em 14 pacientes para uma região de 223pb do promotor, abrangendo 12 sítios CpG. Os sítios CpG localizados em -141, -131 e -102 bases do sítio de início de transcrição estavam não metilados em aproximadamente 70% dos pacientes. Os sítios localizados em -48, -31 e -26 mostraram-se metilados em 10% dos pacientes. Além disso, um paciente mostrou todos os sítios CpG em estado metilado/não metilado e três pacientes mostraram todos os sítios não metilados. A linhagem Lucena apresentou baixo estado metilacional para a maioria de seus sítios CpG, enquanto em K562 apenas 33% dos sítios CpG apresentaram-se metilados. Não foi encontrada qualquer associação entre a expressão e atividade

¹Autor

²Orientador, Pesquisador do Laboratório de Genética /Coordenação de Pesquisa (CPQ) / Instituto Nacional de Câncer (INCA)

*Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biologia da Faculdade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Endereço para correspondência: miguelm@inca.gov.br; julianojavert@hotmail.com

de P-gp1 e a metilação em pacientes. Os experimentos de choque térmico mostraram que houve um discreto aumento do nível de expressão do gene *MDR1* nas células submetidas apenas ao choque térmico em relação aos seus controles, tanto em K562 quanto Lucena. Também mostraram que há aumentos modestos na quantificação relativa do ARN mensageiro de *MDR1*, *MRP1* e *HSF1* quando as linhagens são submetidas ao choque térmico após o tratamento com o agente 5-Azacitidina. Neste último caso, para *MRP1*, houve aumento transcricional mais evidente em K562 em relação aos outros genes MDR. A presença de motivos de reconhecimento para o fator de transcrição HSF1 no próprio promotor de *HSF1* sugerem a possibilidade de um *feedback* positivo relacionado à ativação de sua própria transcrição. Não foi detectada a expressão de *BCRP* nas linhagens K562 e Lucena, mesmo após o tratamento com 5-Azacitidina.