



DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Variações de Expressão Génica associadas a terapêutica com inibidores de tirosina cinases na Leucemia Mielóide Crónica

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em 2009, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Luísa Carvalho (Universidade de Coimbra).

Sandrine Craveiro Mendes

2009

Índice

Agradecimentos	4
1. Resumo.....	7
2. Abstract	10
3. Introdução.....	12
3.1. Hematopoiese	13
3.2. Patologia Hemato-Oncológica.....	15
3.3. Leucemia Mielóide Crónica	15
3.3.1. Genética da Leucemia Mielóide Crónica.....	19
3.3.2. Diagnóstico.....	22
3.3.3. Terapêutica em Leucemia Mielóide Crónica	28
3.3.3.1. Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas	28
3.3.3.2. Tratamento Clássico	28
3.3.3.3. Mesilato de Imatinib	29
3.3.3.4. Nilotinib	31
3.3.3.5. Dasatinib	33
3.3.3.6. BMS-214662	35
3.3.3.7. Bosutinib	35
3.3.3.8. Inibidores de Cinase Aurora.....	36

3.3.3.9.	Inibidores de BCR-ABL não competitivos com o ATP	37
3.3.4.	Resposta Terapêutica	37
3.3.5.	Resistências à Terapêutica	39
4.	Expressão Génica	42
5.	Material e Métodos	53
5.1.	Grupo de amostragem	54
5.2.	Extracção de RNA	55
5.3.	Integridade e Concentração do RNA	56
5.4.	Síntese de cDNA.....	56
5.5.	Expressão Génica.....	57
6.	Resultados e Discussão	61
7.	Conclusão	82
8.	Bibliografia.....	84

Agradecimentos

Agradeço ao Centro de Histocompatibilidade do Centro, de forma especial à Dra Maria Luisa Pais, Directora do mesmo, pela recepção, apoio e disponibilidade mostrada para com a realização do presente trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Ana Luísa Carvalho, Professora da Licenciatura de Biologia e orientadora desta tese, pelo apoio e disponibilidade na concretização da mesma. O meu muito Obrigado.

Agradeço ao Dr. Paulo Santos, responsável pelo Laboratório de Genómica Funcional do Centro de Histocompatibilidade do Centro e co-orientador desta tese, pois sem o seu apoio, ensinamentos e disponibilidade seria de todo impossível a realização deste trabalho. O meu muito Obrigado.

Agradeço ao Dr. Paulo Tavares, Hematologista no Serviço de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, por toda a informação disponibilizada referente à situação e evolução clínica dos doentes em estudo.

Agradeço à forte equipa de laboratório, Dra. Isabel Velada, Dr. Fernando Mendes e restantes colaboradores ocasionais do Laboratório de Genómica Funcional do Centro de Histocompatibilidade do Centro por todo o apoio e carinho mostrado pelo presente trabalho. O meu muito Obrigado.

Agradeço ao Dr António Martinho, responsável pelo Laboratório de Genética Molecular do Centro de Histocompatibilidade do Centro, pela sua colaboração e esclarecimentos prestados na realização de várias técnicas.

Agradeço à Dra Olívia Simões, membro do Laboratório de Genética Molecular do Centro de Histocompatibilidade do Centro pela sua cooperação na realização de vários protocolos. O meu muito Obrigado.

1. Resumo

A Leucemia Mielóide Crónica (LMC) é uma patologia hemato-oncológica caracterizada por uma expansão clonal das células estaminais hematopoiéticas, contendo uma translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22. Esta translocação origina o gene de fusão BCR-ABL que altera a expressão dos genes envolvidos nas vias de sinalização celular, podendo estas sofrer alterações quando submetidas a diferentes tratamentos.

Actualmente, as terapêuticas direccionadas para a LMC visam essencialmente atingir a proteína de fusão BCR-ABL, como são exemplo os inibidores de tirosina cinase que actuam no domínio cinásico.

O objectivo do presente estudo consistiu na avaliação da variação da expressão génica que decorre na sequência da utilização terapêutica do mesilato de imatinib (Gleevec®, Novartis) na LMC. Pretendeu-se contribuir para o esclarecimento dos mecanismos moleculares que possam conduzir a melhoria da eficácia e eficiência terapêutica.

Foi avaliada, por PCR em tempo real, a expressão génica relativa para 39 genes associados a diferentes vias celulares em 9 doentes com LMC. As amostras seleccionadas compreendiam um período de 9 meses antes e após a introdução terapêutica do inibidor das tirosina cinases.

No conjunto de doentes analisados verificou-se uma relação inversamente proporcional entre a expressão génica de *FYN*, *MAP2K4*, *PIK3CA*, *RAF* e *FAK* e quantidade de mRNA do gene de fusão BCR-ABL.

O estudo de expressão génica representa uma poderosa ferramenta para a análise de alterações das células leucémicas, indicando o comportamento biológico específico, o estado da doença e a resposta à terapêutica.

2. Abstract

Chronic Myelogenous Leukemia (CML) is a malignant disease characterized by a massive expansion of hematopoietic stem cells, with a reciprocal translocation between the 9 and 22 chromosomes. This translocation origin the fusion gene BCR-ABL, which changes the expression of genes involved in different cellular pathways. Different therapeutic strategies interfere with gene expression, as well.

Actually, therapies for CML are more specific for the oncogene BCR-ABL, like tyrosine kinase inhibitors, which act in kinasic domain of the fusion gene.

The objective of this study was to verify the difference of gene expression before and after the introduction of the Imatinib Mesylate in leukemic cells. We intended to contribute for the understanding of molecular mechanisms for a most effective and efficient therapeutic.

We analyzed, by real-time PCR, the relative expression of the 39 genes, in 9 patients during 9 months, before and after of the imatinib introduction.

It was verified an inverse relationship between gene expression of *FYN*, *MAP2K4*, *PIK3CA*, *RAF* and *FAK* and the mRNA quantity of BCR-ABL fusion gene in patients group.

Gene expression represents a powerful tool to analyze genomic differences in leukemic cells, characterizing a specific biologic behavior, disease status and therapeutic response.

3. Introdução

3.1. Hematopoiese

A grande maioria das células sanguíneas maduras vive desde poucas horas, como os granulócitos, até semanas, como os eritrócitos. Em média, todos os dias são produzidas cerca de 10^{13} células sanguíneas que sucessivamente se substituem. Este valor pode aumentar em resposta a uma redução no número de células em circulação provocada, por exemplo, por uma perda de sangue ou por uma infecção (Hoffbrand *et al*, 1999).

A hematopoiese é um processo que resulta na maturação de células progenitoras hematopoiéticas na medula óssea, em componentes celulares diferenciados do sangue periférico, sendo eles os glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas (Speck *et al*, 2002).

As células estaminais hematopoiéticas existem entre cerca de 0,01 e 0,05% na medula óssea, possuindo duas características importantes: a capacidade de auto-replicação, o que leva a uma constante renovação deste tipo de células, e o potencial de se diferenciarem em células altamente especializadas (eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, monócitos, macrófagos, osteoclastos e linfócitos B e T).

No início da hematopoiese, uma célula estaminal totipotente diferencia-se seguindo uma das duas vias, a mielóide ou linfóide, em que diferentes concentrações e tipos de factores de crescimento levam à diferenciação das várias células. Assim sendo, a célula progenitora mielóide origina eritrócitos, plaquetas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas e a célula progenitora linfóide diferencia-se em linfócitos T, B e *Natural Killer* (NK) e algumas células dendríticas (Figura 1) (Goldsby, 2004).

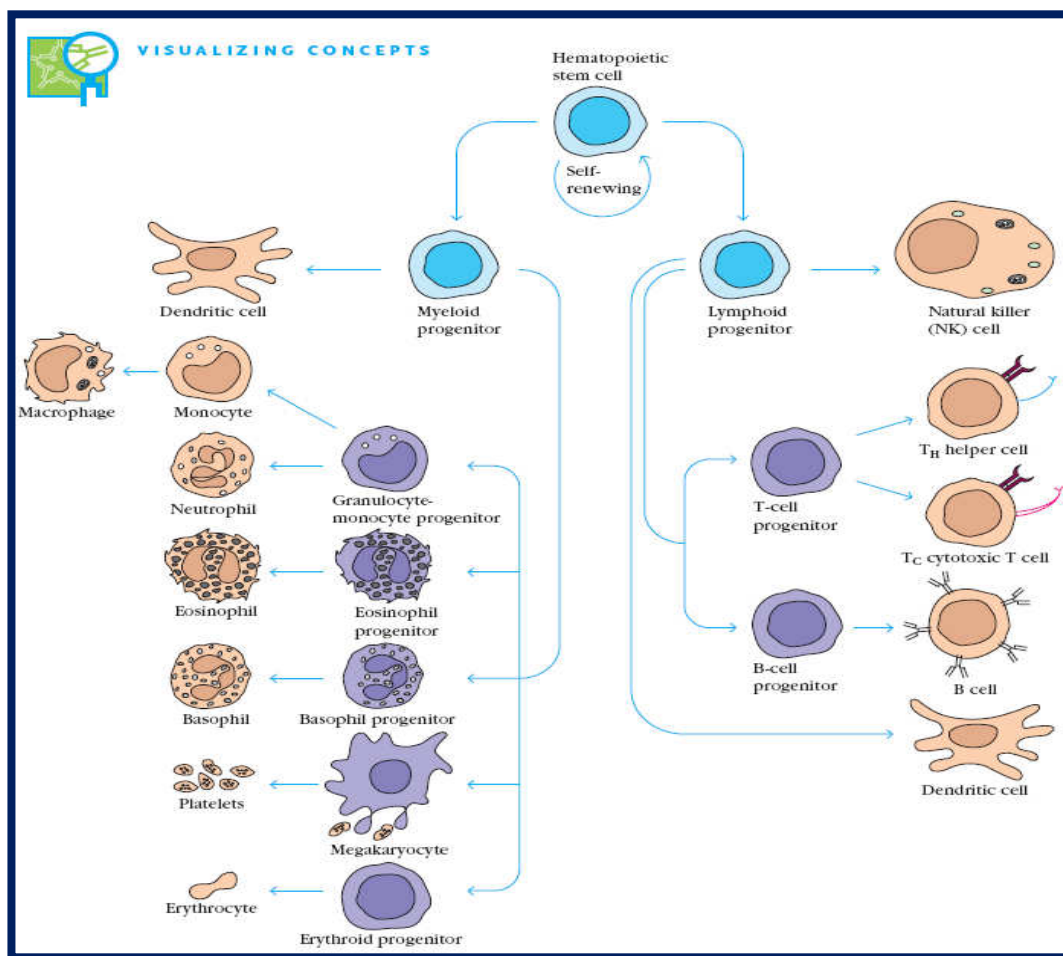


Figura 1 – Representação esquemática da hematopoiese (Goldsby, 2004).

É unânime que as células estaminais são as células mais importantes do sistema hematopoiético tendo sido, por isso mesmo, responsabilizadas pela regeneração da hematopoiese após uma transplantação de medula óssea ou após uma destruição deste sistema celular por aplicação de citotóxicos severos para o combate de uma doença maligna, tais como agentes de quimioterapia ou de radioterapia.

Fenotipicamente, estas células são marcadas positivamente pelo CD34 (marcador de imaturidade celular) (Blank *et al*, 2008).

3.2. Patologia Hemato-Oncológica

As patologias hemato-oncológicas surgem quando existe alguma alteração no processo de formação ou maturação das células sanguíneas ao longo do processo hematopoético, tal como descrito anteriormente. Estas patologias são classificadas em mielóides ou linfóides, de acordo com o tipo de células que afectam, e em agudas ou crónicas, de acordo com o grau de maturação atingido.

Assim sendo, estas patologias podem ser classificadas em Leucemia Mielóide Crónica (LMC), Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), Linfomas e Mielomas. O presente estudo baseou-se na Leucemia Mielóide Crónica.

3.3. Leucemia Mielóide Crónica

A Leucemia Mielóide Crónica é uma doença mieloproliferativa que resulta de uma transformação neoplásica das células estaminais hematopoiéticas, sendo identificada pela presença de uma alteração genética, uma translocação, que envolve os cromossomas 9 e 22 originando o cromossoma *Philadelphia* (Ph) (Figura 2) (Ren, 2005).

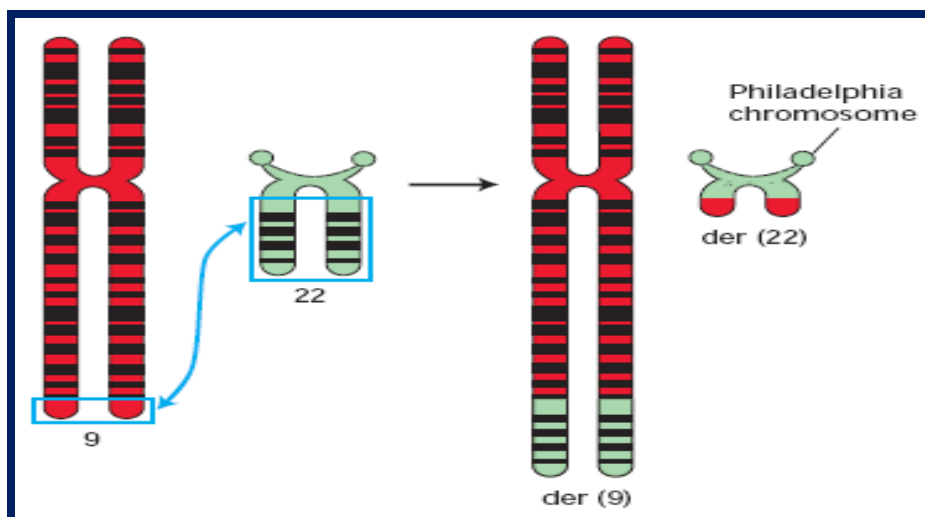


Figura 2 – Cromossoma Ph característico da LMC (Lodish, 2003)

Embora a LMC tenha sido identificada como uma forma particular de leucemia nos primeiros anos do século XIX, apenas com os avanços tecnológicos do século seguinte foi possível caracterizar os cromossomas humanos, surgindo em 1960, por Nowell e Hungerford, a descrição do cromossoma *Philadelphia*. Em 1973 a LMC foi associada a esta translocação e mais tarde foi determinado que a mesma codifica uma tirosina cinase BCR-ABL (Jorgensen e Holyoake, 2007).

A partir destas descobertas, a identificação e quantificação de metafases Ph-positivas em sangue periférico (SP) ou medula óssea (MO) foi uma ferramenta muito útil no diagnóstico e monitorização da LMC. Actualmente faz-se também a pesquisa e quantificação dos transcritos de BCR-ABL (Hughes *et al*, 2006).

A presença do oncogene BCR-ABL nas células de rato induz leucemia, implicando a relação directa deste com a causa da LMC e a consequência molecular desta alteração é a produção de uma tirosina cinase BCR-ABL sempre activa (O'Dwyer *et al*, 2004).

A Leucemia Mieloide Crónica é uma doença mieloproliferativa trifásica que normalmente inicia-se na fase crónica, fase em que em cerca de 90% dos pacientes é feito o diagnóstico e em que o cromossoma Ph é, normalmente, a única alteração genética. Após uma média de 5 a 7 anos a fase crónica transforma-se numa fase acelerada caracterizada por um aumento do número de blastos a circular no sangue periférico e na medula óssea, com uma média de duração de 6 a 9 meses, terminando numa crise blástica que se manifesta de 3 a 6 meses. Esta última fase é identificada pelas alterações adicionais que podem ser a trissomia do 8 ou do 17 ou ainda a presença de um isocromossoma 17, juntamente com o bloqueio da diferenciação celular, que resulta na presença de 30% ou mais de blastos mieloides e linfoides no SP ou na MO, ou na presença de infiltrados de blastos em certos locais do organismo, tais como no fígado, baço ou nódulos linfáticos (Ren, 2005) (Jorgensen e Holyoake, 2007).

Na fase crónica desta doença, os pacientes possuem como características hematológicas: um elevado número de glóbulos brancos, principalmente os granulócitos em vários estádios de maturação (Figura 3); menos de 5% de blastos em circulação e menos de 10% de blastos e de promielócitos; o número de plaquetas pode estar aumentado e uma anemia normocítica normocrómica pode estar presente; a concentração da fosfatase alcalina dos leucócitos está normalmente baixa; os níveis de vitamina B₁₂ no soro e a proteína de ligação à vitamina B₁₂ encontram-se geralmente elevados; e a função fagocítica das células está normal (Ren, 2005).

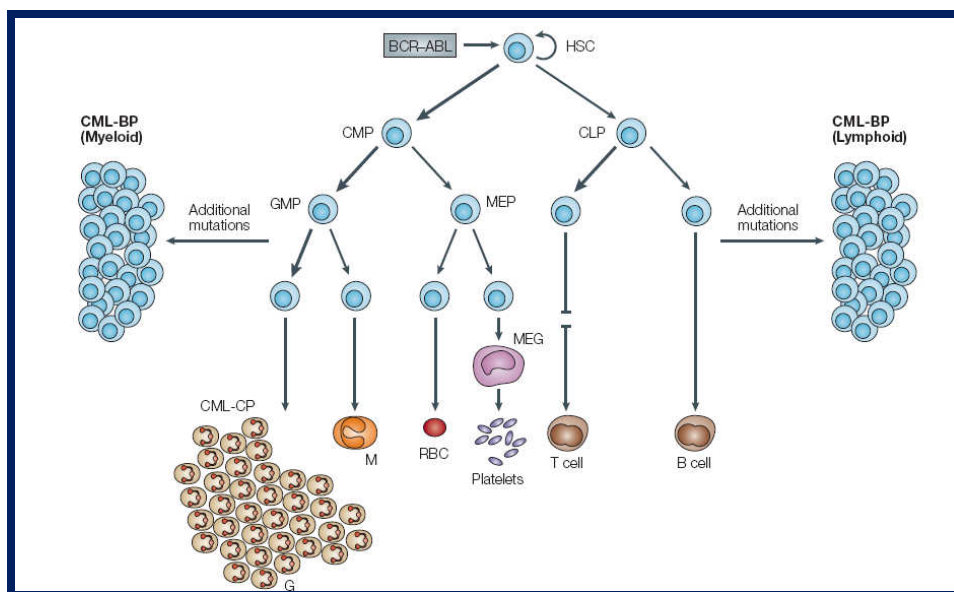


Figura 3 – Desenvolvimento da Leucemia Mielóide Crônica (Ren, 2005).

HSC – células estaminais hematopoiética, CMP – célula progenitora mielóide, CLP – célula progenitora linfóide, GMP – progenitor de granulócitos e macrófagos, MEP – progenitor de eritrócitos e megacariócitos, MEG – megacariócitos, M – macrófagos, RBC – progenitor de glóbulos vermelhos.

Segundo a caracterização de Sokal *et al*, esta doença evolui de uma fase crônica para uma acelerada, sendo esta definida por um aumento acentuado de anemia, por uma evolução clonal citogenética, pelo aumento da presença de blastos no sangue ou na medula para um total de 10 a 20%, a quantidade de basófilos encontra-se acima de 20% quer no SP quer na MO e o número de plaquetas é menor que 100 000/ μ l.

Após esta fase, dá-se um progresso da doença para a fase terminal denominada crise blástica, sendo esta definida como uma leucemia aguda, por isso mesmo, esta passagem por vezes é denominada de agudização da doença. Na crise blástica, a percentagem de blastos a circular no sangue periférico ou na medula óssea é superior a

20%, e neutrófilos hiposegmentados podem aparecer (Kasper et al, 2005) (Practice Guidelines in Oncology – v.1.2009).

3.3.1. Genética da Leucemia Mielóide Crónica

A Leucemia Mielóide Crónica resulta de uma translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22, formando o gene de fusão BCR-ABL que codifica uma proteína de fusão com o mesmo nome bcr-abl. O abl é uma tirosina cinase não receptora que está expressa em muitos tecidos. Nas células, o abl é uma proteína que se encontra distribuída quer no núcleo, quer no citoplasma da célula, podendo deslocar-se de um compartimento para outro. Esta proteína traduz sinais da superfície da célula, de factores de crescimento e de receptores de adesão celular para regular a estrutura do citoesqueleto.

O bcr é igualmente uma proteína de sinalização que é formada por múltiplos domínios modulares. A fusão do fragmento do gene BCR com o ABL durante a translocação associada à LMC aumenta a actividade de tirosina cinase do ABL e, consequentemente, origina novos domínios reguladores do ABL (Ren, 2005).

As proteínas bcr e abl têm vários domínios importantes na sua constituição (Figura 4). Existem duas isoformas da proteína abl (ilustradas na figura como 1a e 1b) formadas por *splicing* alternativo do primeiro exão, em que um deles contém um local de modificação de miristoilação (indicado na figura como *Myr*).

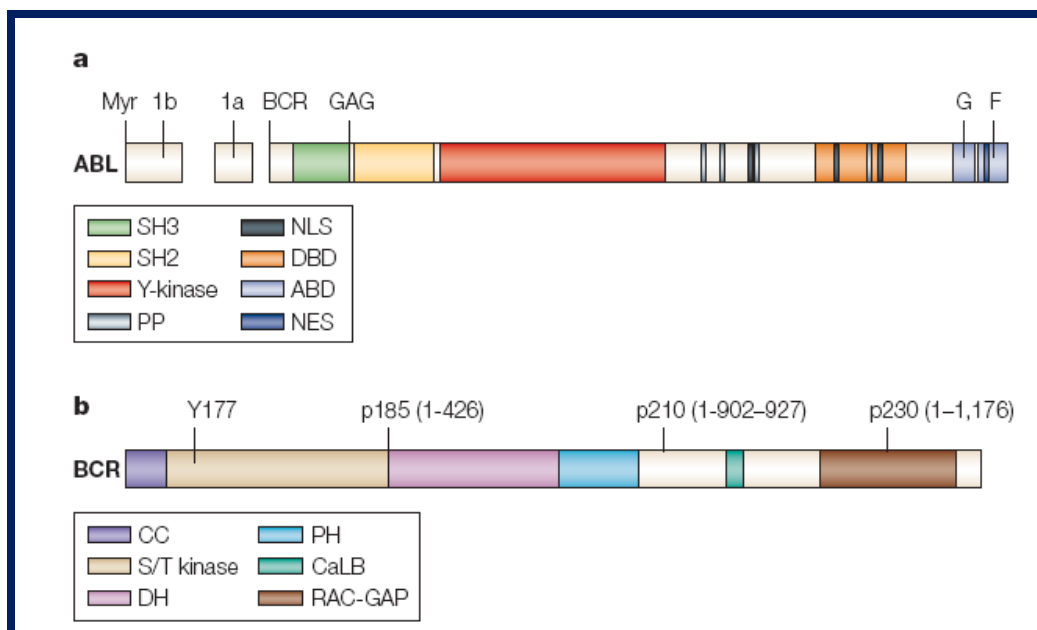


Figura 4 – As proteínas abl e bcr (Ren, 2005)

O processo denominado por miristoilação tem como finalidade ligar grupos de ácidos gordos miristato saturados à glicina existente no terminal amina da proteína.

O grupo miristoil, que existe na extremidade do segmento abl, liga-se ao domínio de tirosina cinase do bcr aquando a fusão e mantém os domínios SH2 e SH3 no lugar. Na outra extremidade da proteína, o abl contém quatro locais de ligação SH3 ricos em prolina (PP), três sinais de localização nuclear (NLS), um sinal de exportação nuclear (NES), um domínio de ligação de DNA (DBD) e um domínio de ligação da actina (ABD). Este último contém locais de ligação para ambas as formas: monomérica (G) e filamentosa (F).

Independentemente das sequências alternativas formadas, uma parte do terminal amina da proteína abl contém os domínios scr homólogo 3 (SH3), SH2 e de tirosina cinase (Ren, 2005).

A proteína bcr contém um domínio de oligomerização “coiled-coil”, um outro de cinase serina/treonina, um domínio com um factor de troca de nucleótidos guanina, um domínio homólogo à “pleckstrin”, um local de ligação de lípidos dependente de cálcio e uma proteína de activação de trifosfatase guanina. O bcr contém ainda um local de ligação para uma proteína adaptadora GRB2 no domínio de tirosina Y177, assim como para o GRB10 e 14 (Scheijen e Griffin, 2002).

O produto do cromossoma Ph, o oncogene BCR-ABL, codifica uma proteína quimérica, bcr-abl, que possui uma constante actividade de tirosina cinase abl, sendo esta a causa da LMC (Figura 5). Essa proteína pode ter 210 kDa, sendo a forma mais comum que surge em doentes portadores da doença, ou pode formar uma proteína com 190 kDa resultante de um ponto de quebra diferente no gene BCR, sendo menos frequente em doentes com Leucemia Mielóide Crónica (Wiesberg *et al*, 2007).

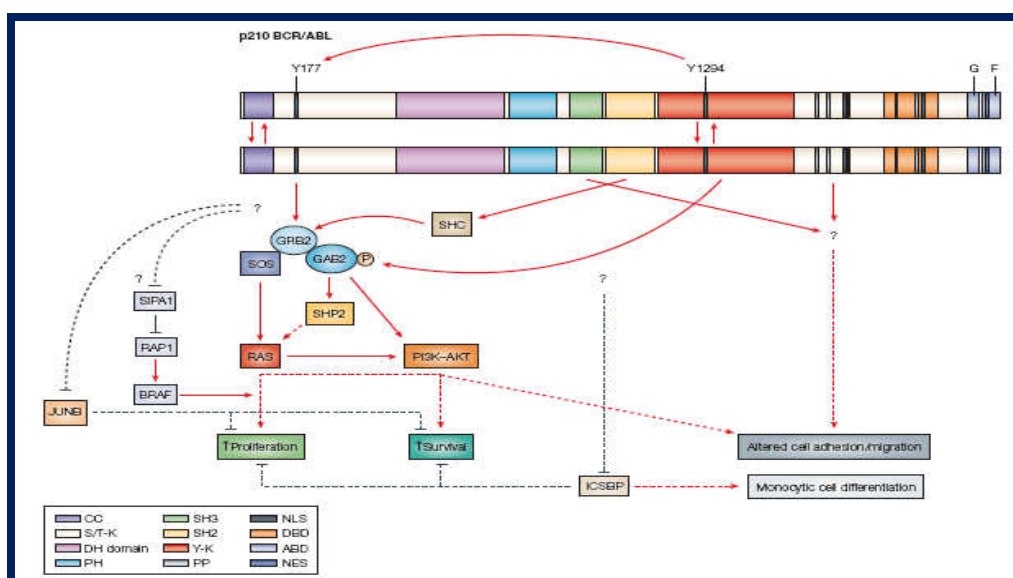


Figura 5 – As vias de sinalização adjacentes à forma mais comum de bcr-abl – p210 (Ren, 2005).

A proteína bcr-abl p190 é característica das LLA com a presença do cromossoma Ph, enquanto a proteína p230 é usualmente encontrada na leucemia neutrofílica crónica.

Todas as formas de bcr-abl possuem uma elevada actividade de tirosina cinase, no entanto, das três formas apresentadas, a p190 é a que possui maior actividade (Scheijen e Griffin, 2002).

3.3.2. Diagnóstico

O diagnóstico da Leucemia Mielóide Crónica é usualmente feito em análises de rotina, dado tratar-se de uma patologia assintomática numa fase inicial, podendo mesmo manter-se assim durante um período alargado de tempo. Este facto indica tratar-se de pacientes com um sistema imunitário competente. Quando os sintomas aparecem são, geralmente, devidos a uma expansão das células portadoras da proteína de fusão e passam por perda de peso, mau estar ou um desconforto causado por uma inflamação do baço (Quintás-Cardama e Cortes, 2006).

As técnicas para diagnóstico da doença são várias e complementares entre si, apresentando um alvo em comum, a pesquisa e identificação da t(9,22). Esta foi a primeira translocação a ser identificada e associada a uma patologia, em plena era de bandeamento, existindo em cerca de 90 a 95% dos doentes com Leucemia Mielóide Crónica. A Citogenética Convencional é importante no diagnóstico da doença para identificação desta translocação e, para tal, utiliza a técnica de bandeamento G com a finalidade de corar as bandas dos cromossomas, a fim de visualizar as metafases em microscopia óptica, tornando assim possível observar alterações adicionais características da evolução da doença (Figura 6).

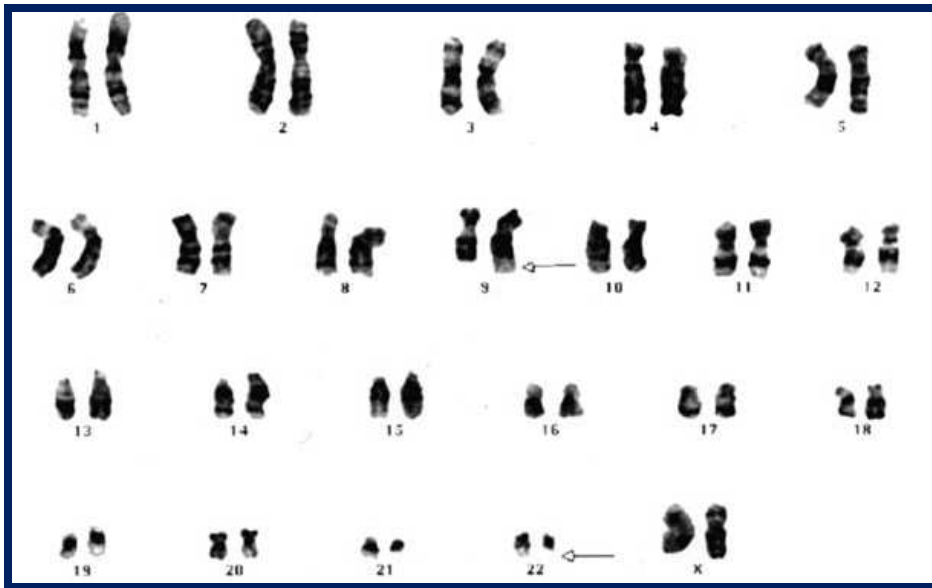


Figura 6 – Cariótipo Humano evidenciando a t(9,22) (Leukemia & Lymphoma Society)

A Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma outra técnica aplicada para o diagnóstico da LMC. Esta tem como princípio a marcação do DNA com uma sonda fluorescente. Para a detecção da translocação Ph, uma das sondas mais comuns é a *Locus Specific Identifier (LSI) BCR/ABL Dual Color*. Esta sonda é uma mistura de sondas, uma que marca o gene BCR, a verde, no cromossoma 22, e outra que marca o gene ABL, a vermelho, no cromossoma 9. Assim quando um núcleo tem a presença da t(9,22) surge um sinal amarelo, aquando a visualização em microscopia de fluorescência (Figura 7) (Mark *et al*, 2006).

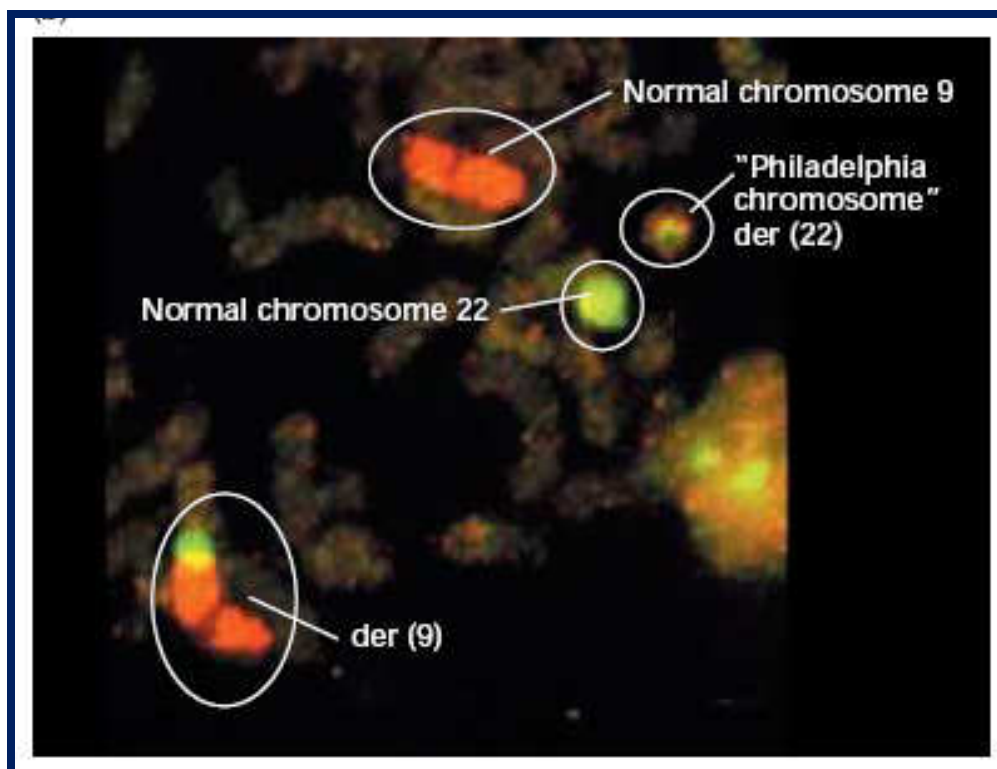


Figura 7 - Técnica de FISH mostrando uma célula com a t(9,22) (Lodish, 2003)

A Hibridização Genómica Comparativa (CGH) foi desenvolvida como uma técnica de citogenética molecular, como forma de ultrapassar as dificuldades presentes na Citogenética Convencional e na Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), isto é, poderá permitir que todo o genoma possa ser estudado numa única etapa, comparando um número de cópias de alterações no material genético com uma amostra controlo. De uma maneira geral, o procedimento da CGH parte de DNA isolado de amostras testes e de referência que são marcadas com uma sonda vermelha e verde, respectivamente.

Os rácios dos sinais de fluorescência vermelha e verde são medidos ao longo do eixo axial do cromossoma, o que leva a que a região cromossómica envolvida na deleção ou amplificação na amostra teste apareça a vermelho ou verde, respectivamente, mas as regiões dos cromossomas que estão igualmente representadas nas amostras teste e de referência apareçam a amarelo (Figura 8) (Inazawa *et al*, 2004).

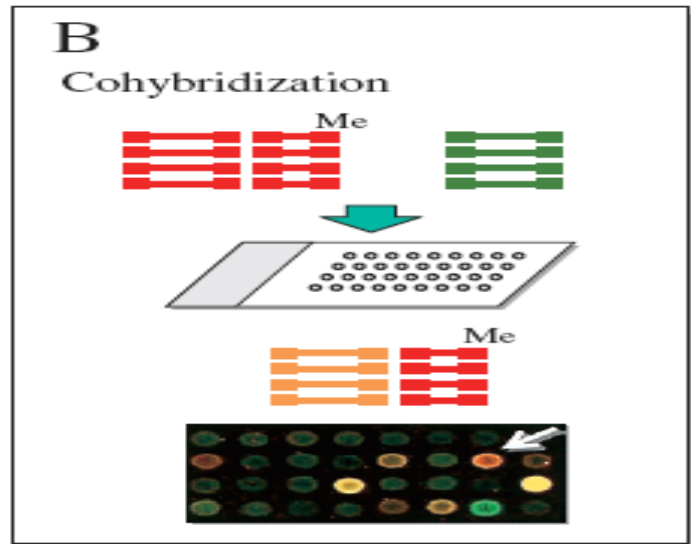


Figura 8 – Esquema representativo da técnica CGH (Inazawa *et al*, 2004).

A pesquisa e identificação do transcrito que as células possuem são obtidas por metodologia apropriada, o nested-PCR dado que, em LMC, os pontos de quebra no cromossoma 22 são restritos a uma região central do gene BCR chamado “*Major breakpoint cluster region*” (M-bcr), formando um transcrito que pode ser produzido por diferentes tipos de junções de BCR-ABL, dependente da posição do ponto de quebra no intrão 13 ou 14 do BCR. Este gene de fusão codifica uma proteína bcr-abl com 210 kDa, chamada p210^{BCR-ABL} (Figura 9).

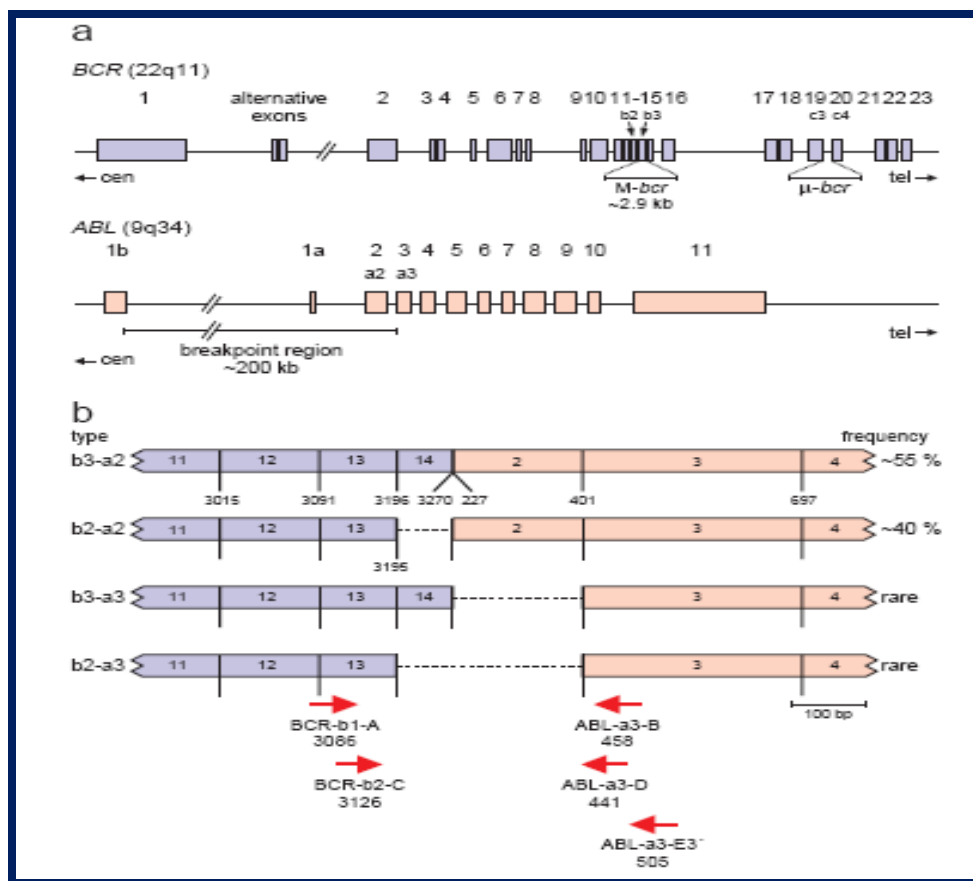


Figura 9 – a) Esquema dos exões e intrões dos genes BCR e ABL. b) Localização dos primers utilizados na identificação dos transcritos de BCR-ABL p210 por nested-PCR (Dongen *et al*, 1999).

Um segundo “*breakpoint cluster region*” no gene BCR foi bem identificado em LLA com a presença de cromossoma Ph. De facto, cerca de 40% de LLA com Ph⁺ evidenciam o mesmo tipo de transcrito que a LMC, nos restantes 60% de LLA com Ph⁺ o ponto de quebra do BCR localiza-se no chamado “*minor breakpoint cluster region*” (m-bcr) entre dois exões alternativos e o exão 2.

Os pontos de quebra no gene ABL estão virtualmente localizados numa larga região do intrão com cerca de 200Kb que se situa entre o exão 1b e o exão 2 (igualmente denominado de a2). Consequentemente ao ponto de quebra m-bcr só o primeiro exão do gene BCR (exão e1) é que liga o exão a2 do gene ABL (junção e1-a2).

Isto resulta na produção de uma proteína bcr-abl com um tamanho molecular de 190kDa (p190^{BCR-ABL}) (Figura 10). Embora esta junção tenha sido associada à LLA, esporadicamente surge também em LMC.

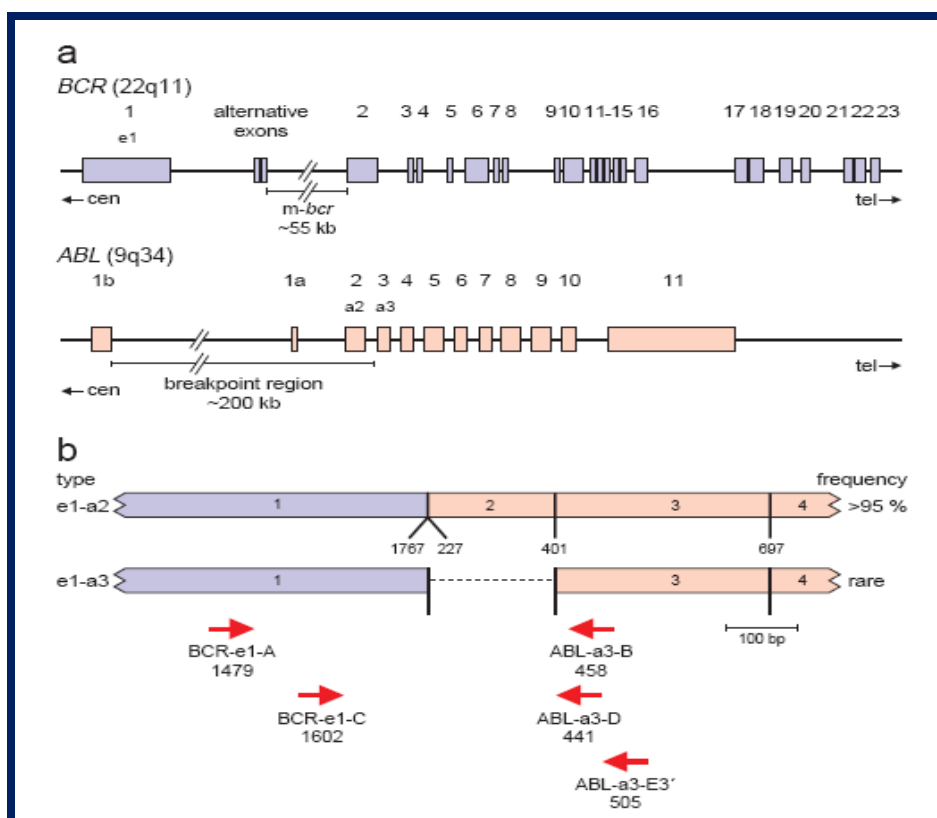


Figura 10 – a) Esquema dos exões e intrões dos genes BCR e ABL. b) Localização dos primers utilizados na identificação dos transcritos de BCR-ABL p190 por nested-PCR (Dongen *et al*, 1999).

Adicionalmente, foi reportado que todos os pacientes com Leucemia Mielóide Crônica possuem um tipo transcrito p210^{BCR-ABL}, embora, por um mecanismo de *splicing* alternativo, possam também expressar baixos níveis de transcrito e1-a2, cujo significado clínico e patogénico ainda está por elucidar (Dongen *et al*, 1999).

A monitorização dos pacientes portadores de LMC pela quantificação de mRNA de BCR-ABL, aplicando uma metodologia que utiliza o PCR em tempo-real, fornece

dados consistentes para avaliar as respostas dos doentes ao tratamento aplicado, como por exemplo uma redução lenta dos níveis de transcritos de BCR-ABL pode evidenciar uma resistência ao medicamento (Branford *et al*, 2004). Esta técnica é a mais adequada no que diz respeito ao estudo de baixos níveis de transcritos, tais como na análise de doença residual mínima (Joske, 2008).

3.3.3. Terapêutica em Leucemia Mielóide Crónica

3.3.3.1. Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas

O transplante de células estaminais alogénico é actualmente a única terapia curativa para a Leucemia Mielóide Crónica e, quando possível, é o tratamento de eleição. Contudo, esta opção apresenta muitas complicações pela elevada taxa de mortalidade durante o procedimento. O sucesso do transplante de células estaminais depende de vários factores tais como: a idade e fase da doença do paciente, a compatibilidade HLA do dador em relação ao paciente, a preparação do paciente antes do transplante, a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e o tratamento pós transplante (Quintás-Cardama e Cortes, 2006) (Radich *et al*, 2003).

3.3.3.2. Tratamento Clássico

As primeiras terapias aplicadas em doentes com LMC incluem o busulfan e a hidroxiureia que são frequentemente utilizados com a finalidade de reduzir rapidamente os glóbulos brancos em excesso (citoredução), a fim de minimizar danos nos órgãos causados por leucocitose.

Quando o transplante de células estaminais não pode ser aplicado, os pacientes fazem um tratamento com Interferão (IFN). Os Interferões são um grupo complexo de proteínas produzidas naturalmente nas células eucarióticas em resposta a vírus, antígenos ou mitogénios e possuem propriedades antiproliferativas, imunomodulatórias, microbicidas e antivirais (Joske, 2008).

3.3.3.3. Mesilato de Imatinib

O mesilato de imatinib é um derivado de 2-fenilaminopirimidina (Figura 11) que inibe a auto-fosforilação de quatro cinases: os receptores de tirosina cinase do factor de crescimento derivado de plaquetas α e β , o receptor de tirosina cinase c-kit e a proteína tirosina cinase abl incluindo o seu homólogo arg. (Budnoff *et al*, 2003)

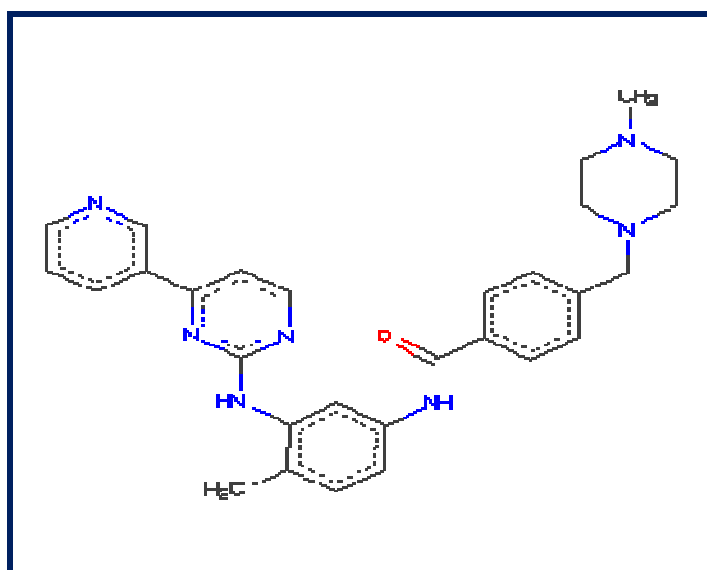


Figura 11 – Estrutura química do mesilato de imatinib (Weisberg *et al*, 2007).

Os tratamentos mais recentemente utilizados e com boas taxas de sucesso relativamente a remissões citogenéticas e moleculares são os inibidores de tirosina cinase.

As proteínas tirosina cinases são enzimas que transferem um grupo fosfato do ATP para as proteínas substrato, conduzindo a processos celulares como o crescimento e a diferenciação. A elevada regulação destas proteínas é indispensável dado que o descontrolo da actividade de tirosina cinase pode levar a uma transformação celular e ao início de uma neoplasia (Budnoff *et al*, 2003).

Os pacientes a que são diagnosticados a Leucemia Mielóide crónica numa fase precoce da doença, ou seja na fase crónica, após não responderem bem ao Interferão, recebem o mesilato de imatinib, um inibidor de tirosina cinase de primeira geração seguidos de Dasatinib, um inibidor de tirosina cinase de segunda geração aquando uma intolerância ou resistência ao anterior (Shah *et al*, 2007).

O inibidor selectivo de tirosina cinase, mesilato de imatinib (Figura 12) (Gleevec, STI571), consequente a vários estudos, foi demonstrado que fornece importantes benefícios no tratamento de doentes com LMC (Fausel, 2007).

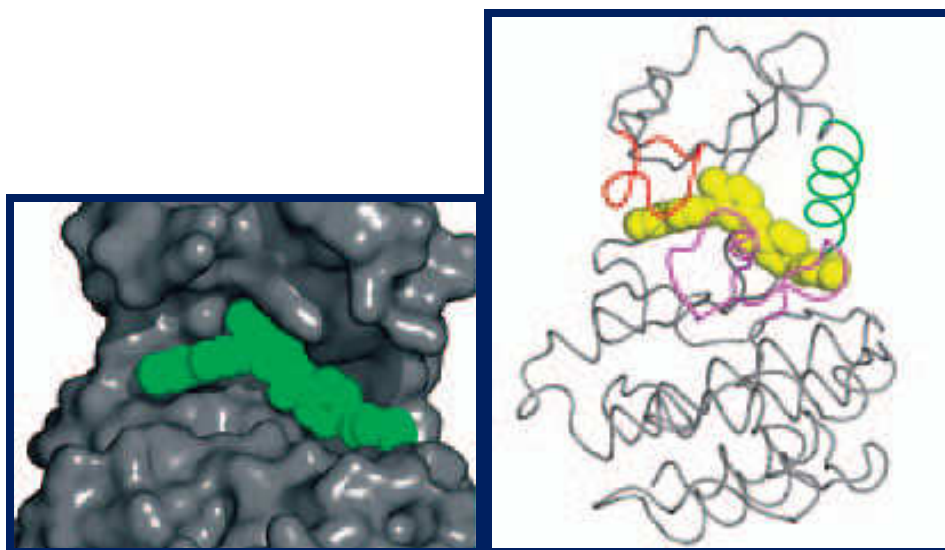


Figura 12 – Estrutura do complexo resultante do acoplamento do mesilato de imatinib à cinase abl (Weisberg *et al*, 2007).

Com a sua introdução no tratamento de Leucemia Mielóide crónica mudou-se completamente a gestão clínica e o prognóstico da doença (Schmidt *et al*, 2008).

As respostas associadas à utilização deste fármaco são, de uma maneira geral, favoráveis, sendo que, quando o tratamento é aplicado a doentes ainda na fase crónica, cerca de 98% podem entrar em remissão hematológica completa. Os mesmos estudos mostraram que entre 55 e 70% dos pacientes que se encontravam em crise blástica podiam atingir essa mesma remissão.

Relativamente à posologia do fármaco, de acordo com a relação dose/resposta na Leucemia Mielóide Crónica em comparação com a farmacocinética das células, foram recomendadas doses de 400 mg para a fase crónica e de 600 mg para uma fase mais avançada da doença. (Budnoff *et al*, 2003).

Contudo, a resistência ao mesilato de imatinib pode surgir em qualquer uma das fases da evolução da doença. Na maioria dos casos, a resistência surge após uma resposta inicial ao tratamento em que há uma reactivação da tirosina cinase BCR-ABL. O principal mecanismo responsável por essa mesma reactivação é a existência de mutações no domínio cinase do gene ABL, pois estudos mostraram que 35%, dos 90% de pacientes resistentes à terapêutica apresentavam-nas (Branford *et al*, 2004).

3.3.3.4. Nilotinib

O Nilotinib (AMN107) (Figura 13) é um derivado da fenilamina-pirimidina com cerca de 20 a 30 vezes mais potência de actuação que o mesilato de imatinib. Modelos cristalográficos mostraram que esse aumento de potência pode resultar do nilotinib

apresentar uma melhor topografia que o mesilato de imatinib para ligar a cinase abl (Figura 14).

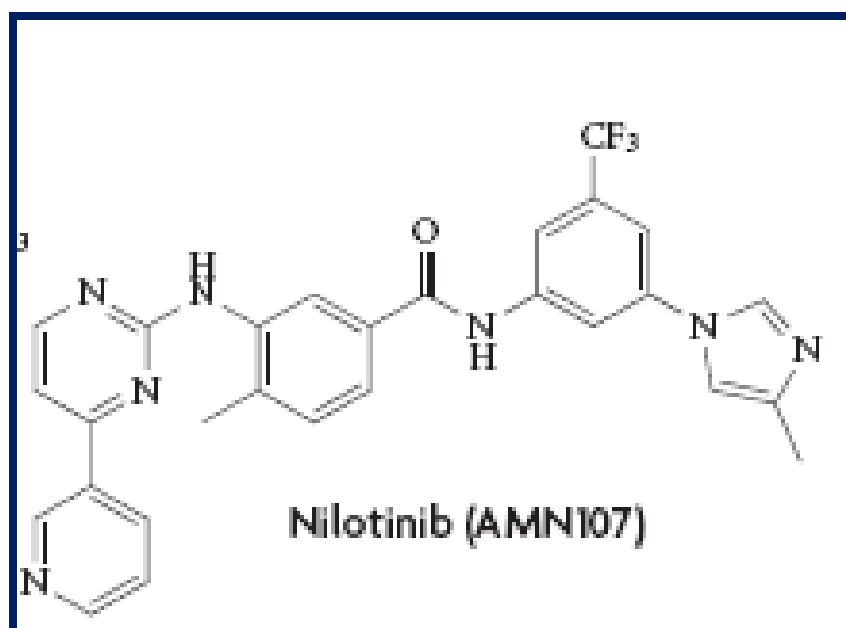


Figura 13 – Estrutura molecular do nilotinib (Weisberg *et al*, 2007).

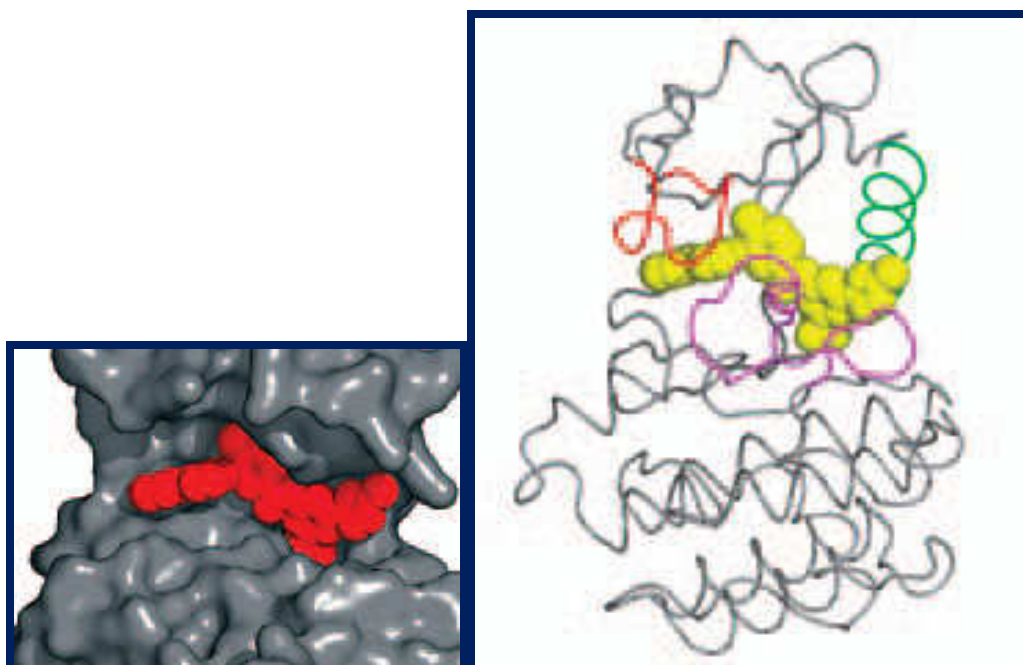


Figura 14 – Estrutura do complexo formado pela ligação do nilotinib à cinase abl (Weisberg *et al*, 2007).

Contudo, este fármaco, tal como o mesilato de imatinib, apenas liga a proteína bcr-abl na sua conformação inactiva. O nilotinib, mesmo assim, consegue actuar em alguns mutantes de BCR-ABL resistentes ao mesilato de imatinib (Quintás-Cardama e Cortes, 2006).

3.3.3.5. Dasatinib

Nos casos de resistência aplica-se um outro inibidor de tirosina cinase, o dasatinib (Sprycel®, Bristol-Myers Squibb, BMS-354825) (Figura 15). Este medicamento foi estudado para vencer mecanismos de resistência associada à terapia com mesilato de imatinib. Estudos *in vitro* mostraram que o dasatinib é 325 vezes mais eficaz que o mesilato de imatinib quando aplicado em células com BCR-ABL não mutado e actua na maioria das mutações que conferem resistência ao mesilato de imatinib, excepto na mutação T315I. Isto deve-se ao facto do dasatinib ligar o BCR-ABL em ambas as conformações, activa e inactiva. Esta terapêutica também inibe as cinases da família da scr igualmente implicadas na resistência ao mesilato de imatinib (Cortes *et al*, 2007) (Nguyen *et al*, 2007).

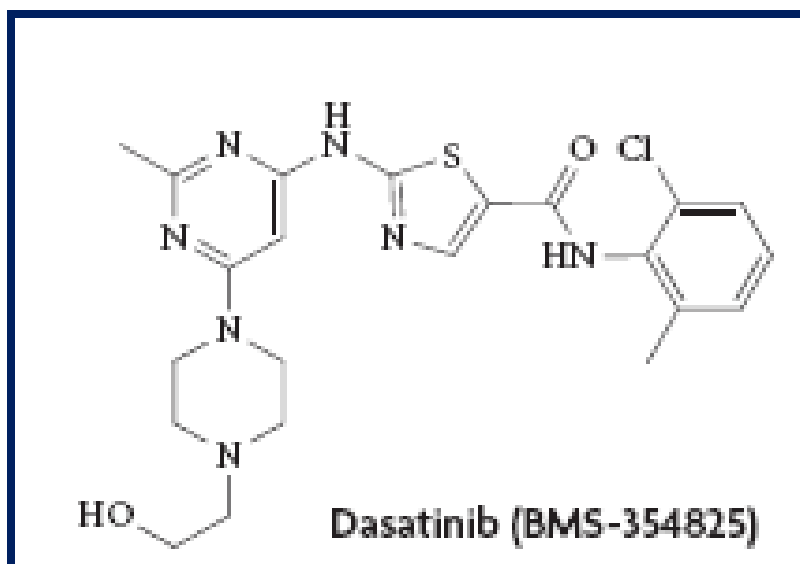


Figura 15 – Estrutura molecular do dasatinib (Weisberg *et al*, 2007).

O dasatinib é um competitivo do ATP e um inibidor específico para as cinases abl e scr com cerca de 100 a 300 vezes mais potente contra o BCR-ABL, relativamente à actuação do mesilato de imatinib (Figura 16) (Nguyen *et al*, 2007).

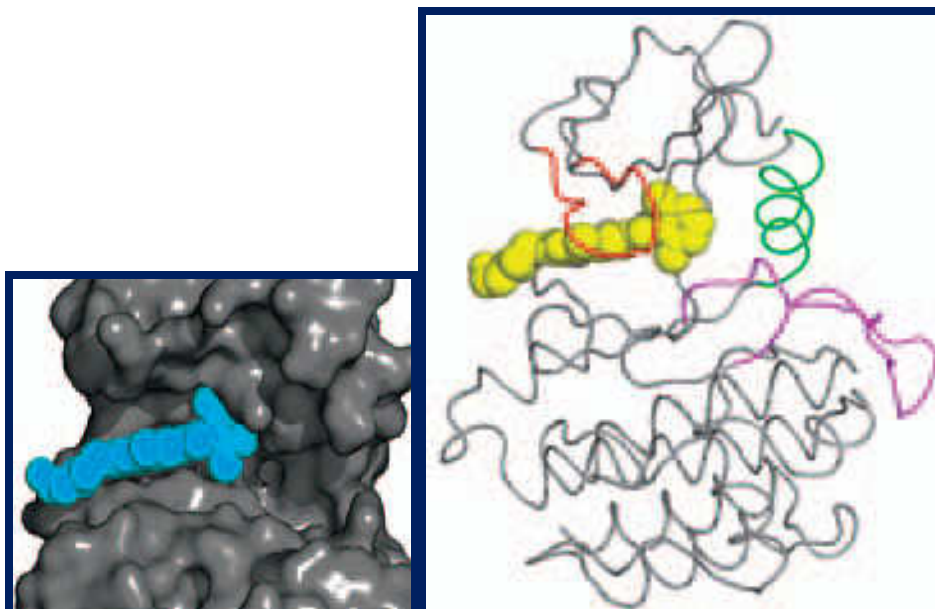


Figura 16 – Estrutura do complexo formado pela ligação do dasatinib à cinase abl (Weisberg *et al*, 2007).

Este fármaco também possui uma actividade significativa contra c-kit, receptor β do factor de crescimento derivado das plaquetas e as cinases hck, fyn, scr e lck (Weisberg *et al*, 2007).

3.3.3.6. BMS-214662

O BMS-214662 (Figura 17) é um fármaco citotóxico que inibe selectivamente a farnesyl transferase e demonstra ter actividade contra as células estaminais hematopoiéticas portadoras de LMC (Jorgensen e Holyake, 2007).

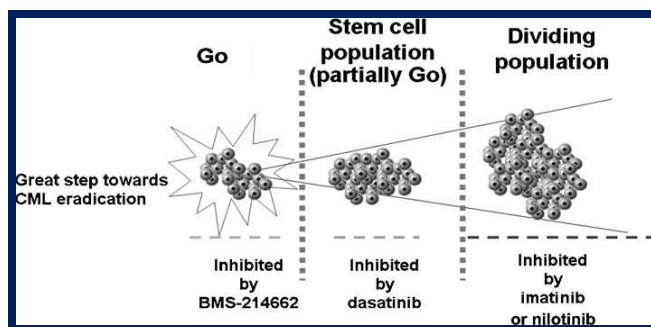


Figura 17 – O BMS-214662 é o primeiro fármaco que possui uma alta eficiência nas células estaminais leucémicas quiescentes (Jorgensen e Holyoake, 2007).

3.3.3.7. Bosutinib

Por causa de nenhum dos tratamentos referenciados anteriormente serem eficazes em relação a células com BCR-ABL com a mutação T315I, continuam os estudos para se alcançar uma terapia eficiente para estes casos. Assim sendo, vários fármacos estão a ser desenvolvidos, incluindo novos inibidores de tirosina cinase e inibidores de aurora cinase (Cang e Liu, 2008).

O bosutinib (SKI-606, Wyeth) foi desenvolvido como um inibidor de cinases da família *scr* para tratar tumores sólidos e, tal como o dasatinib, também actua no BCR-ABL, no entanto não inibe o *c-kit* nem o receptor do factor de crescimento derivado das plaquetas e não actua nos mutantes T315I. Este fármaco inibe a fosforilação de proteínas celulares tais como o *Stat5*, inibe a proliferação de células com LMC e inibe a fosforilação do local de auto-activação de cinases da família de *scr* (Weisberg *et al*, 2007) (Cang e Liu, 2008).

3.3.3.8. Inibidores de Cinase Aurora

A família aurora das cinases de serina/treonina são essenciais para a progressão mitótica. A Aurora A desempenha um papel fundamental na formação do eixo mitótico e na maturação do centrossoma, assim sendo, a inibição da actividade desta aurora leva a uma interrupção do ciclo celular. Existe também a aurora B que é uma proteína cromossomal essencial para o enrolamento cromossomal e para a citocinese, estando também associada a fenómenos durante as divisões da meiose. Em tecidos normais, a expressão da cinase aurora C está restringida às células germinativas, apesar da função desta enzima estar ainda por esclarecer (Weisberg *et al*, 2007).

Um inibidor de aurora cinase desenvolvido foi o MK-0457, tendo sido o primeiro fármaco activo no combate ao fenótipo T315I da LMC, no entanto a sua aplicação implica problemas de cardiotoxicidade (Cang e Liu, 2008).

3.3.3.9. Inibidores de BCR-ABL não competitivos com o ATP

O Imatinib, Nilotinib e Dasatinib são inibidores competitivos com o ATP e portanto capazes de serem afectados nas suas capacidades de ligação ao gene de fusão BCR-ABL pela mutação T315I.

Agentes que tenham outros locais de actuação como alvos, sem ser o local de ligação do ATP no domínio cinase do BCR-ABL, podem ultrapassar este problema.

O ON012380 (Onconova Therapeutics) inibe a proliferação de células com BCR-ABL, actuando no local de ligação do substrato do BCR-ABL, competindo assim com o substrato natural como o *Crkl* mas não com o ATP. De facto, o ON012380 causa uma regressão na doença induzida por injeções intravenosas em células 32DcI3 que expressam o mutante T315I do BCR-ABL.

Outro inibidor de BCR-ABL não competitivo pelo local de ligação do ATP é o BIRB796, um inibidor da proteína cinase activada por mitogénios p38 que liga com elevada afinidade ao mutante T315I do BCR-ABL, embora elevadas concentrações deste composto sejam necessárias para inibir a autofosforilação deste mutante em células Ba/F3 (Quintás-Cardama e Cortes, 2006).

3.3.4. Resposta Terapêutica

Os critérios seguidos para a resposta hematológica, citogenética e molecular ao tratamento aplicado ao doente tiveram em conta o *NCCN[®] - The practice Guidelines in Oncology – v.1.2009*.

Assim sendo, foi definida uma resposta citogenética como completa se não houver metafases positivas, major (completa e parcial) quando a percentagem de metafases Ph-

positivas for de 0 a 35%, parcial se as metáfases Ph-positivas estiverem presentes de 1 a 34% ou ainda minor quando existe de 35 a 90% de metáfases Ph-positivas.

A resposta molecular de um doente a um tratamento pode ser completa quando o mRNA de BCR-ABL é indetectável pelo PCR em tempo-real, ou major se os níveis de mRNA de BCR-ABL tiverem uma redução igual ou superior a 3 log dos níveis anteriores.

A resposta hematológica pode ser completa ou parcial. As características definidas para uma resposta hematológica completa foram: uma normalização completa do sangue periférico com o número de leucócitos inferior a $10 \times 10^9/l$, o número de plaquetas ser inferior a $450 \times 10^9/l$, no sangue periférico não existirem células imaturas como mielócitos, promielócitos ou blastos, e não haver sinais nem sintomas de doença, nem inflamação do baço.

A resposta hematológica é descrita como uma resposta hematológica completa, excepto se existirem células imaturas a circular no sangue periférico, o número de plaquetas for menos de 50% em relação ao valor apresentado no pré-tratamento mas superior a $450 \times 10^9/l$ e perante a presença de uma inflamação do baço (Figura 18).

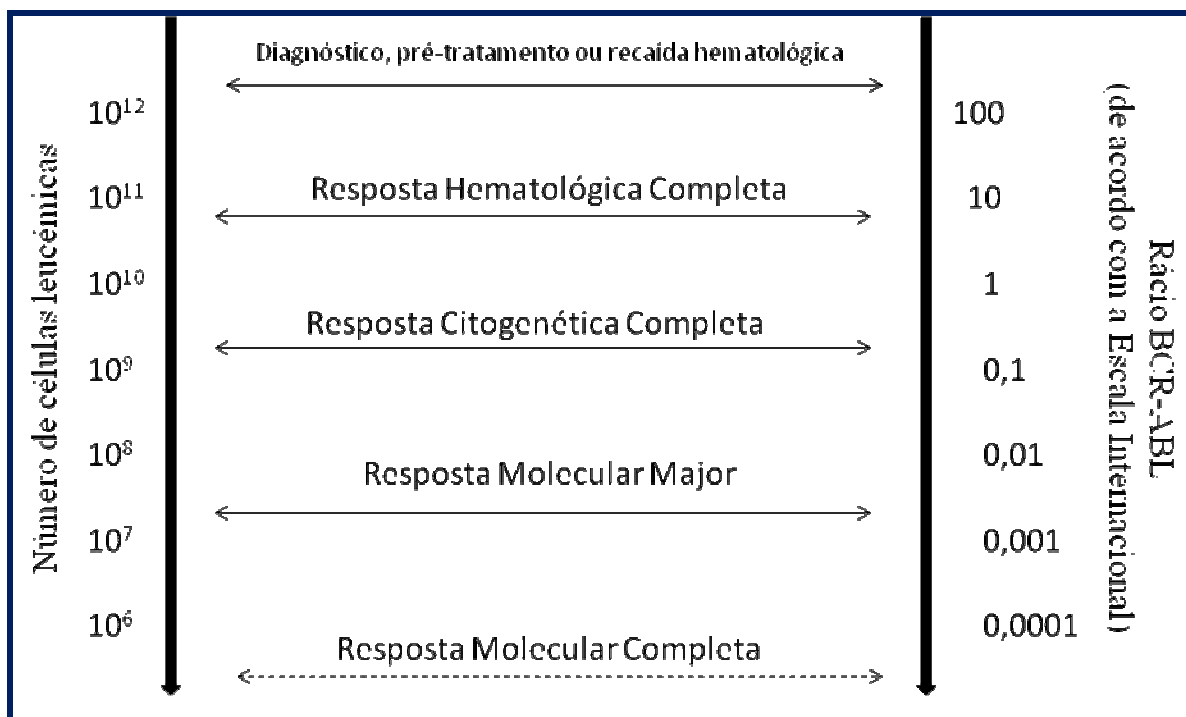


Figura 18 – Relação entre o número de células leucémicas, resposta e quantificação de transcrito de BCR-ABL nessas mesmas células (Joske, 2008).

3.3.5. Resistências à Terapêutica

Uma parte dos doentes com Leucemia mielóide crónica apresenta uma resistência primária ou secundária ao tratamento, sendo que a primeira surge em pacientes que nunca responderam à terapêutica, já a segunda ocorre em doentes que tiveram uma resposta inicial ao fármaco positiva mas, a qualquer momento, perderam essa capacidade de resposta e evidenciaram uma resistência.

Estima-se que em doentes com LMC em fase crónica a percentagem de resistência à terapêutica é menor que 2% por ano (Quintás-Cardama e Cortes, 2006).

A razão de resposta e a durabilidade da mesma ao mesilato de imatinib é dependente da fase da doença aquando o início do tratamento, ou seja, quando os

doentes estão numa fase mais avançada da LMC não respondem, em regra, tão bem à terapêutica (figura 19) (Deininger *et al*, 2005).

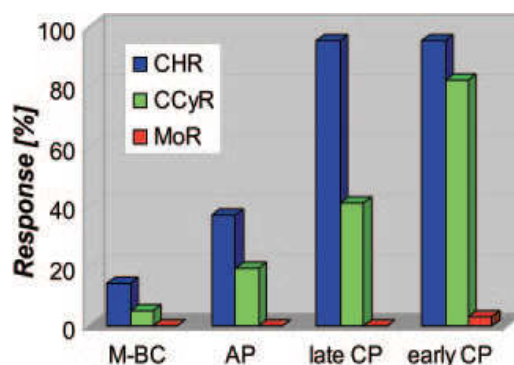


Figura 19 – Razão das remissões hematológicas completas (CHR), citogenéticas completas (CCyR) e moleculares (MoR) em doentes com mesilato de imatinib (Deininger *et al*, 2005).

A resistência ao mesilato de imatinib pode desenvolver-se em todas as fases da doença. O mecanismo mais comum de resistência adquirida ao fármaco é a reactivação da actividade cinásica do BCR-ABL nas células leucémicas, mesmo na presença do mesilato de imatinib. Isto ocorre, quer pela alteração na expressão génica dessas células, quer por possuírem mutações pontuais.

As mutações pontuais que surgem no domínio cinase ABL do gene de fusão são o mecanismo mais frequente da reactivação da actividade cinásica do gene. A base estrutural da proteína sugere que o mesilato de imatinib induz a proteína bcr-abl para a sua conformação inactiva pela ligação de amino ácidos ao domínio cinase ABL e bloqueia a ligação do ATP. Este facto evita a transferência do fosfato do ATP e bloqueia a via de sinalização adjacente, levando à diminuição da proliferação e à apoptose. Foi determinado que mutações no local de ligação do ATP evitam a ligação do mesilato de imatinib, quer por uma interrupção crítica dos pontos de contacto entre o fármaco e a proteína, quer pela indução de uma conformação na proteína que torna o mesmo incapaz de se ligar (Branford *et al*, 2003).

O dasatinib liga o domínio cinase Bcr-Abl também na sua conformação activa e por isso é mais eficaz contra a maioria das mutações que conferem resistência ao Imatinib. A excepção primária é a mutação T315I na base do local de ligação do ATP, esta confere resistência a todos os inibidores de tirosina cinase competitivos com o ATP (Shah *et al*, 2007).

Existem, no entanto, algumas estratégias para contornar a resistência ao mesilato de imatinib, tais como um aumento da concentração administrada do fármaco ao doente ou a combinação do mesilato de imatinib com outros medicamentos, como por exemplo o interferão. Vários estudos mostraram que o Interferão e o mesilato de imatinib têm um efeito sinérgico em células com BCR-ABL.

Existe ainda a hipótese de se mudar a medicação para um inibidor de tirosina cinase mais eficiente ou para um inibidor alternativo de BCR-ABL, tal como um inibidor não competitivo com o ATP.

A resistência de uma célula ao tratamento significa que a doença persiste mesmo na presença dos fármacos, neste caso, há uma reactivação da tirosina cinase BCR-ABL independentemente da presença da terapêutica. Essa resistência pode ser interpretada por vários mecanismos já apresentados, tais como mutações no domínio cinase do ABL, reactivação da proteína de fusão bcr-abl ou níveis intracelulares de Imatinib inadequados (Deininger *et al*, 2005).

4. Expressão Génica

Estão ainda muitas questões por esclarecer nos mecanismos intracelulares envolvidos na Leucemia Mielóide Crónica, como o porquê de uma resposta insuficiente ao tratamento aplicado em pacientes portadores de mutações no gene BCR-ABL.

É, portanto, desejável descobrir biomarcadores que possam determinar, previamente à aplicação da terapêutica, a resposta do doente ao mesilato de imatinib ou outro fármaco, o que pode também auxiliar a identificação antecipada de pacientes com uma resistência primária ao tratamento.

O estudo da expressão génica representa a única e mais poderosa ferramenta para a análise de alterações na expressão dos genes das células leucémicas, indicando o comportamento biológico específico, o estado da doença e a resposta do doente à terapêutica. (Schmidt *et al*, 2008).

Com os resultados desse estudo em LMC, podem estudar-se as vias de sinalização oncogénicas nas células e assim poderão desenvolver-se estratégias para alcançar a cura desta doença, bem como de outras leucemias, usando esses genes como alvos terapêuticos, pois diferentes vias de sinalização alteradas implicam diferentes estratégias terapêuticas (Etten, 2007).

Um mecanismo muito comum de resistência ao tratamento aplicado é um aumento significativo do gene de fusão BCR-ABL, estando por vezes associado a uma amplificação génica.

A alteração das vias de sinalização em células com o bcr-abl leva a um aumento da proliferação celular, redução da dependência de factores de crescimento e da

apoptose, e à perturbação da interacção com a matriz extra celular e o estroma (Deininger *et al*, 2005).

Os oncogenes de tirosina cinase são o resultado de mutações que induzem uma permanente actividade cinásica. Muitos desses oncogenes são derivados de genes como c-Abl, c-Fos, c-Kit ou outros, estando normalmente envolvidos na regulação da hematopoiese ou em funções da célula hematopoiética.

A fosforilação de resíduos de tirosina cinase é um mecanismo que transmite a activação de sinal da superfície da célula (quando as tirosina cinases são receptoras) ou de estruturas especializadas (quando são não-receptoras, como é o exemplo do que existe na proteína de fusão bcr-abl) para proteínas citoplasmáticas e para o núcleo da célula.

No caso da LMC, temos no citoplasma das células a presença de uma proteína de fusão bcr-abl com resíduos de tirosina fosforilados no contexto de uma sequência específica com uma alta afinidade para as proteínas adaptadoras.

Estes adaptadores não têm actividade catalítica intrínseca, mas desfrutam de uma interacção funcional independente com módulos como o domínio SH2 (em que a ligação entre ambos é mediada por resíduos de fosfotirosina), o domínio SH3 (interage com a região rica em poli-prolina), o domínio homólogo a pleckstrina (pela ligação de lípidos de inositol) ou o domínio de serina/treonina cinase (na ligação ao resíduo Y177) (Figura 20).

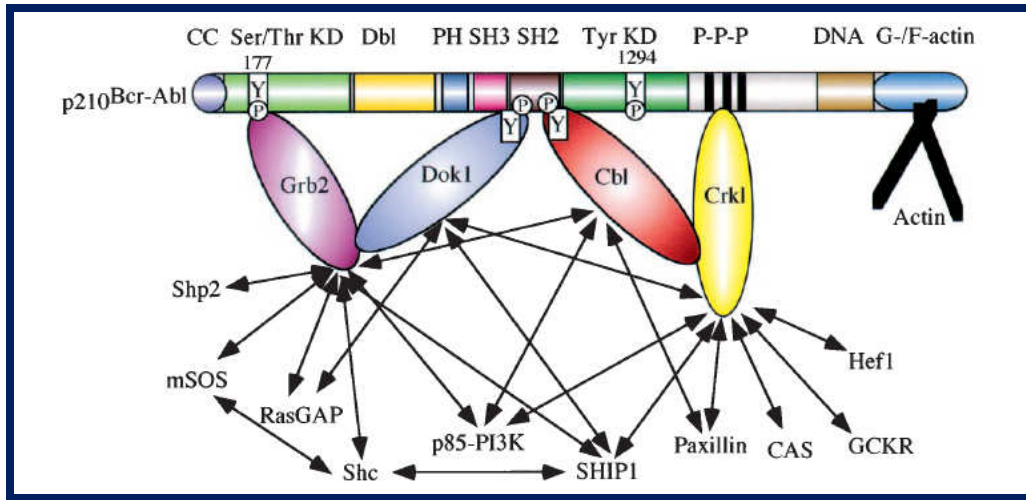


Figura 20 – Várias estruturas na proteína de fusão p210 e a sua interacção com as moléculas adaptadoras (Scheijen e Griffin, 2002).

As vias de sinalização que estão habitualmente envolvidas na mediação destes efeitos incluem a activação de cinases fosfatidilinositol 3 (*PI3K*), as *Ras/Raf/Map* cinases e a transcrição de activadores e transdutores de sinal (*Stats*) (Figura 21) (Scheijen e Griffin, 2002).

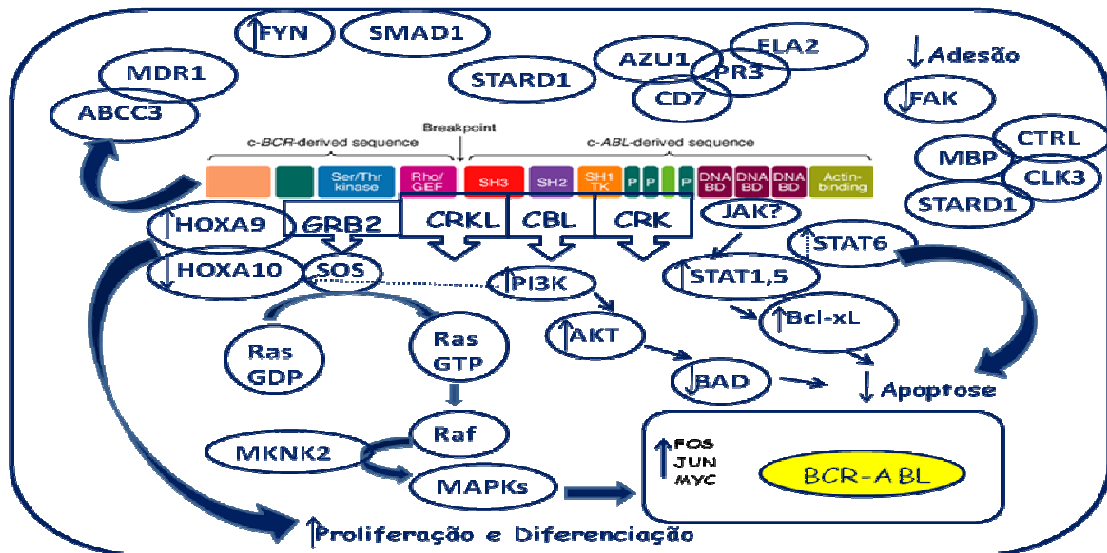


Figura 21 – Sinalização celular na presença de BCR-ABL na Leucemia Mielóide Crónica, mostrando os genes estudados.

Os genes estudados estão, de uma maneira geral, envolvidos em processos celulares hematopoiéticos. As suas funções e mecanismos de acção são os seguintes:

- Genes *HOX*

Vários estudos mostraram que os genes homeobox (*HOX*) estão identificados como importantes reguladores do desenvolvimento embrionário e desempenham um papel crucial na hematopoiese. Estes genes são factores de transcrição com um papel importante na diferenciação e desenvolvimento morfológico das células e parecem estar envolvidos na transformação em crise blástica de células com o oncogene BCR-ABL.

Existem 39 genes *HOX* agrupados de A a D. A maioria dos genes A e B estão preferencialmente expressos em células progenitoras da Medula Óssea (Sugimoto *et al*, 2008).

O *HOXA9*, um dos genes estudados, é um regulador chave na hematopoiese, induzindo a proliferação de células estaminais e bloqueando a diferenciação mieloide dessas células.

A expressão relativa de *HOXA9* está, normalmente, aumentada na fase acelerada da doença e, curiosamente, os pacientes com pior prognóstico possuem uma elevada razão *HOXA9/ABL* e rapidamente entram em crise blástica (Tedeschi e Zalazan, 2006).

Outro gene desta família estudado foi o *HOXA10*, cuja expressão está inibida em células com LMC levando a um aumento da proliferação celular, tornando assim evidente que o *HOXA10* é um importante regulador nestas células.

Por outro lado, a activação da via *PI3K* leva a uma diminuição da expressão de *HOXA10* e conseqüente inibição da apoptose. Contrariamente, os inibidores de tirosina

cinase Abl induzem a expressão de *HOXA10* em LMC inibindo a proliferação destas células (Sugimoto *et al*, 2008).

- Genes *SMAD*

As proteínas *Smad* podem ser divididas em três grupos diferentes dependendo do seu papel na transdução de sinal: as *Smad* com receptor activado (*R-Smad*), da qual faz parte a *Smad1* que foi um dos alvos deste estudo; a *Smad* comum às duas vias (*Smad 4*); e as *Smad* inibitórias (*I-Smad*). A via *Smad* participa na regulação da hematopoiese *in vitro* e *in vivo* (Larsson e Karlsson, 2005).

- Via *PI3K/AKT*

Várias linhas de evidência sugerem que a activação de *PI3K*, *RAS* e *STAT* representam distintos mecanismos de sinalização BCR-ABL que desempenham diferentes papéis na transformação da célula mediada pela proteína de fusão.

Um mecanismo de activação do gene *PI3K* envolve as proteínas adaptadoras *Crkl* e *Cbl* pela sua ligação aos domínios SH3 e SH2, respectivamente, do gene *ABL*. Outra molécula adaptadora importante nesta via é a *Crk*. A fim de estudar a expressão do gene *PI3K* foram seleccionados dois genes: *PIK3CA* e *PIK3CB*. O próximo substrato relevante nesta cascata de sinalização é a *Akt*. Esta, igualmente estudada, é uma cinase de serina/treonina que inibe a molécula pró-apoptótica *BAD*, pois aumenta a razão *Bcl-XL/BAD* (em que a *Bcl-XL* é uma molécula anti-apoptótica) promovendo assim a sobrevivência da célula (Hoover *et al*, 2001) (Deninger *et al*, 2000). Tal como a expressão do *AKT*, também a expressão do gene *BAD2* foi analisada.

A sinalização de *PI3K* está desregulada em vários tipos de cancro e é considerado um atractivo alvo para o desenvolvimento de novos agentes de quimioterapia. É

igualmente conhecido que esta via contribui para a transformação celular pelo BCR-ABL e inibidores do gene *PI3K* têm um efeito sinérgico com inibidores de cinase abl, conduzindo a um aumento de apoptose em células com LMC em pacientes quer em fase crónica, quer em crise blástica.

O efector mais estreitamente relacionado com a transformação celular é o *Akt*, estando este activado em várias vias que regulam o ciclo celular, o crescimento, o metabolismo e a sobrevivência das células. Assim sendo, o *Akt* seguido da activação de *PI3K* leva a uma diminuição de *HOXA10* nas células com LMC (Sugimoto *et al*, 2008).

- Via *JAK/STAT*

O *Stat5* (Transdutor de sinal e activador de transcrição 5) é codificado por dois genes similares igualmente estudados, *STAT5A* e *STAT5B*, que pertence a uma família de factores de transcrição que desempenham um papel importante na transmissão de sinais de receptores da superfície celular para o núcleo, onde o *STAT* liga uma sequência promotora de DNA específico e depois regula a expressão génica (Buettner *et al*, 2002).

As proteínas *Stat1* e *Stat5* sofrem uma activação inapropriada em células com LMC, apresentando uma fosforilação permanente que contribui para a transformação dessas células. Adicionalmente, a actividade da cinase (*Janus Kinase 2*) *JAK2* não é consistentemente observada, sugerindo uma fosforilação directa da tirosina e a activação de *Stat1* e *Stat5* por BCR-ABL. Esta fosforilação parece ser específica para a *Stat6* na forma p190 da proteína bcr-abl mais frequente em Leucemias Linfoblásticas Agudas (Lin *et al*, 2000).

A activação de *Stat5*, além de aumentar a proliferação celular, pode também levar ao aumento da expressão de *Bcl-xL* conduzindo assim a um efeito anti-apoptótico (Deninger *et al*, 2000).

- Via *MAPK*

A autofosforilação da tirosina Y177 fornece um local de ligação para a molécula adaptadora *Grb2*. Esta, depois de se ligar a uma proteína *Sos*, estabiliza a proteína *Ras* na sua forma activa com GTP ligado em que a proteína *Sos* é o factor de troca de GDP por GTP na proteína *Ras*. Deste grupo os genes estudados foram: *SOS1*, *HRAS* e *GRB2* (Deninger *et al*, 2000).

A via de sinalização *Ras* parece desempenhar um papel essencial na transformação de linhas celulares com BCR-ABL. Esta recruta uma cinase serine/treonina (*Raf*) (gene analisado *RAF*) para a membrana celular. Esta proteína conduz à fosforilação e activação de outras proteínas que fazem parte da via (proteína cinase activada por um mitogénio) *MAPK*. Para a integração celular das *Mapk* existe a actividade cinásica de *MKNK2* responsável por essa função. Uma das três maiores vias *MAPK*, a *MAPK p42/44*, também conhecida como uma cinase regulada por um sinal extracelular (*ERK*), é um mediador chave na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, onde a cinase N-terminal *c-Jun (JNK)* e a *MAPK p38* são activadas em resposta ao stress celular e citocinas inflamatórias induzindo a apoptose (Chu *et al*, 2004).

A activação da cascata de sinalização das *Mapk* leva ao aumento da expressão de *FOS*, *JUN* e *MYC* (Deninger *et al*, 2000), igualmente genes estudados.

Os genes estudados pertencentes a este grupo são: *MAP2K1*, *MAP3K1*, *MAP2K4*, *MAPK3* e *MAPK8*.

Outras cinases serina/treonina estudadas neste trabalho foram a *CLK3* e a *CTRL*.

Se se inibir a expressão das *MAPK*, inibindo as *MEK* (cinases reguladas por um mitogénio exterior) reduz-se significativamente a proliferação de progenitores de LMC. Aplicando o Imatinib com um inibidor de *MAPK* dá-se um efeito sinérgico e assim uma maior redução na proliferação de células com BCR-ABL, apesar de o Imatinib induzir por si só o aumento da actividade de *MAPK* (Chu *et al*, 2004).

- Gene *MDR1*

Juntamente com o aumento da expressão de BCR-ABL, o aumento da expressão de *MDR1* pode ser também observado em células com uma resistência ao Imatinib (Deininger *et al*, 2005).

Os genes *MDR1* e *ABCC3*, que pertencem à superfamília *ABC*, codificam glicoproteínas transmembranares capazes de bombear diferentes drogas para fora da célula neoplásica. Assim, a expressão destes genes levam a uma resistência multidroga nestas células (Galimberti *et al*, 2005).

- Genes *CD7/ELA2/PR3/AZU1*

O *CD7* é um marcador de diferenciação que está expresso em células T e progenitores mielóides imaturos.

PR3 (proteínase 3) e *ELA2* (elastase de neutrófilo 2) codificam proteases de serina que se acumulam em granulócitos e encontram-se com uma expressão aumentada em células com LMC. Ambas as proteases são alvos de linfócitos T citotóxicos em LMC.

Estudos mostraram que pacientes cujas células marcadas positivamente com CD34, que tinham um aumento na expressão do *CD7* juntamente com uma diminuição

na expressão de *ELA2* ou de *PR3*, apresentavam um pior prognóstico, sendo que o inverso nas expressões destes mesmos genes levava a um aumento na sobrevida dos doentes.

O gene *AZU1*, igualmente estudado neste trabalho, codifica uma proteína antibiótica com actividade antibacteriana e quimiostática. É igualmente um importante mediador inflamatório. Esta proteína é codificada por um gene que não sendo uma protease pertence a uma família de proteases de serina, da qual fazem parte a elastase 2 e a proteinase 3.

Quando existe uma actividade alterada da transcrição dos genes *AZU1*, *PR3* e *ELA2* a regulação da via mielóide sofre igualmente alterações (Yong *et al*, 2006).

- Genes *JUN*

Os genes desta família estudados foram *JUNB* e *JUN1*.

O *JUNB* é um componente da proteína-1 activadora (*AP-1*), da qual fazem parte as famílias *Jun*, *Fos* e *ATF*. As proteínas Jun formam dímeros para constituir o factor de transcrição *AP-1* que converte alterações em sinais extracelulares na transcrição de genes específicos. O *JunB* está constantemente expresso em granulócitos maduros e a sua expressão promove a diferenciação mielóide. Num estudo efectuado, mostrou-se que a expressão de *JunB* em pacientes com LMC está aumentada e que a sua expressão é afectada pela fase da doença, apresentando valores elevados em crise blástica, diminuídos na fase crónica e ainda mais baixos em pessoas sem LMC.

Essa expressão pode ser inactivada pela metilação da área do promotor do gene *JUNB* (Yang *et al*, 2003).

- Gene *MYC*

O *c-myc* é um factor de transcrição envolvido na proliferação celular e a sua expressão foi encontrada elevada em LMC em crise blástica. O *BCR-ABL* e o *c-myc* cooperam na transformação celular e o *BCR-ABL* activa a transcrição de *c-myc*. A presença do Imatinib diminui, geralmente, a expressão de *c-myc* em linhas celulares (Gómez-Casares *et al*, 2004).

- Gene *FYN*

O oncogene *BCR-ABL* estimula as vias de crescimento e sobrevivência celular pela fosforilação de vários substratos, incluindo alguns membros da família *src* como a proteína *fyn*, que se trata de uma tirosina cinase não-receptora associada à membrana. Estudos mostraram que a expressão de *FYN* está aumentada durante a crise blástica comparativamente à fase crónica da doença (Ban *et al*, 2008).

- Gene *STARD1*

Este gene é um regulador agudo esteroideogénico. Alguns estudos mostraram que este gene pode estar envolvido na hematopoiese e em perturbações na linhagem mielóide.

- Gene *MBP*

Este gene codifica uma proteína básica da mielina, que mostrou estar também presente na medula óssea e no sistema imunitário.

- Gene *FAK*

As células progenitoras de LMC exibem uma diminuição da adesão das células do estroma da medula óssea e da matriz celular. Em células transformadas com o *BCR-*

ABL a adesão celular está alterada pelo envolvimento de uma cinase de adesão focal (FAK), de paxilina, e de p130 Cas (Deninger *et al*, 2000).

As vias de sinalização adjacentes à proteína de fusão bcr-abl são várias e a sua expressão sofre variações ao longo da evolução da doença e da resposta ao tratamento (Figura 22) (Shet *et al*, 2002).

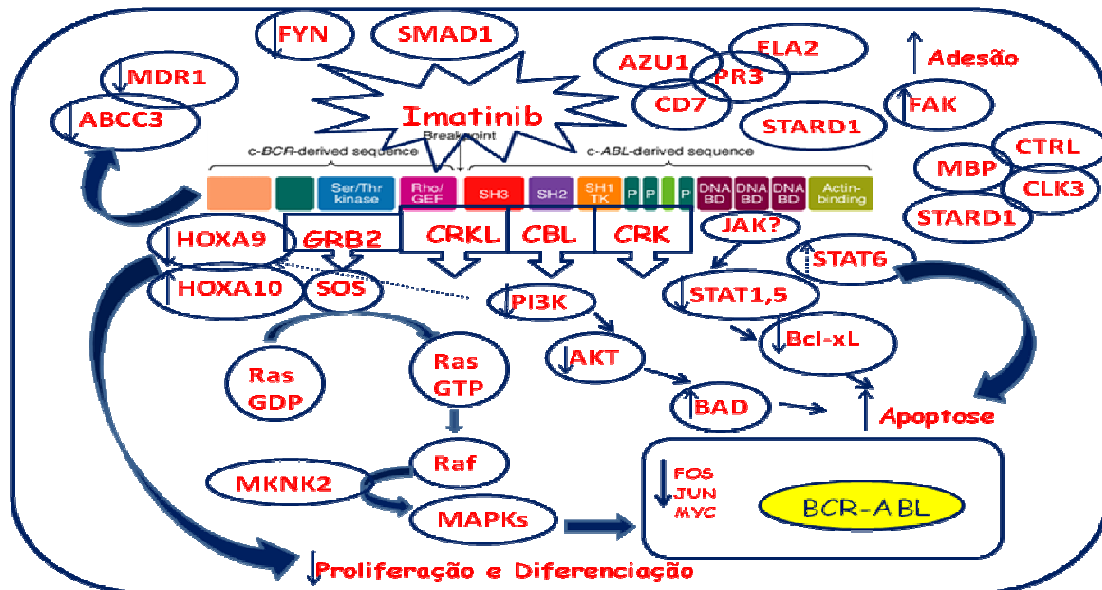


Figura 22 – As vias de transdução de sinal numa célula com a proteína p210^{BCR-ABL} afectadas pela presença do inibidor de tirosina cinase estudado – mesilato de imatinib.

5. Material e Métodos

5.1. Grupo de amostragem

Os doentes deste estudo foram examinados no Serviço de Hematologia do Hospital da Universidade de Coimbra, pelo corpo Clínico que colaborou com este projecto.

O grupo de pacientes estudados foram devidamente informados do objectivo do estudo a que iriam ser sujeitos aquando a recolha das amostras. Foram seleccionados para esta investigação doentes com LMC que fazem ou fizeram a terapêutica em estudo – mesilato de imatinib. As características do conjunto de amostragem estão representadas na Tabela I.

Tabela I – Características do grupo de amostragem estudado neste plano.

Doente nº	Idade	Sexo	Tempo Imatinib* (meses)	Tratamento 1ª linha
1	31	F	42	Interferão
2	35	M	12	Interferão
3	66	M	14	Interferão
4	44	F	9	Interferão
5	50	F	12	Interferão
6	74	F	4	Interferão
7	39	M	8	Interferão
8	40	M	6	Interferão
9	35	M	24	Interferão

*Tempo (em meses) após o diagnóstico da doença em que foi iniciado o tratamento com Imatinib.

5.2. Extração de RNA

Tal como em muitos outros ensaios moleculares, o primeiro passo deste estudo foi a extração de RNA. Assim sendo, as amostras de sangue periférico foram colhidas para tubos PAXgene, com um volume aproximado de 2,5 ml de material biológico em 6,9 ml de uma solução apropriada para conservação de RNA nas mesmas, cuja composição não é descrita pela empresa fornecedora. Após a colheita, essas amostras foram enviadas ao Laboratório de Genômica Funcional do Centro de Histocompatibilidade do Centro, onde as mesmas foram registadas e armazenadas a 4°C até ter sido aplicado o protocolo.

O *PAXgene™ Blood RNA System* (Qiagen®, Hilden, Alemanha) foi o sistema utilizado para a extração de RNA intracelular do sangue periférico. Este sistema é constituído por tubos apropriados para a colheita, transporte e armazenamento das amostras e por um kit específico para a purificação de ácidos nucleicos.

Os tubos *PAXgene* contêm um aditivo que estabiliza o perfil de expressão génica *in vivo*, reduzindo a degradação do RNA *in vitro* e minimizando ou mesmo eliminando a indução génica, conduzindo assim a uma maior fiabilidade dos resultados obtidos em ensaios moleculares.

Neste protocolo, o pellet lavado e ressuspenso foi incubado em tampões otimizados juntamente com a Proteinase K (PK), tendo esta a função de digestão de proteínas. Procedeu-se a uma centrifugação através de colunas específicas a fim de homogeneizar o lisado celular. Adicionou-se etanol a 100% para ajustar as condições de ligação dos ácidos nucleicos à membrana de sílica. Após várias lavagens, a membrana

foi tratada com uma mistura de DNase I para remover o DNA existente nas amostras. Seguidamente a outras lavagens, o RNA foi eluído utilizando um tampão de eluição apropriado e foi submetido a uma incubação a 65°C para desnaturar o RNA, evitando assim a formação de estruturas secundárias.

5.3. Integridade e Concentração do RNA

Efectuou-se ainda um protocolo para avaliar a integridade do RNA nas amostras, pois as mesmas podem ter uma elevada concentração de RNA e este não estar contaminado mas pode apresentar-se degradado. Assim, o *kit RNA 6000 Nano Chip®* foi aplicado no aparelho *Agilent 2100 Bioanalyser* com a utilização do *software 2100 expert* da *Agilent Technologies (Agilent, Palo Alto, EUA)*.

Este método permitiu a análise das amostras com a aplicação de apenas 1µl de cada. O resultado foi ilustrado com um electroferograma que evidenciava os rácios ribossómicos eucarióticos (rRNA18S e rRNA28S), o valor da integridade do RNA numa escala de 1 a 10 de *RIN (RNA Integrity Number)* e a concentração de RNA presente em cada amostra.

O protocolo foi aplicado de acordo com as instruções da *Agilent Technologies*.

5.4. Síntese de cDNA

A partir do RNA total das células procedeu-se à síntese de cDNA utilizando o *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen Corp., Carlsbad, EUA)*. Este sistema está optimizado para a síntese de cDNA a partir de RNA para aplicações em PCR em tempo-real, utilizando uma mistura de *SCIII RT* que é formada por Oligo

dT (2,5 µM), *random hexamers* (2,5 ng/µl), MgCl₂ (25 mM), dNTP's (10mM), *primers* (50µM) e tampão (10x), à qual se adiciona RT Enzyme Mix fornecida no mesmo kit, que engloba a transcriptase reversa SuperScriptIII e a RNaseOUT. Esta enzima por não ser inibida nem pelo RNA de transporte, nem pelo RNA ribossomal, foi aplicada no RNA total extraído nas amostras em estudo. As amostras foram colocadas no termociclador, juntamente com a mistura, às seguintes temperaturas: 25°C durante 10 minutos, 50°C durante 30 minutos e 85°C durante 5 minutos.

Depois da síntese de cDNA fez-se uma digestão das moléculas híbridas de RNA com a aplicação da enzima RNase H, sendo a amostra posteriormente incubada durante 20 minutos a 37°C seguida de diluição.

5.5. Expressão Génica

A fim de alcançar a expressão relativa dos genes em estudo (Tabela II) nas amostras seleccionadas, utilizou-se a amplificação no PCR em tempo real *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA)* com a aplicação do Kit *QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen®, Hilden, Alemanha)*.

O PCR em tempo real monitoriza os processos de amplificação usando técnicas de fluorescência.

O SYBR Green é uma sonda específica para cadeias duplas de DNA, em que os produtos de PCR ficam saturados pela ligação da sonda e emitem fluorescência. Esta sonda exhibe muito pouca fluorescência aquando em solução e só aumenta a fluorescência quando ligada à cadeia dupla do produto de PCR formado (Wilhelm e Pingoud, 2003) (Bustin, 2000).

Essa fluorescência aumenta de intensidade ao longo da amplificação do DNA tornando assim possível a sua detecção pelo aparelho (Bustin e Mueller, 2005).

As amostras foram estudadas em duplicado, existindo duas réplicas em estudo por gene.

Tabela II – Sequência de referência do gene, tamanho do transcrito analisado e localização genômica de cada gene estudado (www.genecards.com e www.geneglobe.com).

Gene	Sequência de Referência	Tamanho do transcrito (pb*)	Localização genômica	tamanho de amplificação (pb*)	exões amplificados
HOXA9	NM_152739.3	2076	7p15-p14	70	6 e 7
HOXA10	NM_018951.3	2648	7p15-p14	101	1 e 2
MBP	NM_001025081.1	2300	18q23	60	3 e 4
MDR1	NM_000927.3	4872	7q21.1	139	9 e 10
ABCC3	NM_003786.3	5176	17q22	106	17 e 18
CTRL	NM_001907.1	1184	16q22.1	114	
CRKL	NM_005207.3	5336	22q11; 22q11.21	90	
ELA2	NM_001972.2	938	19p13.3	135	3 e 4
PR3	NM_002777.3	1001	19p13.3	69	4 e 5
AZU1	NM_001700.3	912	19p13.3	120	2 e 3
FAK	NM_014781.4	6670	8q11	87	19/20/21
JAK2	NM_004972.3	5097	9p22	133	21/22/23
PIK3	NM_006218.2	3724	3q26.3	108	13 e 14
PIK3	NM_006219.1	3213	3q22.3	86	7 e 8
GRB2	NM_002086.4	3303	17q24-q25	101	5 e 6
HRAS	NM_001130442.1	1169	11p15.5	71	4 e 5 e 6
RAF	NM_002880.3	3291	3p25	132	5 e 6
MAP2K1	NM_002755.3	2603	15q22.1-q22.33	134	2 e 3
MAPK3	NM_001040056.1	2005	16p11.2	177	8 e 9
MAPK8	NM_002750.2	1417	10q11.22	155	10 e 11
FOS	NM_005252.2	2084	14q24.3	123	2 e 3
JUN	NM_002228.3	3338	1p32-p31	89	
JUNB	NM_002229.2	1832	19p13.2	145	
MYC	NM_002467.3	2377	8q24.21	129	2 e 3
BAD	NM_004322.3	1240		173	
AKT	NM_001014431.1	2794	14q32.32; 14q32.32	138	12 e 13 e 14
CD7	NM_006137.6	1318	17q25.2-q25.3	129	3 e 4

CLK3	NM_001130028.1	2713	15q24	150	6 e 7
MAP2K4	NM_003010.2	3752	17p11.2	91	3 e 4
MAP3K1	NM_005921.1	7522	5q11.2	96	3 e 4
MKNK2	NM_017572.3	1778	19p13.3	132	5 e 6 e 7
SMAD1	NM_001003688.1	2880	4q31	67	5 e 6
SOS	NM_005633.3	8331	2p22-p21	117	20/21/22
STARD1	NM_000349.2	2695	8p11.2	104	1 e 2
STAT1	NM_007315.3	4326	2q32.2	114	6 e 7 e 8
STAT6	NM_003153.3	3993	12q13	127	15 e 16
STAT5A	NM_003152.3	4298	17q11.2	124	18 e 19
STAT5B	NM_012448.3	5171	17q11.2	101	11 e 12
FYN	NM_002037.3	2650	6q21	116	2 e 3 e 4

* pb – pares de bases

Cada reacção comportou 10µl de QuantiTect SYBR Green (com uma concentração inicial de 2x), 2µl de QuantiTect Primer 10x concentrado, 2µl de cDNA e água sem RNases até perfazer um volume total de 20µl.

Como controlo endógeno utilizou-se o gene *β-actina*, dado ser um gene em que a sua expressão é considerada estável em muitos tecidos, mesmo quando sujeitos a tratamentos.

Em primeira análise foi obtida uma quantificação absoluta em todas as amostras para cada gene em Ct (*cycle threshold*), em que esse valor de Ct corresponde ao número de ciclos percorridos quando a fluorescência da sonda ultrapassa o valor limiar estabelecido (Bustin, 2000).

Trata-se de uma expressão relativa dado que a expressão dos genes em estudo foi relativa à expressão do gene controlo, sendo determinada calculando o delta Ct (ΔCt) subtraindo o valor de Ct do gene em estudo ao do gene de controlo para cada amostra, processo ao qual se dá o nome de normalização.

Os dados foram então analisados por um software apropriado, *qBase plus*, de maneira a poder interpretar com maior fiabilidade os resultados obtidos para cada gene

apresentando os resultados de expressão de cada gene normalizados (Bustin *et al*, 2009).

6. Resultados e Discussão

Integridade e concentração de RNA nas amostras estudadas

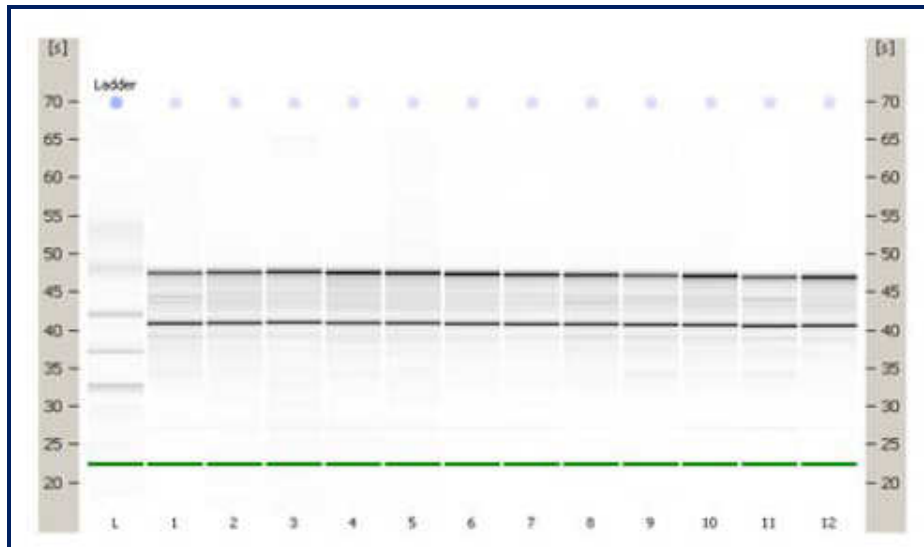


Figura 23 – Electroferograma mostrando a integridade do RNA.

Esta figura representa o electroferograma obtido com o *software* da *Agilent* utilizado para determinar a integridade e concentração de RNA nas amostras. O *ladder* é o marcador molecular e de 1 a 12 estão representados os rácios ribossómicos das amostras. O valor médio de *RIN* nas amostras foi de 9 e a concentração de RNA nas amostras foi o desejado, segundo as instruções da *Agilent*, para estudo de expressão génica, tal como foi verificado na figura que mostra as curvas de amplificação obtidas nessas amostras.

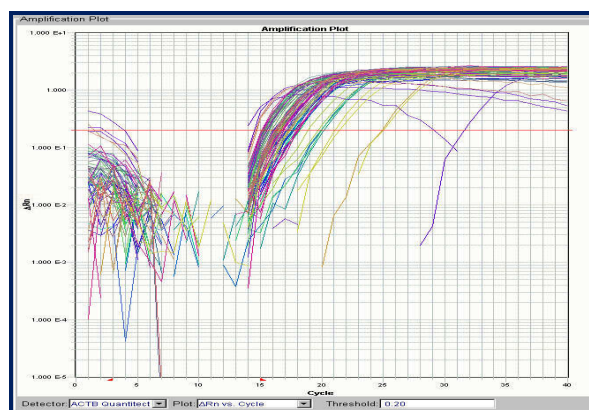


Figura 24 – Curvas de amplificação obtidas no PCR em tempo real para o gene de controlo.

Quantificação Relativa do gene de fusão

O grupo de amostragem deste estudo, constituído por nove doentes, foi monitorizado com a quantificação relativa do gene de fusão determinada de três em três meses, tal como é recomendado pelo NCCN[®] - *The practice Guidelines in Oncology* – v.1.2009.

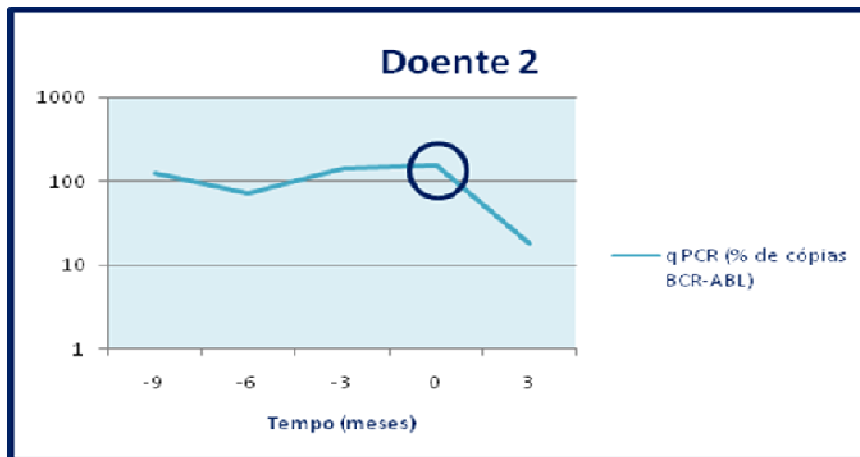


Figura 25 – Evolução do nº de cópias de BCR-ABL para o doente 2.

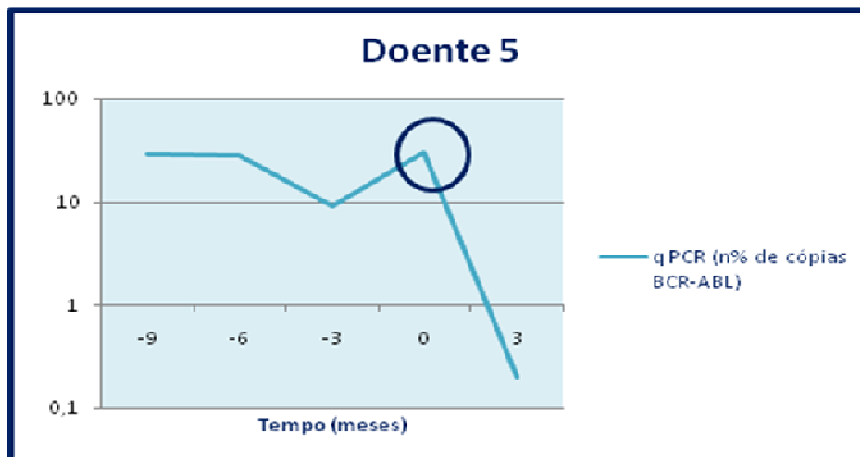


Figura 26 – Resultados da quantificação de BCR-ABL para o doente 5.

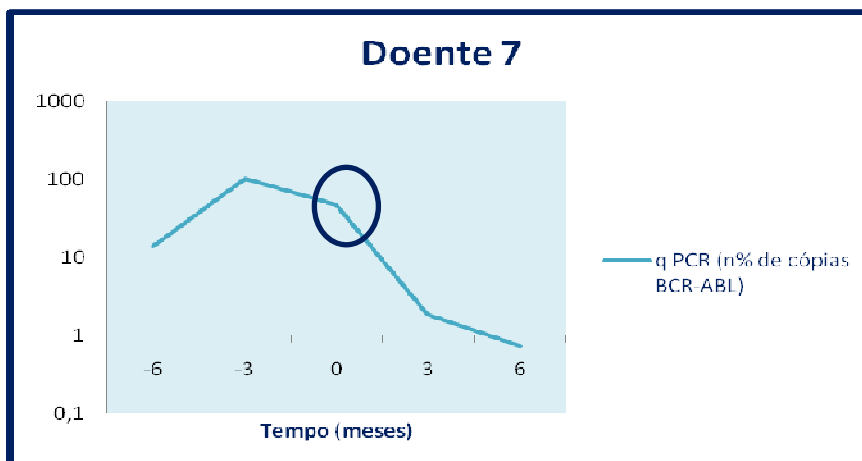


Figura 27 – Valores de qPCR ao longo do tempo de estudo para o doente 7.

No conjunto de doentes analisado, três evidenciaram uma redução do número de cópias de transcritos de BCR-ABL após a introdução do Imatinib. O doente 2 apresentou uma redução equivalente a 1log, enquanto nos doentes 5 e 7 a redução verificada foi de 2 log.

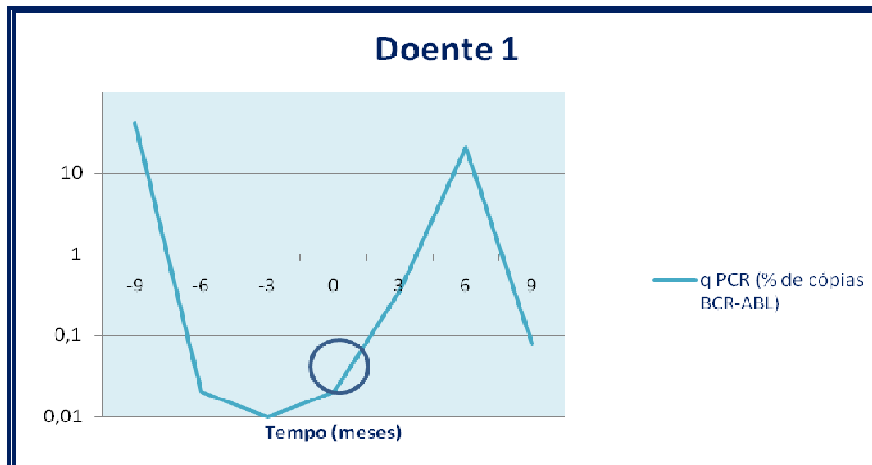


Figura 28 – Evolução dos valores de qPCR durante o tempo de estudo no doente 1.

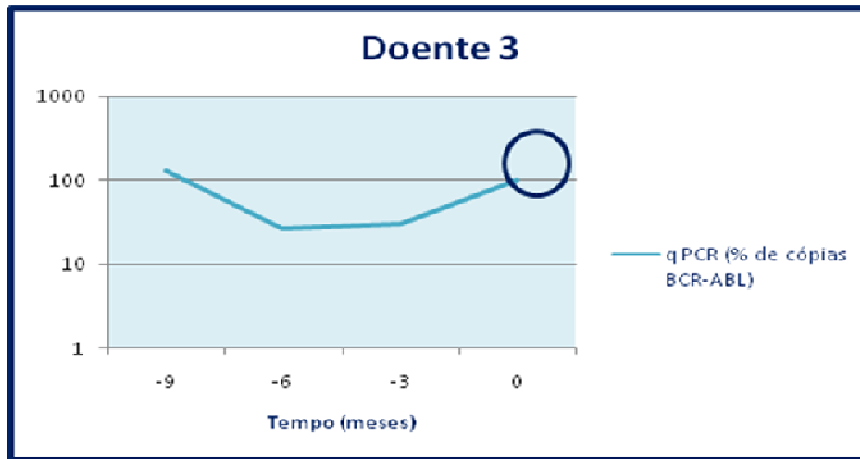


Figura 29 – Percentagem de cópias de BCR-ABL nas amostras do doente 3

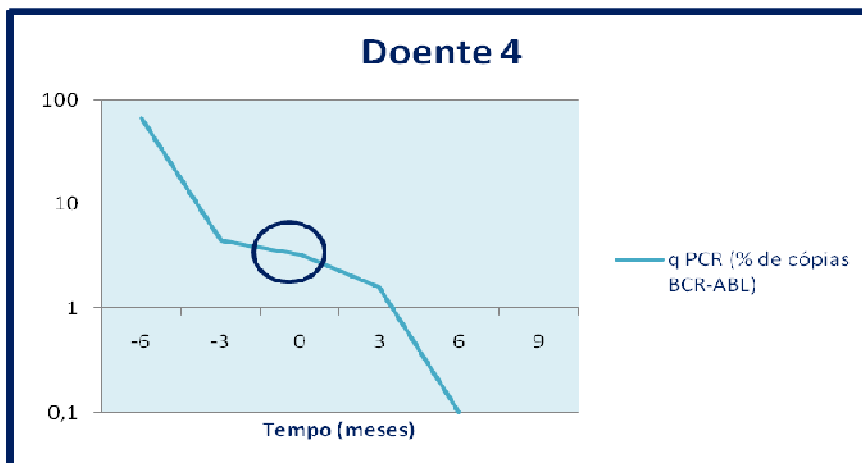


Figura 30 – Variação dos valores de qPCR ao longo do tempo estudado para o doente 4.

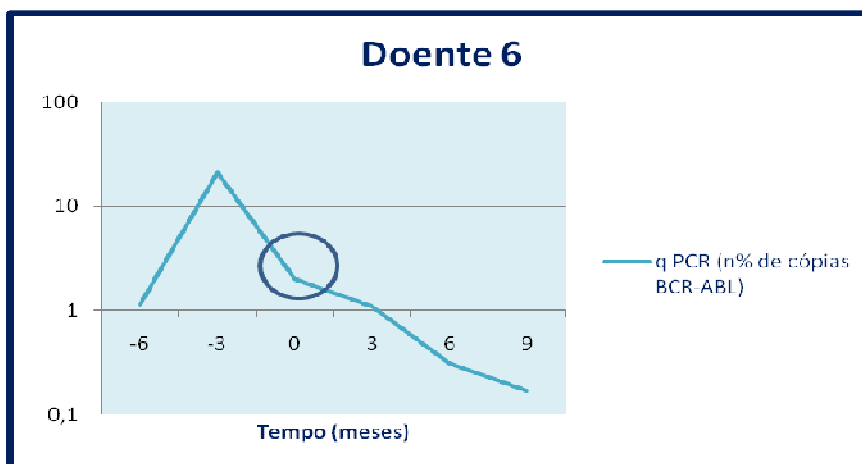


Figura 31 – Evolução da expressão relativa do gene de fusão para o doente 6.

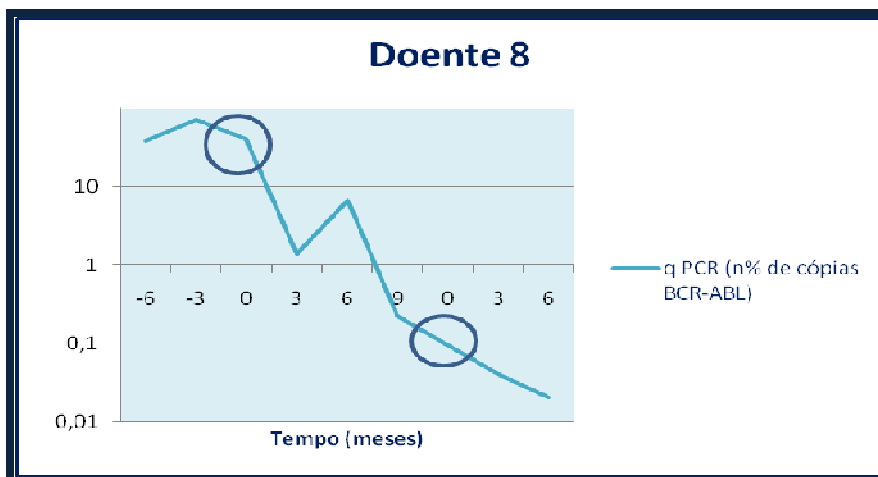


Figura 32 – Valores da quantificação do gene de fusão para o doente 8.

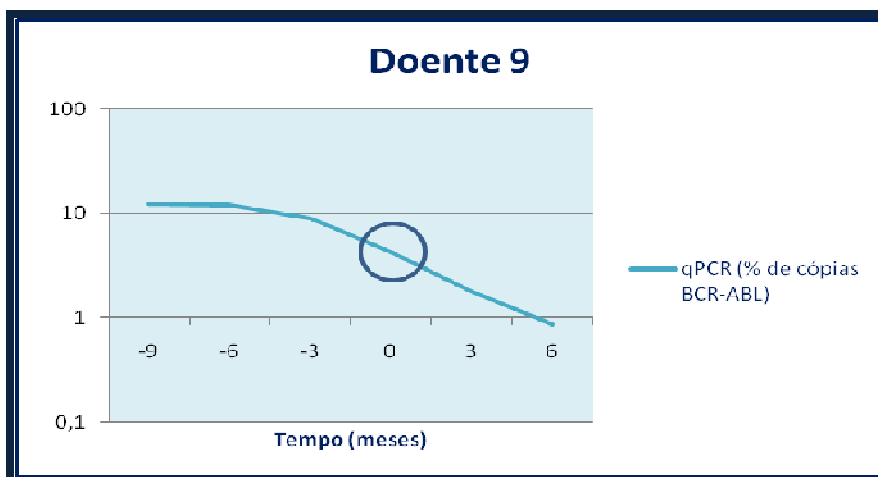


Figura 33 – Resultados do qPCR ao longo do tempo estudado para o doente 9.

Assim como ilustrado nos gráficos com os resultados da quantificação relativa de gene de fusão, nove casos estudados apresentaram diferentes curvas no período de tempo analisado. Os doentes 2, 5 e 7 apresentaram uma significativa tendência para uma redução nos níveis de transcritos do gene de fusão após a introdução do mesilato de imatinib.

A presença da proteína de fusão, característica da Leucemia Mielóide Crónica, leva à alteração da expressão dos genes envolvidos nas vias de sinalização adjacentes ao p210^{BCR-ABL}. Estas, quando perturbadas, originam um aumento na proliferação de células e uma diminuição da apoptose e da adesão celular (Deninger *et al*, 2005).

Em consequência dos resultados obtidos neste grupo de doentes, pode subentender-se que as células com a proteína de fusão responderam ao fármaco introduzido, podendo ter ocorrido uma diminuição na proliferação celular ou um aumento na adesão celular ou na apoptose.

Expressão Génica, expressão do gene de fusão e resposta ao tratamento

Um dos principais objectivos deste trabalho foi verificar se ocorriam diferenças significativas na expressão dos genes analisados, antes e após a administração do inibidor de tirosina cinase, ou seja, encontrar genes em que a sua expressão seja claramente afectada, directa ou indirectamente, pelo tratamento aplicado.

Neste estudo analisou-se a expressão de trinta e nove genes envolvidos nas principais vias de sinalização intracelular afectadas pela proteína de fusão bcr-abl. Esta análise foi efectuada desde nove meses antes da aplicação da terapêutica em observação – Imatinib – até nove meses após a intervenção da mesma, sendo que a cada três meses foram avaliadas o número de cópias de BCR-ABL e a expressão dos genes em estudo.

Os valores obtidos para a expressão relativa dos genes em estudos foram calculados num software apropriado com uma eficiência de amplificação dos runs do PCR em tempo real igual a dois e um erro associado a essa eficiência de 0,010.

O gene utilizado como controlo endógeno neste estudo, a β -actina, apresenta valores de expressão estáveis, independentemente do tratamento aplicado a essas células. Assim, os resultados de expressão relativa para os genes em estudo são fiáveis no que diz respeito à sua correlação com o controlo endógeno analisado, processo ao qual se dá o nome de normalização da expressão dos genes. Neste trabalho avaliou-se a expressão relativa de um grupo de genes que estão envolvidos em processos hematológicos, a fim de se encontrar um potencial alvo terapêutico no combate à patologia em estudo.

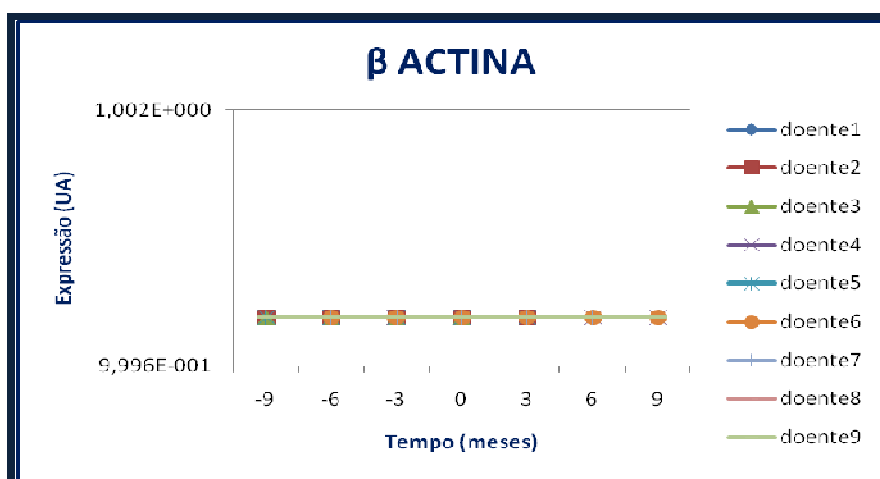


Figura 34 – Expressão do gene de controlo.

Dos trinta e nove genes estudados, em três verificou-se uma nítida tendência para uma redução na sua expressão na maioria dos casos estudados (*PR3*, *AZU1* e *ELA2*).

▪ Genes *PR3*, *ELA2*, *AZU1* e *CD7*

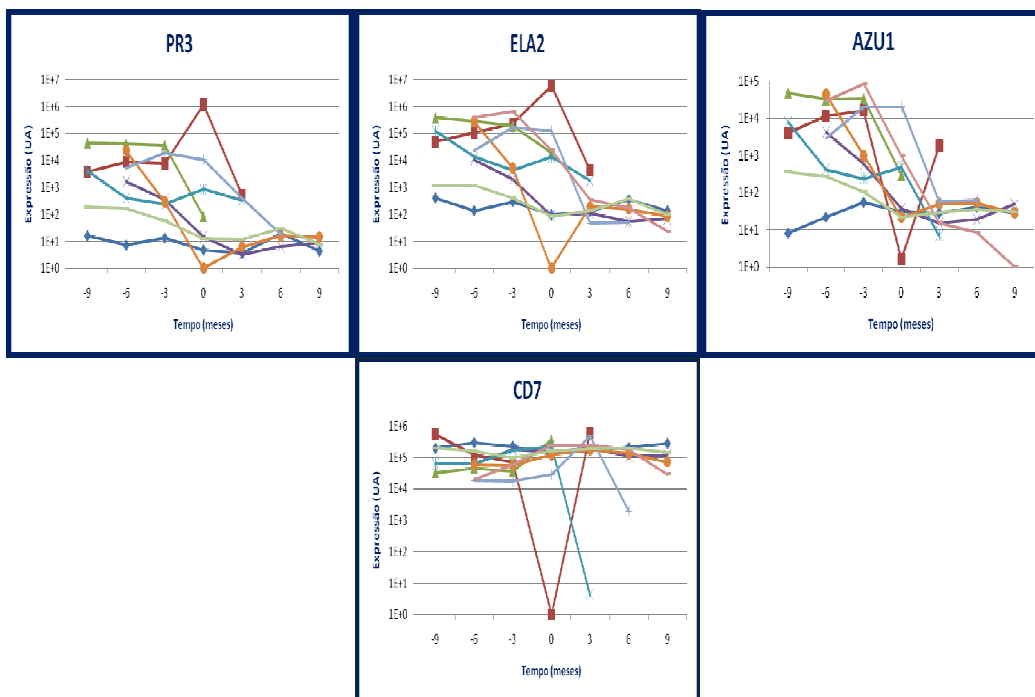


Figura 35 – Expressão dos genes *PR3*, *ELA2*, *AZU1* e *CD7*.

Legenda:



Relativamente à expressão destes genes surgiu uma nítida tendência para uma diminuição, no conjunto total de doentes, após a introdução do inibidor de tirosina cinase.

Em média, a diminuição na expressão do gene *ELA2* a partir do início do tratamento foi de 3log, e a redução de expressão do gene *PR3* verificada foi entre 1 e 3 log.

Verificou-se igualmente que o gene *AZU1*, após a introdução do fármaco, teve uma diminuição na sua expressão equivalente a 2 log.

O *AZU1* codifica uma proteína antibiótica (Yong *et al*, 2006) e a redução na sua expressão conduz a uma diminuição na actividade antibacteriana e quimiostática nessas células.

A expressão do gene *CD7* apresentou-se sensivelmente estável, surgindo apenas um aumento no doente 2 com a introdução do inibidor de tirosina cinase.

Normalmente a expressão de *PR3* e de *ELA2* está aumentada em LMC e estudos efectuados em células marcadas positivamente com CD34 com um aumento na expressão de *CD7* e uma diminuição na expressão de *ELA2* ou *PR3* apresentavam pior prognóstico (Yong *et al*, 2006).

Relativamente aos resultados obtidos neste grupo de doentes, esta teoria não pode ser aplicada a nenhum caso. O doente 2 apresenta uma diminuição na expressão de *ELA2* e de *PR3* e um aumento na expressão de *CD7*, no entanto, o valor obtido no tempo zero foi indeterminado. Assim sendo, é difícil concluir se houve realmente esse aumento na expressão do gene *CD7*, dado que estes valores conferem mau prognóstico e o doente em questão apresenta, após a introdução do inibidor de tirosina cinase, uma redução na quantificação de transcritos de BCR-ABL em cerca de 1log, significando que o doente está no trajecto da remissão molecular.

▪ Via MAPK

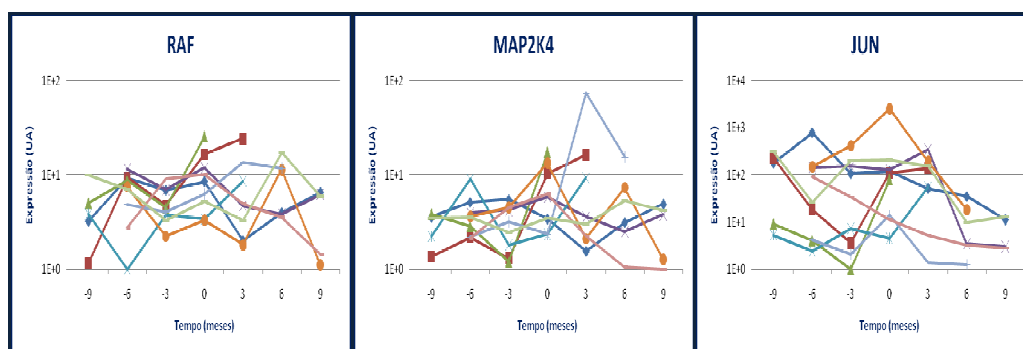


Figura 36 – Expressão dos genes RAF, MAP2K4 e JUN.

Legenda:

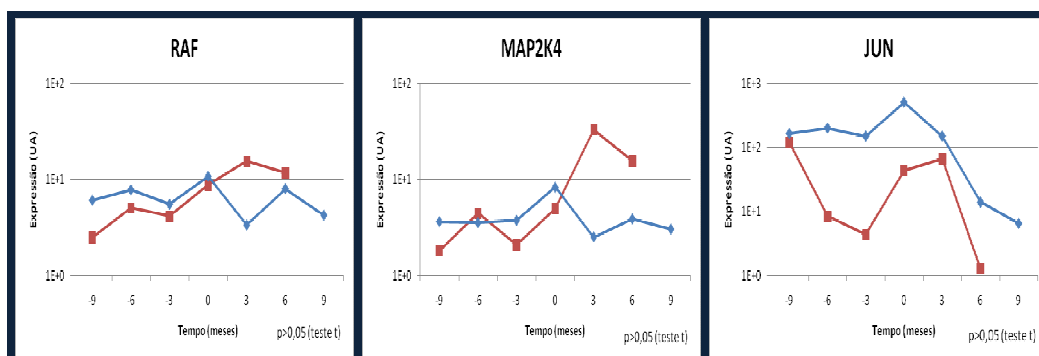


Figura 37 – Expressão dos genes RAF, MAP2K4 e JUN para doentes 2, 5 e 7 vs restantes doentes. Teste estatístico aplicado: teste t para amostras emparelhadas.

Legenda:

The legend for Figure 37 is a horizontal bar containing two entries: 'doentes 2, 5 e 7' represented by a red line with square markers, and 'restantes doentes' represented by a blue line with diamond markers.

A via de sinalização das MAP cinases sofre uma alteração consequente à presença da proteína de fusão bcr-abl. A expressão dos genes *RAF* e *MAP2K4* é contrária nos doentes 2, 5 e 7 comparativamente aos restantes. Neste subgrupo de casos a expressão destes dois genes aumentou após o tempo zero. No que diz respeito ao gene *JUN*, a sua expressão diminuiu cerca de 2 log após o início do tratamento.

Esta cascata de sinalização está activada em células com a proteína de fusão e esta activação leva ao aumento de expressão de alguns genes tais como o *JUN* (Deninger *et al*, 2000). Por outro lado, o Imatinib, por si só, aumenta a actividade de *MAPK* (Chu *et al*, 2004), sendo o que se verificou nos doentes 2, 5 e 7. No entanto, se se inibir a expressão das *MAPK*, reduz-se a proliferação das células progenitoras de LMC, e consequentemente a expressão de *JUN* (Chu *et al*, 2004), tendo sido o verificado no conjunto de doentes estudados.

▪ **Gene *FYN***

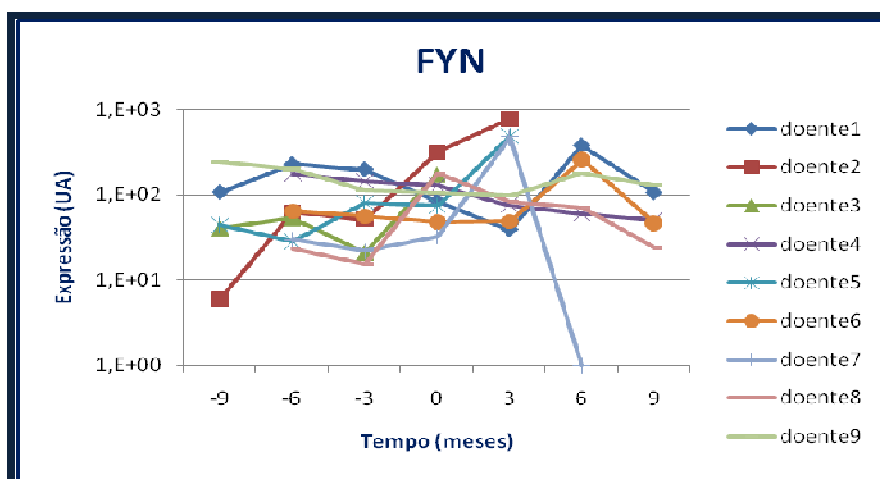


Figura 38 – Expressão do gene FYN.

A expressão deste gene aumentou com a introdução do Imatinib nos doentes 2, 5 e 7, contrariamente aos restantes. Este gene é estimulado pela proteína de fusão e a sua expressão aumenta durante a evolução da doença para uma crise blástica (Ban *et al*, 2008).

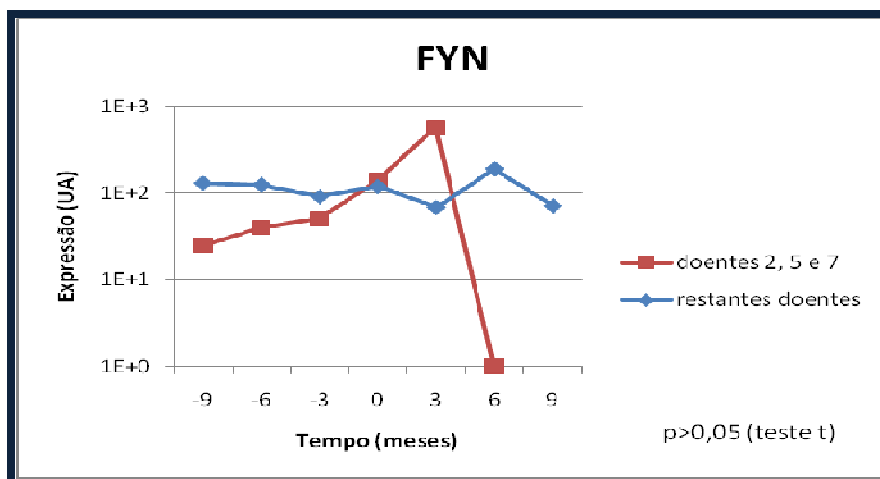


Figura 39 – Expressão do gene FYN para os doentes 2, 5 e 7 vs restantes doentes.

Análise estatística efectuada com a aplicação do teste t para amostras emparelhadas.

Os doentes analisados encontravam-se em fase crónica e, a partir do início do tratamento com o inibidor de tirosina cinase, alcançaram uma redução nos níveis de transcritos de BCR-ABL, o que se torna os resultados obtidos opostos ao já verificado por alguns autores para a expressão deste gene.

▪ **Gene MDR1**

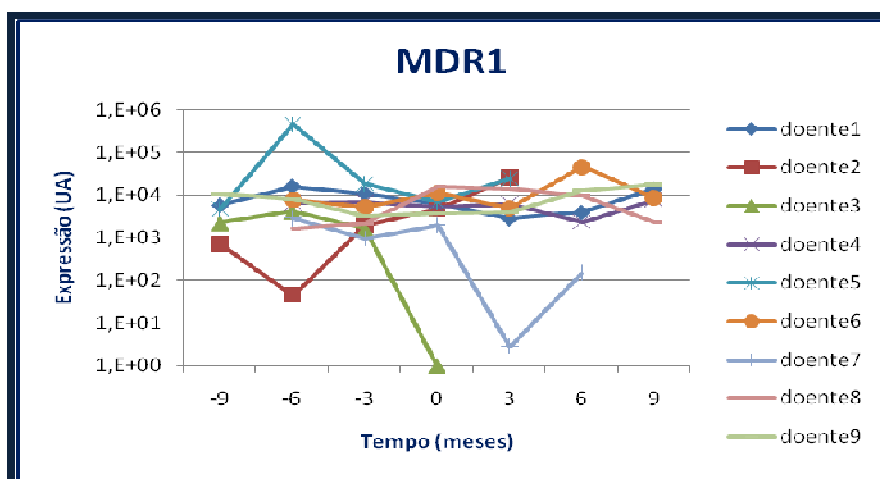


Figura 40 – Expressão do gene MDR1.

O doente 7 mostra adicionalmente uma diminuição na expressão deste gene após a introdução do Imatinib. Esta redução é acompanhada pela redução da expressão relativa dos transcritos de BCR-ABL.

O gene *MDR1* codifica glicoproteínas capazes de bombear drogas para fora da célula, conferindo a estas células uma multiresistência (Galimberti et al, 2005). A redução da expressão deste gene verificada no doente 7 tem como consequência uma diminuição na resistência ao fármaco introduzido, deixando-o actuar nas células com LMC.

▪ **Gene FAK**

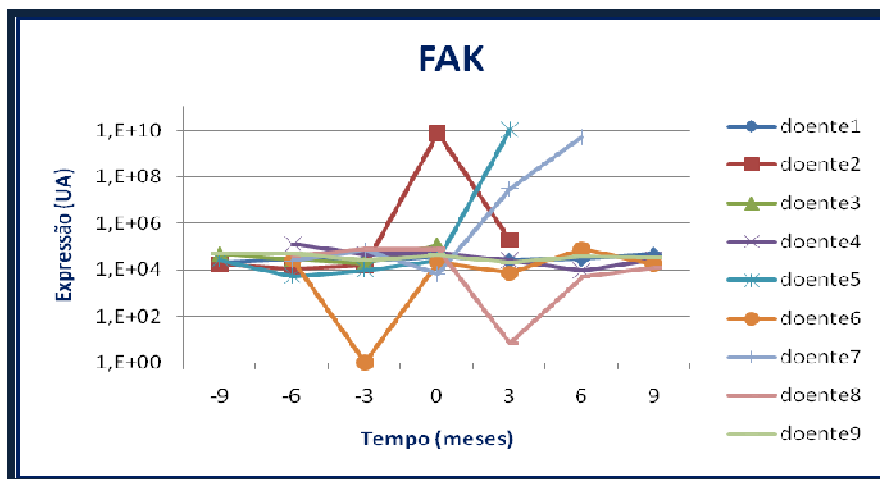


Figura 41 – Expressão do gene FAK.

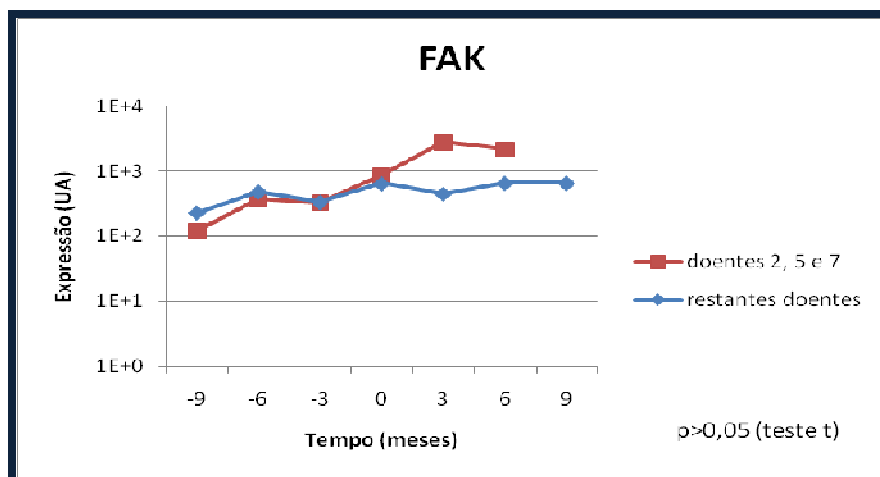


Figura 42 – Expressão de FAK para os doentes 2, 5 e 7 vs restantes doentes. Estatisticamente as diferenças entre os dois grupos foram analisadas com a aplicação do teste t para amostras emparelhadas.

Uma das vias de sinalização afectadas pela presença da proteína de fusão é a responsável pela adesão celular, estando esta diminuída em células com bcr-abl (Deninger *et al*, 2000). Um gene pertencente a esta via é o *FAK*, cuja expressão aumentou com o Imatinib nos doentes 5 e 7. Este resultado tem como consequência um aumento na adesão das células, sendo este um passo importante no combate à LMC.

▪ **Via *PI3K/AKT***

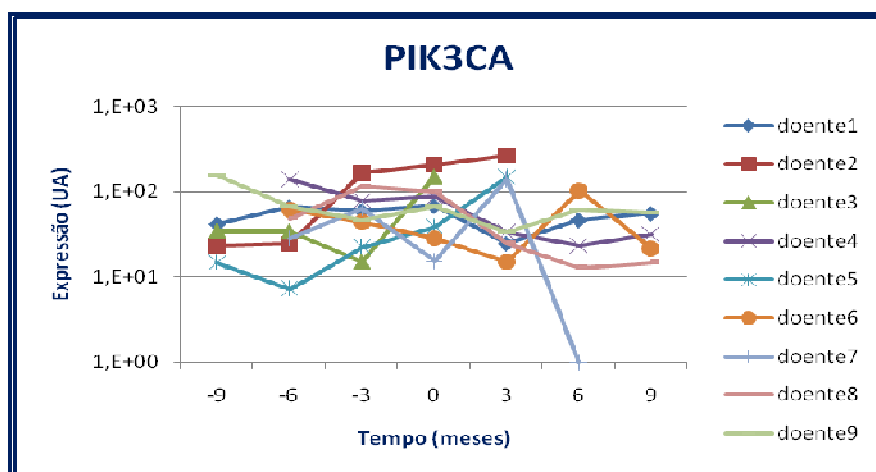


Figura 43 – Expressão do gene PIK3CA.

A expressão do gene *PIK3CA* sofreu um aumento nos doentes 2, 5 e 7 com o Imatinib. A via *PI3K/AKT*, a qual comporta este gene, está relacionada com a apoptose e é afectada pela proteína de fusão. Uma activação desta via conduz a uma diminuição da apoptose (Sugimoto *et al*, 2008).

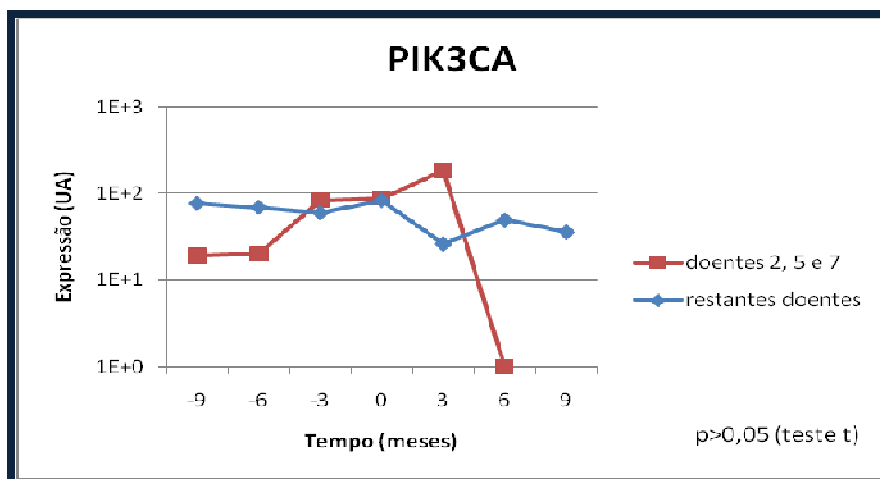


Figura 44 – Expressão do gene *PIK3CA* para os doentes 2, 5 e 7 vs restantes doentes.

Aplicação de teste t para amostras emparelhadas.

Relativamente a este gene, os resultados obtidos são contraditórios aos anteriormente publicados, ou seja, para os doentes 2, 5 e 7, a introdução do Imatinib aumentou a sua expressão, significando uma redução na apoptose, mecanismo que quando inibido pode conduzir a uma resistência ao tratamento, no entanto estes doentes apresentam uma nítida redução na quantificação de transcritos de BCR-ABL.

▪ **Gene STARD1**

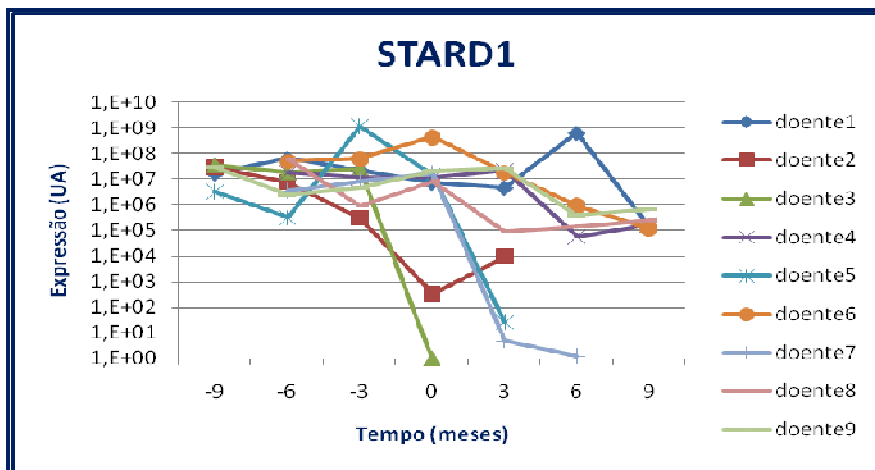


Figura 45 – Expressão do gene STARD1.

Este gene está envolvido em processos hematopoiéticos da célula e alguns autores mostraram que a sua expressão diminuída com o Imatinib (Schmidt *et al*, 2008). A diminuição da expressão deste gene acompanha a redução da expressão relativa de BCR-ABL nos doentes 5 e 7.

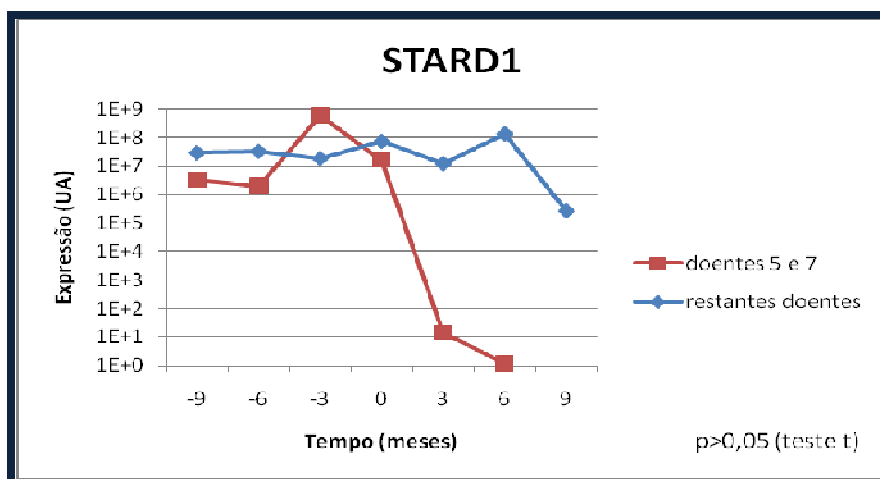


Figura 46 – Expressão do gene STARD1 para os doente 5 e 7 vs restantes doentes. Estudo estatístico com um teste t para amostras emparelhadas.

▪ Gene *HOXA10*

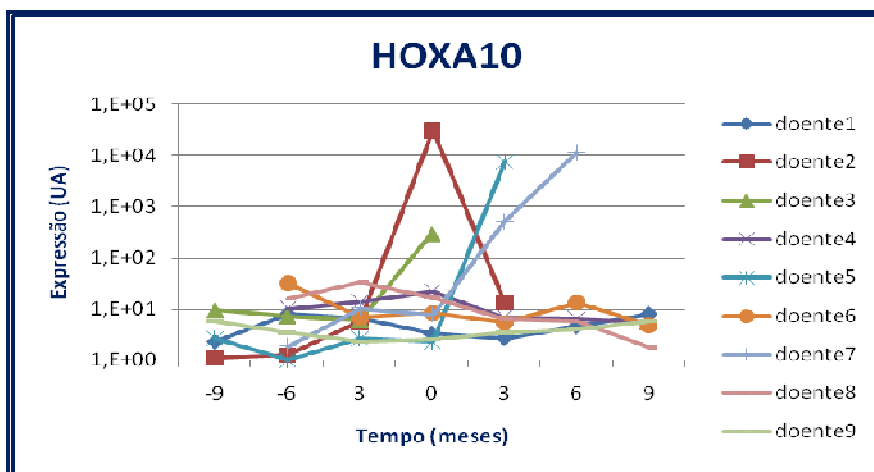


Figura 47 – Expressão do gene *HOXA10*.

A expressão do gene *HOXA10* está inibida em células com LMC e os inibidores de tirosina cinase aumentam a sua expressão (Sugimoto et al, 2008), tal como se verifica nos doentes 5 e 7. Este gene está indirectamente envolvido em mecanismos celulares como a apoptose e a proliferação celular. O aumento da expressão deste gene conduz a uma inibição da proliferação celular e por outro lado ao aumento da apoptose, estando este último controlado pela via *PI3K/AKT*.

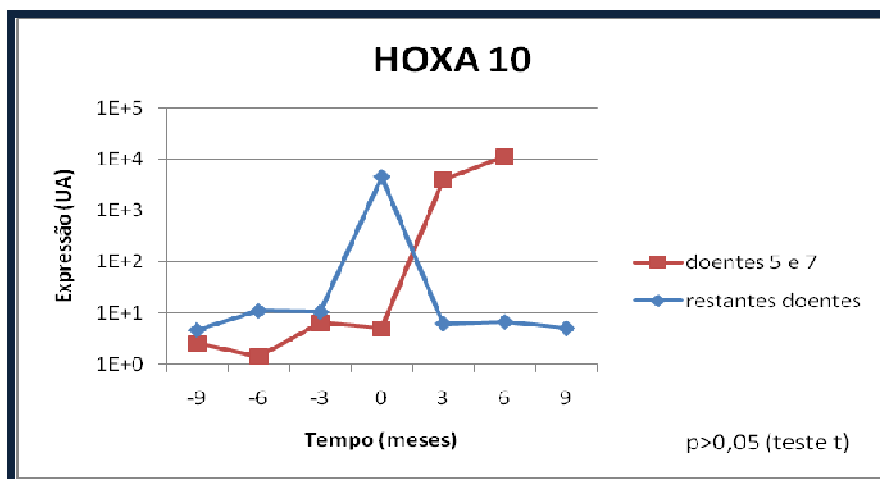


Figura 48 – Expressão do gene HOXA10 para os doentes 5 e 7 vs restantes doentes.

Análise estatística com a aplicação do teste t para amostras emparelhadas.

No conjunto de doentes analisados, os restantes genes apresentaram uma expressão estável no intervalo de tempo em questão, ou seja, não se verificaram alterações com o início do tratamento.

Os doentes estudados encontravam-se todos na fase crónica da doença e, geralmente, a expressão dos genes envolvidos nesta patologia sofre maiores alterações quando há uma evolução da doença para uma fase acelerada, em que a percentagem de gene de fusão presente é superior e as principais vias de sinalização estão desequilibradas.

Talvez por esse mesmo motivo, ou seja, porque os doentes estão numa fase da doença relativamente estável, a expressão de alguns genes é um pouco contraditória com estudos efectuados em doentes em todas as fases da doença, podendo assim, devido à instabilidade genética e de mecanismos celulares, ocorrer alterações muito evidentes e mais concordantes em relação a variações na expressão dos genes analisados neste estudo.

A tabela seguinte apresenta uma síntese dos resultados obtidos relativamente à expressão dos genes estudados e a sua função na célula.

Tabela III – Variação na expressão dos genes com o Imatinib

Gene	Função	Expressão com Imatinib
HOXA 9	FACTOR DE TRANSCRIÇÃO	-
HOXA 10	FACTOR DE TRANSCRIÇÃO	↑
SMAD1	TRANSDUÇÃO DE SINAL	-
PI3KCA	CINASE FOSFOTIDILINOSITOL 3	↑
PI3KCB	CINASE FOSFOTIDILINOSITOL 3	-
CRKL	MOLÉCULA ADAPTADORA	-
AKT	CINASE SERINA/TREONINA	-
BAD2	MOLÉCULA PRO-APOPTÓTICA	-
STAT 1	TRANSDUÇÃO DE SINAL E ACTIVAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO	-
STAT 5A	TRANSDUÇÃO DE SINAL E ACTIVAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO	-
STAT 5B	TRANSDUÇÃO DE SINAL E ACTIVAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO	-
STAT 6	TRANSDUÇÃO DE SINAL E ACTIVAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO	-
JAK 2	JANUS CINASE 2	-
GRB2	MOLÉCULA ADAPTADORA	-
SOS	FACTOR DE TROCA DE GTP	-
RAF	CINASE SERINA/TREONINA	↑
MAP2K1	PROTEÍNA CINASE ACTIVADA POR MITOGÉNIO	-
MAPK3	PROTEÍNA CINASE ACTIVADA POR MITOGÉNIO	-
MAP3K1	PROTEÍNA CINASE ACTIVADA POR MITOGÉNIO	-
MAP2K4	PROTEÍNA CINASE ACTIVADA POR MITOGÉNIO	↑
MAPK8	PROTEÍNA CINASE ACTIVADA POR MITOGÉNIO	-
FOS	FACTOR DE TRANSCRIÇÃO	-
JUN B	COMPONENTE DA AP-1	-
JUN	FACTOR DE TRANSCRIÇÃO	↑
MYC	FACTOR DE TRANSCRIÇÃO	-
MDR1	RESISTÊNCIA MULTIDROGA	↑
CD7	ANTIGÉNIO CD7	-
ELA2	ELASTASE 2	↓
PR3	PROTEINASE 3	↓
FYN	TIROSINA CINASE NÃO-RECEPTORA	↑
STARD 1	REGULADOR AGUDO DE ESTEROIDOGÉNICO D1	↑

FAK	CINASE DE ADESÃO FOCAL	↑
MBP	PROTEÍNA BÁSICA DA MIELINA	-
CTRL	PROTEASE SEMELHANTE A QUIMIOTRIPSINA	-
MKNK2	CINASE DE INTEGRAÇÃO DE SINAL MAPK	-
AZU 1	AZUROCIDINA 1	↓
ABCC3	RESISTÊNCIA MULTIDROGA	-
CLK3	PROTEÍNA CINASE	-
HRAS	PROTEÍNA ACTIVA COM GTP	-

Os resultados apresentados nesta tabela são os mesmos que apresentados nos gráficos, assim sendo, as variações apresentadas têm em conta as variações de expressão dos genes com a introdução do Imatinib.

No que diz respeito a um dos objectivos deste estudo, encontrar um potencial biomarcador indicativo da resposta do doente ao tratamento, os genes que mostraram alterações nos casos 2, 5 e 7 (*MDR1*, *HOXA10*, *FYN*, *MAP2K4*, *RAF*, *FAK* e *STARD1*) vão de encontro a esse objectivo.

Quando se verificar um aumento na expressão dos genes *HOXA10*, *FYN*, *MAP2K4*, *PIK3CA*, *RAF* e *FAK*, pode considerar-se que os doentes irão responder ao Imatinib, mesmo que temporariamente.

Os restantes genes alterados podem não determinar previamente a resposta ao fármaco de uma forma tão linear.

7. Conclusão

A título de conclusão, no conjunto de doentes analisados verificou-se uma relação inversamente proporcional entre os genes *FYN*, *MAP2K4*, *PIK3CA*, *RAF* e *FAK* e a percentagem de gene de fusão, ou seja, um aumento da expressão destes genes é acompanhado por uma diminuição na quantificação relativa de BCR-ABL.

Futuramente seria importante avaliar a percentagem de transcritos de BCR-ABL neste grupo de doentes, de forma a avaliar a evolução da doença e o tipo de resposta ao tratamento.

Adicionalmente, seria interessante determinar a expressão dos genes, principalmente os que apresentaram alterações significativas, neste mesmo grupo de doentes, a fim de verificar a evolução da sua expressão ao longo do progresso da doença e averiguar o período de tempo em que as células respondem ao inibidor de tirosina cinase ou o eventual desencadear de resistência ao fármaco.

Seria ainda muito interessante fazer a determinação da expressão do grupo de genes estudados em doentes que transitam da fase crónica para a fase acelerada e para a crise blástica, de forma a constatar as alterações e eventualmente encontrar biomarcadores sugestivos dessa transformação nas células.

Dado que os estudos foram efectuados em células com e sem a proteína de fusão, poderia futuramente proceder-se a uma selecção prévia de células com a proteína de fusão, para que os estudos de expressão relativa fossem mais precisos.

8. Bibliografia

- (1) Ban, K.; Gao, Y.; Amin, H.; Howard, A., Miller, C.; Lin Q., Leng, X., Munsell, M.; Bar-Eli, M.; Arlinghaus, R., Chandra, J. (2008). BCR-ABL 1 mediates upregulation of Fyn in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 111(5): 2904-2908.
- (2) Blank, U.; Karlsson G.; Karlsson, S. (2008). Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* 111(2): 492-495.
- (3) Branford, S.; Rudki, Z.; Walsh, S.; Parkinson, I.; Grigg, A., Szer, J.; Taylor, K.; Herrmann, R.; Seymour, J.; Arthur, C.; Joske, D.; Lynch, K.; Hughes, T. (2003). Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 102 (1): 276-284.
- (4) Branford, S.; Rudzki, Z.; Parkinson, I.; Grigg, A.; Taylor, K.; Seymour, J.; Durrant, S.; Browett, P.; Schwarzer, A.; Arthur, C.; Catalano, J.; Leahy, M.; Filshie, R.; Bradstock, K.; Herrmann, R.; Joske, D.; lynch, K.; Hughes, T. (2004). Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood* 104 (9): 2926-2932.
- (5) Budnoff, N.; Peschel, C.; Duyster, J. (2003). Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia* 17: 829-838.

- (6) Buettner, R.; Mora, L.; Jove, R. (2002). Activated Stat signaling in human tumors provides novel molecular target for therapeutic intervention. *Clinical Cancer Research* 8: 945-954.
- (7) Bustin, S. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reactions assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193.
- (8) Bustin, S and Mueller, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potencial use in clinical diagnosis. *Clin Sci* 109: 365-379.
- (9) Bustin, S.; Benes, V.; Garson, J.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.; Shipley, G.; Vandesompele, J.; Wittwer, T. (2009); The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55:4, 611-622
- (10) Cang, S. and Liu, D. (2008). P-loop mutations and novel therapeutic approaches for imatinib failures in chronic myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* 1(15): 1-9.
- (11) Chronic Myelogenous Leukemia; Leukemia & Lymphoma Society
- (12) Chu, S.; Holtz, M., Grupta, M.; Bhatia, R. (2004). BCR-ABL kinase inhibition by imatinib mesylate enhances MAP kinases activity in chronic myelogenous leukemia CD34+ cells. *Blood* 103: 3167-3174.
- (13) Cortes, J.; Rousselot, P.; Kim, D.; Ritchie, E.; Hamerschlak, N.; Coutre, S.; Hochhaus, A.; Guilhot, F.; Saglio, G.; Apperley, J.; Ottmann, O.; Shah, N.; Erben, P.; Branford, S.; Agarwal, P.; Gollerkeri, A.; Baccarani, M. (2007). Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients

- with imatinib-resistant or –intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. Blood 109 (8): 3207-3214.
- ⁽¹⁴⁾ Deninger, M.; Goldman, J.; Melo, J. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 96 (10): 3343-3356.
- ⁽¹⁵⁾ Deininger, M.; Buchdunger, E.; Druker, B. (2005). The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood 105 (7): 2640-2653.
- ⁽¹⁶⁾ Dongen, J.; Macintyre, E.; Gabert, J.; Delabesse E.; Rossi, V.; Saglio, G.; Gottardi, E.; Rambaldi, A.; Parreira, A.; Gameiro, P.; Diaz, M.; Malec, M.; Langerak, A.; San Miguel, J.; Biondi, A. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia 13: 1901-1928.
- ⁽¹⁷⁾ Etten, R. (2007). Oncogenic signaling new insights and controversies from chronic myeloid leukemia. Journal of Experimental Medicine 204 (3): 461-465.
- ⁽¹⁸⁾ Fausel, C. (2007). Targeted Chronic Myeloid Leukemia Therapy: Seeking a Cure. Supplement to Journal of Managed Care Pharmacy 13 (8):8-12.
- ⁽¹⁹⁾ Galimberti, S.; Cervetti, G., Guerrini, F.; Testi, R.; Pacini, S.; Fazzi, R.; Simi, P.; Petrini, M. (2005). Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with chronic myeloid leukemia during Imatinib treatment. Cancer Genetics and Cytogenetics 162: 57-62.
- ⁽²⁰⁾ Goldsby, R.; Kindt, T.; Osborne, B.; Kuby, J. 2004. Immunology. 5th Edition. Freeman.

- (21) Gómez-Casares, M.; Vaqué, J., Lemes, A.; Molero, T.; Delgado, M.; Leon, J. (2004). C-myc expression in cell lines derived from chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 89: 241-243.
- (22) Hoffbrand, A.; Lewis, S.; Tuddenham, E. (1999). *Postgraduate Haematology; Fourth Edition*. Burtterworth Heineman.
- (23) Hoover, R.; Gerlach, M.; Koh, E.; Daley, G. (2001). Cooperative and redundant effects os Stat 5 and Ras signaling in BCR-ABL transformed hematopoietic cells. *Oncogene* 20: 5826-5835.
- (24) Hughes, T.; Deiniger, M.; Hochhaus, A.; Branford, S.; Radich, J.; Kaeda, J.; Baccarani, M.; Cortes, J.; Cross, N.; Druker, B.; Gabert, J.; Grimwade, D.; Hehlmann, R.; Kamel-Reid, S.; Lipton, Longtine, J.; Martinelli, G; Saglio, G.; Soverini, S.; Stock, W.; Goldman, J. (2006). Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 108 (1):28-37.
- (25) Inazawa, J.; Inoue, J.; Imoto, I. (2004). Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the wayfor identification of novel cancer-related gene. *Cancer Sci* 95(7): 559-563.
- (26) Jorgensen, H.G and Holyoake, T.L. (2007). Characterization of cancer stem cells in Chronic Myeloid Leukaemia. *Biochemical Society Transactions* 35 (5): 1347-1351.

- (27) Joske, D. (2008). Chronic myeloid leukaemia: the evolution of gene-targeted therapy. *MJA* 189 (5): 277-282.
- (28) Kasper, D., Fauci, A.; Longo, D.; Braunwald, E.; Hauser, S.; Jameson, J. (2005). *Harrison's – Principles of Internal Medicine*. 16th edition. McGraw Hill.
- (29) Larsson, J. and Karlsson, S. (2005). The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 24: 5676-5692.
- (30) Lin, T., Mahajan, S.; Frank, D. (2000). Stat signaling in the pathogenesis in treatment of leukemias. *Oncogene* 19: 2496-2504.
- (31) Lodish, H., Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.; Krieger, M.; Scott, M.; Zipursky, L.; Darnell, J. 2003. *Molecular Cell Biology*. 5th Edition. Freeman.
- (32) Mark, H.; Sokolic, R.; Mark, Y. (2006). Conventional Cytogenetics and FISH in the detection of BCR/ABL fusion in chronic myeloid leukemia (CML). *Experimental and Molecular Pathology* 81: 1-7.
- (33) Nguyen, T.; Rahmani, M.; Harada, H., Dent, P.; Grant, S. (2007). MEK1/2 inhibitors sensitive Bcr/Abl⁺ human leukemia cells to the dual Abl/Scr inhibitors BMS-354825. *Blood* 109(9): 4006-4015.
- (34) O'Dwyer, M.; Mauro, M.; Blasdel, C.; Farnsworth, M., Kurilik, G.; Hsieh, Y., Druker, B. (2004). Clonal evolution and lack of cytogenetic response and adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with imatinib mesylate. *Blood* 103 (2):451-456.
- (35) Practice Guidelines in Oncology v.1.2009

- ⁽³⁶⁾ Quintás-Cardama, A. and Cortes, J. (2006). Chronic Myeloid Leukaemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceeding* 81 (7): 937-988.
- ⁽³⁷⁾ Radich, Jerald P; Gooley, T. (2003). HLA-matched related hematopoietic cell transplantation for chronic-phase CML using a targeted busulfan and cyclophosphamide preparative regimen. *Blood* 102(2): 31-35.
- ⁽³⁸⁾ Ren, Ruibao. (2005). Mechanisms of BCR-ABL in the Pathogenesis of Chronic Myelogenous Leukaemia. *Nature* 5: 172-183.
- ⁽³⁹⁾ Shah, N.; Skaggs, B.; Branford, S.; Hughes, T.; Nicoll, J.; Paquette, R.; Sawyers, C. (2007). Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. *The Journal of Clinical Investigation* 117(9): 2562-2569.
- ⁽⁴⁰⁾ Scheijen, B. and Griffin, J. (2002). Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* 21: 3314-3333.
- ⁽⁴¹⁾ Schmidt, S.; Gastl, G.; Wolf, D. (2008). Possible role for gene expression profiling in predicting responses to conventional or targeted drugs in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 49 (4): 643-647.
- ⁽⁴²⁾ Shet, A.; Jahagirdar, B.; Verfaillie, C. (2002). Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* 16: 1402-1411.
- ⁽⁴³⁾ Speck, A.; Gilliland, D. (2002). Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nature Reviews* 2: 502-513.
- ⁽⁴⁴⁾ Sugimoto, Y.; Nakamura, S.; Okinaka, K.; Hirano, I.; Ono, T.; Shigeno, K.; Shinjo, K.; Ohnishi, K. (2008). HOXA 10 expression induced by Abl kinase

- inhibitors enhanced apoptosis through PI3K pathway in CML cells. *Leukemia Research* 32: 962-971.
- (45) Tedeschi, F. and Zalazan, F. (2006). HOXA 9 gene expression in the chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia Research* 30: 1453-1456.
- (46) Weisberg, E.; Manley, P.; Cowan-Jacob, S.; Hochhaus, A.; Griffin, J. (2007). Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nature Reviews* 7: 345-356.
- (47) Wilhelm, J and Pingoud, A. (2003). Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Chem Bio Chem* 4: 1120-1128.
- (48) www.genecards.com
- (49) www.geneglobe.com
- (50) Yang, M.; Liu, T.; Chang, J.; Lin, P.; Lin, S. (2003). Jun B gene expression is inactivated by methylation in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* 101(8): 3205-3211.
- (51) Yong, A.; Szydlo, R., Goldman, J.; Apperley, J.; Melo, J. (2006). Molecular profiling of CD34+ cells identify low expression of CD7 along with high expression of proteinase 3 or elastase, as predictors of longer survival in patients with CML. *Blood* 107: 205-212.