CAROLINA YAEKO NAMASU

Estudo da Expressão do Gene ABR em Leucemia Mielóide Crônica (LMC) Utilizando *Real-Time* RT-PCR (qPCR)

CAMPINAS

2006

i

CAROLINA YAEKO NAMASU

Estudo da Expressão do Gene ABR em Leucemia Mielóide Crônica (LMC) Utilizando *Real-Time* RT-PCR (qPCR)

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO LOPES ALBERTO CO-ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

CAMPINAS

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

N15e	 Namasu, Carolina Yaeko Estudo da expressão do gene ABR em leucemia mielóide crônica (LMC) utilizando <i>Real-Time</i> RT-PCR (qPCR). / Carolina Yaeko Namasu. Campinas, SP : [s.n.], 2006.
	Orientadores : Fernando Lopes Alberto; Fernando Ferreira Costa Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	1. Leucemia mielóide crônica. 2. Expressão Gênica. 3. Biologia molecular. I. Alberto, Fernando Lopes. II. Costa, Fernando Ferreira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em ingles: Expression of active BCR related (ABR) gene in chroni myeloid leukemia (CML) Real-Time RT-PCR (qPCR)

Keywords:

- Leukemia, Myeloid chronic
- Gene expression
- Molecular biology

Área de Concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas

Banca examinadora: Prof^o.Dr^o. Fernando Lopes Alberto; Prof^a.Dr^a. Carmen Silva Passos Lima; Prof^a Dr^a Maria Inês de Moura Campos Pardini. **Data da defesa: 17 - 07 - 2006**

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lopes Alberto

Membros:

1. Fernando Lopes Alberto

2 Carmen Silva Passos Lima

3. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/07/2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mario e Selma, em gratidão ao respeito, confiança e apoio dedicados à realização deste trabalho.

Ao Milton, meu grande companheiro, pelo carinho e paciência que tornaram estes dois anos mais fáceis.

A todos que possam, de alguma forma, beneficiar-se dos resultados deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Lopes Alberto e ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela receptividade, orientação, confiança e estímulo nas atividades desenvolvidas neste trabalho.

À Dra. Dulcinéia Martins de Albuquerque, à Adriana da Silva Santos Duarte e ao Dr. Tiago Gomes de Andrade, pelo suporte técnico.

Aos colegas do Laboratório de Terapia Gênica, Biologia Molecular e Genoma, do Hemocentro da UNICAMP, pelo companheirismo e colaboração.

A todos que contribuíram com fornecimento de material para nossa pesquisa (amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes portadores de LMC): Dra. Katia Borgia Barbosa Pagnano, Dra. Irene Lorand-Metze, Mônica de Almeida Falconi e colaboradores do Hemocentro da UNICAMP; Dr. José Salvador Oliveira, Dra. Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille, Andréia R. Do Val e colaboradores da UNIFESP.

Às Doutoras Paula F. Asprino e Cinthia B. Moyses, pela colaboração nesta pesquisa. Ao Roberto Zulli, pela estatística.

Aos portadores de leucemia mielóide crônica, que foram a motivação desta pesquisa.

Ao Milton, pelo amor, carinho, apoio e paciência.

À Dra. Daniella Pereira Crosara Alberto, pela compreensão.

E, especialmente, aos meus pais, pelo apoio e carinho e porque, sem os quais, nada disto seria possível.

"Uma mente que se abre a uma nova idéia nunca retorna ao seu tamanho original."

(Albert Einstein)

PÁG.

RESUMO	xvii
ABSTRACT	xx
1- INTRODUÇÃO	23
1.1- Leucemia Mielóide Crônica (LMC)	24
1.1.1- Patogenia Molecular da LMC	24
1.1.2- Características clínicas, laboratoriais e morfológicas	24
1.1.3- Estrutura e mecanismo de ação do mesilato de imatinibe	26
1.1.4- Resultados do tratamento da LMC com mesilato de imatinibe	28
1.1.5- Resistência ao tratamento com mesilato de imatinibe	29
1.1.6- Mecanismos de resistência ao mesilato de imatinibe	29
1.1.7- Novas terapias para tratamento de LMC refratária ao mesilato de	30
	30
1.1.8- O gene ABR	32
2- OBJETIVOS	34
3- MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1- Pacientes e Amostras biológicas	37
3.2- Extração do RNA Total	37
3.3- Avaliação de qualidade do RNA isolado	39
3.4- Transcrição reversa para real- time RT-PCR (qPCR)	39
3.5- Real- time RT-PCR (qPCR)	41

3.6- Clonagem	44
3.6.1- Reações de Purificação e Ligação	44
3.6.2- Reação de Transformação	45
3.6.3- Seqüenciamento automatizado	46
3.6.4- Padronização da concentração de iniciadores	48
3.6.5- Eficiência e linearidade da reação de qPCR	50
3.6.6- Sensibilidade da reação de qPCR	53
3.7- Validação experimental	58
3.7.1- Medida da estabilidade gênica (M) e ranking dos genes controle	58
3.7.2- Variação par-a-par (Vn/n+1) entre dois fatores de normalização	
seqüenciais (NFn e NFn+1)	61
3.8- Análise estatística	62
4- RESULTADOS	63
4.1- Amostras de Pacientes com LMC versus Doadores de Medula Óssea.	64
4.2- Pacientes com LMC pós-transplante de medula óssea (TMO)	65
5- DISCUSSÃO	67
6- CONCLUSÕES	71
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8- ANEXOS	82
Anexo 1- Termo de Consentimento Livre Esclarecido	83

ABL	Abelson
ABR	Active BCR-Related
ACTB	beta-actina
AE	aumento de expressão
ARA-c	citosina arabinosídeo (agente anti-neoplásico que inibe a síntese de DNA)
ATP	adenosina trifosfato
BCR	breakpoint cluster region
BCR-ABL	rearranjo gênico formado pela translocação recíproca entre as seqüências dos genes BCR e ABL, produzindo proteína quimérica de mesmo nome.
blast	Blast Local Alignment Seach Tool
СВ	crise blástica
СО	concentração inicial
cKIT	tyrosine kinase receptor (receptor do fator de célula tronco)
cDNA	DNA, cadeia ou fita complementar
СТ	<i>threshold cycle</i> ("ciclo de limiar", é o ponto da reação de qPCR em que a fluorescência é detectada acima do ruído de fundo)
Ctl	controle
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
DO	densidade óptica
DRM	doença residual mínima
E	eficiência da reação de qPCR

FA	fase acelerada
FC	fase crônica
GAPD	gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase
GM	média geométrica
GTP	guanosina trifosfato
GTPase	guanosina trifosfatase
HLA	human leukocyte antigen (antígeno leucocitário humano)
IFN	Interferon
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	kilodalton
Laser	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i> (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação)
LB	Luria-Bertani (meio de cultivo)
LMC	leucemia mielóide crônica
М	molar
М	medida de estabilidade de gene controle
μg	micrograma
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NF	fator de normalização
nM	nanomolar
ORESTES	Open Reading Frame Expressed Sequence Tags
pb	par de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor (receptor do fator de crescimento
	derivado de plaquetas)
Ph	Philadelphia (cromossomo anormal em LMC)
qPCR	RT-PCR quantitativo em tempo real
Q	quantidade de amostra relativa à amostra com maior expressão
Rho	família de proteínas ligantes de GTP
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
rRNA	RNA ribossomal
RT	transcrição reversa
Tm	melting temperature (temperatura de dissociação de segmento de DNA)
V	variação par-a-par
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-tiogalactopiranosídeo

PÁG.

Tabela 1-	Sequências nucleotídicas dos iniciadores utilizados no método de	
	seqüenciamento e comprimento do segmento amplificado pelo par	
	de iniciadores específico em pares de bases (pb)	47
Tabela 2-	Seqüências nucleotídicas dos segmentos de DNA utilizados no	
	método de seqüenciamento e comprimento do segmento	
	amplificado pelo par de iniciadores específico em pares de bases	
	(pb)	47
Tabela 3-	Seqüências nucleotídicas dos iniciadores a utilizados no método de	
	qPCR e comprimento do segmento amplificado pelo par de	
	iniciadores específico	48
Tabela 4-	Matriz de concentrações de iniciadores para escolha da proporção	
	ótima das concentrações de iniciadores senso (S) e anti-senso (A).	
	S / A, concentração dos iniciadores senso / anti-senso (nM); CT,	
	threshold cycle; StdDevCT, desvio padrão de CT	49
Tabela 5-	Determinação do logaritmo da concentração inicial (CO) de cDNA	
	utilizado para geração da curva padrão de eficiência da reação de	
	qPCR	50
Tabela 6-	Valores brutos dos CTs e do número de moléculas correspondente	
	à diluição do produto de PCR convencional purificado dos	
	segmentos dos genes utilizados no método de qPCR	57

PÁG.

Figura 1-	Mecanismo de ação da proteína quimérica BCR-ABL e sua	
	inibição por meio do mesilato de imatinibe. O painel A mostra a	
	oncoproteína BCR-ABL com uma molécula de ATP ligada à	
	proteína quinase. A proteína substrato é ativada pela fosforilação	
	de um de seus resíduos de tirosina, o que resulta na ativação de	
	moléculas efetoras e, conseqüentemente, no processo de	
	proliferação neoplásica em LMC. Quando o imatinibe ocupa o	
	sítio de ligação do ATP da proteína quinase (painel B), a ação da	
	BCR-ABL é inibida, impedindo a fosforilação da proteína	
	substrato. Adaptado de Goldman e Melo (2001) por Savage et al	
	(2002)	27
Figura 2-	Avaliação de integridade do RNA. Eletroforese em tampão	
	formamida em gel de agarose e corada por brometo de etídio de	
	amostras de RNA total isoladas para o estudo	39
Figura 3-	Avaliação de integridade de cDNA por meio de segmento do	
	gene ACTB amplificado. Eletroforese em tampão TAE em gel	
	de agarose e corada por brometo de etídio de amostra de cDNA	
	amplificado e isolado para estudo (A) e controle positivo (cDNA	
	de K562) (C). M, marcador de peso molecular	40

- Figura 4-Monitoramento em tempo real das curvas de amplificação proporciona estabelecimento de nível de fluorescência na fase ótima (aumento exponencial da fluorescência) da reação de amplificação. O nível de fluorescência computado para cada amostra é aquele suficiente para atingir um limiar (traço horizontal azul) de detecção igual para cada conjunto de iniciadores/amostras testado e por convenção denominado de CT. A figura mostra cinco conjuntos de iniciadores e uma única amostra. Para cada conjunto de iniciadores os experimentos foram realizados em duplicadas (visível na figura através da diferença de cores entre as curvas de amplificação, embora com coeficiente de variação reduzido). A fluorescência emitida antes do nível do CT para cada curva é considerada ruído de fundo algumas curvas (background). Nota-se que, para de amplificação, o valor do CT para o threshold que foi definido não é um número inteiro.....
- Figura 5- Curva de dissociação dos iniciadores utilizados no método de qPCR. Ciclo de variação crescente de temperatura, de 60 a 95° C (eixo x) e monitoramento da fluorescência (eixo y).....

43

44

- Figura 7- Curva padrão de eficiência da reação de qPCR para os genes ACTB (C) e GAPD (D). Os valores de CT das curvas de amplificação da PCR foram utilizados para gerar a curva. Eixo x: Logaritmo da concentração inicial de cDNA. Os pontos em vermelho representam as diluições de cDNA em escala logarítmica.....
- Figura 8- Curvas de amplificação do ensaio de sensibilidade da reação de qPCR. Diluição seriada de produtos de PCR purificados dos segmentos dos genes ABR (A) e BCR (B). As curvas de amplificação são geradas pelo equipamento Gene Amp 5700 Sequence Detector System .Eixo x: número de ciclos de qPCR, eixo y: intensidade de luz normalizada. As curvas de amplificação mostradas da esquerda para a direita, correspondem ao número de cópias inicial de 104, 103, 102, 101 e 100, respectivamente, para o ABR, e de 105, 104, 103, 102 e 101, respectivamente, para o BCR.
- Figura 9- Curvas de amplificação do ensaio de sensibilidade da reação de qPCR. Reações com diluição seriada de produtos de PCR purificados dos segmentos purificados dos genes ACTB (C) e GAPD (D). As curvas de amplificação são geradas pelo equipamento Gene Amp 5700 Sequence Detector System .Eixo x: número de ciclos de qPCR, eixo y: intensidade de luz normalizada. As curvas de amplificação mostradas da esquerda para a direita, correspondem ao número de cópias inicial de 105, 104, 103, 102 e 101, respectivamente.....

52

55

56

Figura 10-	Determinação dos genes controle mais estáveis entre os genes	
	BCR, ACTB e GAPD. Os valores de CT de cada amostra para	
	cada gene controle foram transformados em quantidades (Q),	
	colunas BCR, ACTB e GAPD, através da fórmula Q = E	
	(CTmin - CTamostra). Os valores médios de estabilidade gênica	
	(M) de cada gene controle estão representados em negrito, na	
	última linha da figura	59
Figura 11-	Valores médios de estabilidade gênica (M) dos genes controle	
	remanescentes calculados após a exclusão do gene controle	
	menos estável (BCR). Os valores de CT de cada amostra para	
	cada gene controle foram transformados em quantidades (Q),	
	colunas ACTB e GAPD, através da fórmula Q = E (CTmin -	
	CTamostra). Os valores médios de estabilidade gênica (M) de	
	cada gene controle estão representados em negrito, na última	
	linha da figura	60
Figura 12-	Níveis de expressão do gene ABR em cada amostra de pacientes	
	com LMC em fase crônica (FC) ao diagnóstico em relação à	
	amostra calibradora (pool de indivíduos normais) que apresenta	
	valor igual a 1 (p-valor = 0,01563)	65
Figura 13-	Mediana dos níveis de expressão relativos dos genes ABR e	
	BCR-ABL nos diferentes grupos de pacientes de LMC. FC,	
	pacientes em fase crônica ao diagnóstico $(n = 9)$ TMO, amostras	
	de quatro pacientes que receberam transplante alogênico de	
	medula óssea, avaliadas 100 ou 180 dias após o transplante	
	(n = 6)	66



NAMASU, C. Y. Estudo da Expressão do Gene ABR em Leucemia Mielóide Crônica (LMC) Utilizando *Real-Time* RT-PCR (qPCR). Campinas, 2006. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

Leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa crônica resultante de alteração citogenética t(9;22) (q34; q11) que acarreta atividade constitutiva de tirosino-quinase por meio da proteína quimérica BCR-ABL. Esta alteração ocorre nas células precursoras hematopoéticas e pode ser detectada em todas as células descendentes. O mesilato de imatinibe (Glivec®) é um inibidor do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R), proteína quinase do BCR-ABL, administrado com sucesso a pacientes portadores de LMC. Porém, algumas formas de resistência ao tratamento têm sido apontadas, e as mais conhecidas envolvem o surgimento de mutações no domínio com atividade de quinase da proteína BCR-ABL. Entretanto, parece claro que o surgimento mutações adquiridas que acarretem ganho de função não é capaz de explicar todos os casos de resistência e que outros sistemas gênicos podem estar envolvidos neste fenótipo adverso. O gene ABR possui grande homologia com o gene BCR e aparentemente apresenta funções características e outras compartilhadas com esse último. Neste trabalho, avaliamos a expressão do gene ABR em amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes portadores de LMC em fase crônica ao diagnóstico e em pacientes que receberam transplante alogênico de medula óssea, utilizando a técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real (qPCR). ABR apresentou notável aumento de expressão relativa a indivíduos normais (mediana = 5,483) em 8 de 9 pacientes de LMC avaliados em fase crônica ao diagnóstico, de acordo com o teste *Wilcoxon signed rank* (p-valor = 0.01563), o que se correlaciona com resultados anteriores de nosso grupo (Alberto e Costa, 2003). Diminuição nos níveis de expressão do ABR parece correlacionar-se com o status de remissão dos pacientes analisados, conforme avaliado pela expressão do transcrito BCR-ABL por PCR quantitativo em tempo real, o que pode ser confirmado nos pacientes em remissão molecular ao transplante alogênico de medula óssea. Estes dados poderiam sugerir uma possível importância do gene ABR durante a evolução da doença. A expressão do gene ABR foi normalizada com os dois genes controle com melhor desempenho, ACTB e GAPD, utilizando-se o algoritmo geNorm. As eficiências de amplificação das reações de qPCR foram avaliadas e resultaram em valores semelhantes e próximos a 100%.

Sensibilidade analítica da reação de qPCR resultou em uma detecção mínima de 1, 12, 10 e 9 moléculas, respectivamente, para ABR, BCR, ACTB e GAPD. O método mostrou-se útil para medida precisa dos níveis de expressão gênica, e adequada para estudar a relevância de sinais biológicos de pequena intensidade.

ABSTRACT

I

NAMASU, C. Y. Expression of Active BCR Related (ABR) Gene in Chronic Myeloid Leukemia (CML) by Using Real-Time RT-PCR (qPCR). Campinas, 2006. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal proliferative disorder of the hematopoietic stem cell cytogenetically characterized by the Philadelphia (Ph) chromosome, a result of chromosomal translocation t(9;22)(q34;q11). At molecular level, the Ph chromosome results in a fusion gene, the chimerical BCR-ABL which has constitutive tyrosine kinase activity and is detected in virtually all cases at diagnosis. Indeed, the BCR-ABL gene expression has a pivotal role in the known pathogenetic mechanisms in CML cell proliferation and disease progression. Conversely, BCR-ABL inhibition with imatinib mesilate (Glivec®) efficiently produces disease remission, since it is capable of selectively block the protein through occupying its ATP binding site. However, resistance to imatinib mesilate do occur and, although acquired mutations in the tyrosine kinase domain of BCR-ABL have been described, it seems that the appearance of acquired mutations, which result in gain of function, does not suffice for the resistant phenotype. Active BCR Related (ABR) gene is similar to BCR and both have a GTPase-activating protein (GAP) domain. Increased ABR activity has been detected in different solid tumors and more recently we detected over-expression of ABR in CML cDNA (EST) library. The aim of this study was to investigate the expression levels of the ABR gene in peripheral blood and bone marrow samples of CML patients in chronic phase (CP) at diagnosis and in patients who had received bone marrow transplantation (BMT) and achieved remission by using real-time quantitative RT-PCR (qPCR). ABR gene was expressed in higher levels in 8 of 9 samples derived from CP patients evaluated at diagnosis (median fold change = 5.483) when compared to a pool of healthy subjects, according to Wilcoxon signed rank test (p-value = 0.01563), what correlates with our previous results (Alberto & Costa, 2003). These data could suggest a possible regulatory function of ABR gene on disease evolution. In all cases, qPCR efficiency ranged above 98%. ABR gene expression was normalized with the best performing control genes, ACTB and GAPD (geometric mean; geNorm algorithm). Reduction of ABR gene expression was apparently correlated with the remission status of the patients evaluated an observation that was further confirmed in patients in molecular remission after allogeneic bone marrow transplantation. Analytical

sensitivity in GeneAmp 5700 Sequence Detector System was tested by amplification with ABR, BCR, ACTB e GAPD primers and resulted in minimal detection of de 1, 12, 10 e 9 molecules, respectively. The normalization strategy adopted in this work was helpful for accurate qPCR profiling, and is especially suitable for studying the relevance of biological signals of low intensities.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Leucemia Mielóide Crônica (LMC)

Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é a mais comum das doenças mieloproliferativas, responsável por 15 a 20% de todos os casos de leucemia, com incidência mundial de 1-1,5 casos a cada 100.000 pessoas ao ano. A doença origina-se a partir de um precursor hematopoético anormal na medula óssea, resultando em desvio fenotípico nas três linhagens oriundas da célula progenitora hematopoética, as séries eritróide, granulocítica e linfocitária. É caracterizada por granulocitose progressiva, hipercelularidade na medula óssea e esplenomegalia.

1.1.1- Patogenia Molecular da LMC

Cerca de 95% dos casos apresenta alteração citogenética característica definida como cromossomo *Philadelphia* (Ph) t(9;22)(q34;q11). Esta translocação, encontrada nas linhagens mielóide e linfóide do sangue periférico, funde seqüências do gene BCR, no cromossomo 22, com o gene ABL, no cromossomo 9, produzindo proteína anômala (BCR-ABL) com atividade constitutiva de tirosino-quinase, e desempenha papel principal na fisiopatologia de LMC.

Os pacientes com LMC expressam a proteína BCR-ABL de 210 kDa (Melo *et al*, 1994; Ravandi *et al*, 1999), a qual promove os fatores de expressão requeridos para proliferação celular e sobrevivência por meio de três mecanismos principais: ativação constitutiva e aumento da sinalização de mitose (Puil *et al*, 1994), resposta reduzida a estímulos apoptóticos (Bedi *et al*, 1994), e adesão alterada às células do estroma e matriz extracelular (Gordon *et al*, 1987).

1.1.2- Características clínicas, laboratoriais e morfológicas

Habitualmente, a doença apresenta evolução clínica com duas a três fases: crônica (FC), quando geralmente o diagnóstico é realizado; acelerada (FA), em que há o agravamento do quadro clínico do paciente; e crise blástica (CB), com comportamento de doença aguda e refratária ao tratamento, representando a fase final da doença (Jaffe et al, 2001). Cerca de 90% dos pacientes apresentam LMC na FC, quando a doença tem evolução insidiosa, havendo normalização dos sintomas, sinais físicos normais e achados hematológicos após tratamento. Essa resposta satisfatória é transitória, a maioria dos pacientes acaba evoluindo para CB, na qual a doença apresenta um quadro semelhante ao da leucemia aguda. Essa evolução pode ser abrupta; porém, em geral, é precedida de um período denominado FA, de dificuldade progressivamente maior em manter a contagem de leucócitos abaixo de 20.000/µL, assim como de outras manifestações, como esplenomegalia crescente, desenvolvimento de anemia e/ou trombocitopenia; ou febre, mal-estar e perda de peso. Um dos critérios seguintes deve estar presente para diagnosticar a FA: aumento de blastos (>10-19%) no sangue periférico ou medula óssea, aumento de basófilos (>20%) no sangue periférico, trombocitopenia (<100x10⁹/L) não relacionada à terapia ou trombocitose persistente (> 1000×10^9 /L) não responsiva à terapia, esplenomegalia e leucocitose progressiva não responsivas à terapia, ou desenvolvimento de evolução clonal (novas alterações cromossômicas além do cromossomo Ph). A crise blástica é caracterizada pela presença de ≥ 20% de blastos no sangue periférico ou medula óssea, infiltração leucêmica extramedular documentada ou focos de blastos na biópsia de medula óssea (Jaffe et al, 2001). Nesta fase, precursores mielóides podem formar tumores nos linfonodos, pele e ossos (Kantarjian e Talpaz, 1988).

O único tratamento curativo para LMC até o momento é o transplante alogênico de medula óssea (Faderl *et al*, 1999). Entretanto, a idade média do doente inicialmente acometido de LMC, de 50 anos, somada à ausência de doador HLA compatível, limita a indicação de transplante a uma minoria de pacientes. De praxe, menos de 20% dos doentes são curados com esta modalidade terapêutica.

Alberto e Costa (2003) analisaram a expressão gênica diferencial em amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes com LMC através da técnica de ORESTES (*open reading frame expressed sequence tags*) e comprovaram o aumento da expressão de nove genes por *real-time* RT-PCR (qPCR). Entre os genes com maior expressão no tecido neoplásico em relação ao tecido normal destacou-se o gene ABR (*active* BCR-*related*), com aumento de expressão de cerca de 50 vezes no tecido tumoral,

sugerindo um papel importante do ABR no controle de proliferação celular de células leucêmicas, eventualmente até nos casos que se mostraram resistentes ao mesilato de imatinibe (Glivec® Novartis, *Basel*, Suécia). Desta forma, o estudo do gene ABR poderá ser útil no desenvolvimento de novas terapêuticas para os casos resistentes ao mesilato de imatinibe e auxiliar no desenvolvimento de terapias com múltiplas drogas que previnam a emergência de clones resistentes.

1.1.3- Estrutura e mecanismo de ação do mesilato de imatinibe

Em razão da comprovação experimental de que a hiperatividade da proteína do gene BCR-ABL era a responsável direta pela proliferação neoplásica na LMC, esta proteína foi uma das primeiras selecionadas para inibição seletiva (Druker e Lydon, 2000). O mesilato imatinibe pertence à classe de compostos de conhecida como 2-fenilaminopirimidinas, os quais foram desenvolvidos no começo dos anos 1990 (Zimmermann et al, 1997). A droga é um potente inibidor de três tirosino-quinases: Abelson (ABL), receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-R) e c-KIT (receptor do fator de célula tronco). Proteínas quinases são enzimas que transferem fosfato a partir do ATP para aminoácidos específicos nas proteínas substratos. A fosforilação dessas proteínas leva à ativação de vias transdutoras de sinal, que têm papel crítico numa variedade de processos biológicos, como crescimento, diferenciação e morte celular (Kolibaba e Druker, 1997). Várias proteínas quinases são desreguladas e altamente expressas em cânceres humanos e são alvos atrativos para inibidores específicos, sendo a tirosino-quinase do gene BCR-ABL de LMC a mais extensivamente estudada (Faderl et al, 1999; Sawers, 1999; Sawers e Druker, 1999; Deininger et al, 2000; Goldman, 2000; Goldman e Melo, 2001; Holyoake, 2001; Savage et al, 2002). O desenvolvimento do mesilato de imatinibe ampliou as opções de tratamento para pacientes com LMC e outros tipos de leucemias Ph positivas (Goldman e Druker, 2001). Pela primeira vez, uma droga de baixa toxicidade e de ação específica foi capaz de induzir remissões por um longo tempo com respostas citogenéticas na maioria dos pacientes com LMC na FC. Nas leucemias Ph positivas, a utilização do mesilato de imatinibe é uma estratégia racional para inibir os mecanismos que causam a transformação neoplásica (Mauro et al, 2002). Nas células que

expressam o oncogene BCR-ABL, a droga induz três efeitos: inibição da autofosforilação e da fosforilação dos substratos do BCR-ABL, inibição da proliferação e indução de apoptose (Druker *et al*, 1996; Gambacorti-Passerini *et al*, 1997; Deininger *et al*, 1997). A droga ocupa uma parte da região de ligação do ATP da enzima, produzindo seus efeitos inibitórios ao se ligar e estabilizar uma forma inativa da BCR-ABL sem ligação do ATP (Schindler *et al*, 2000; Savage *et al*, 2002) (Figura 1).



Figura 1- Mecanismo de ação da proteína quimérica BCR-ABL e sua inibição por meio do mesilato de imatinibe. O painel A mostra a oncoproteína BCR-ABL com uma molécula de ATP ligada à proteína quinase. A proteína substrato é ativada pela fosforilação de um de seus resíduos de tirosina, o que resulta na ativação de moléculas efetoras e, consequentemente, no processo de proliferação neoplásica em LMC. Quando o imatinibe ocupa o sítio de ligação do ATP da proteína quinase (painel B), a ação da BCR-ABL é inibida, impedindo a fosforilação da proteína substrato. Adaptado Goldman (2001)de e Melo por Savage et al (2002).

1.1.4- Resultados do tratamento da LMC com mesilato de imatinibe

A resposta ao mesilato de imatinibe pode ser expressa em três níveis: resposta hematológica, definida com normalização do sangue periférico e do tamanho do baço; resposta citogenética, definida pela proporção de células Ph positivas residuais, sendo completa (ausência de metáfases Ph positivas) ou maior (1-35% de metáfases Ph positivas); resposta molecular: redução nos níveis de cópias do BCR-ABL da ordem de no mínimo 3 log detectada por qPCR.

Resposta hematológica inicial ocorre em 52% dos pacientes com CB-mielóide da LMC e 60% dos pacientes com LLA Ph positiva ou CB-linfóide da LMC. Entretanto, os efeitos terapêuticos do mesilato de imatinibe duram um curto período (3-6 meses), e a resistência à droga e a recaída ocorre rapidamente em quase todos os pacientes (Ottmann *et al*, 2002; Sawyers *et al*, 2002). Resposta citogenética completa ocorre em somente 7% dos casos em FA e CB. Contudo, uma sobrevida prolongada pode ocorrer mesmo na ausência de resposta citogenética (Talpaz *et al*, 2002).

Pacientes com LMC na FC com doença intolerante, resistente ou refratária ao tratamento com interferon, respondem melhor que pacientes com a doença mais avançada. Resposta citogenética maior ocorreu em 64% dos pacientes (Kantarjian *et al*, 2002). Embora estas respostas pareçam ser de longa duração, a maioria dos pacientes com resposta citogenética completa ainda apresenta rearranjo BCR-ABL detectado por RT-PCR (Druker, 2002), mesmo após dois anos de tratamento.

Recentemente, um estudo comparou o uso de ARA-C/IFN versus mesilato de imatinibe como tratamento como primeira linha da LMC. O grupo tratado com Glivec® apresentou 87% de resposta citogenética (76% completa), em comparação com o outro grupo (14,5% de resposta citogenética). Em 18 meses de seguimento dos pacientes a taxa de sobrevida livre de progressão foi superior no braço do mesilato de imatinibe (O'Brien *et al*, 2003).

1.1.5- Resistência ao tratamento com mesilato de imatinibe

Define-se resistência hematológica ao mesilato de imatinibe como a falha da resposta hematológica completa nos pacientes com LMC na FC (Kantarjian *et al*, 2002), falha do retorno para FC nos pacientes na fase aguda (Talpaz *et al*, 2002) ou falha de resposta parcial nos pacientes com LMC na CB (Sawyers *et al*, 2002). A resistência pode ser primária (sem resposta ao Glivec® desde o início do tratamento) ou secundária (desenvolvimento de resistência após a obtenção de resposta objetiva inicial). A resistência clínica ao mesilato de imatinibe é mais comum nos pacientes em fases mais avançadas, e ocorre dentro de três a seis meses após o início do tratamento em mais de 70% dos pacientes (Ottmann *et al*, 2002; Sawyers *et al*, 2002). Uma vez desenvolvida a resistência, a doença se torna agressiva na maioria dos casos. Após dois anos de tratamento, 10% dos pacientes em FC, 50% em FA e 61% em CB recaem após resposta hematológica inicial. Na FC, poucos pacientes apresentaram recaída após resposta citogenética completa (Gambacorti-Passerini, 2002). Patricio *et al* (2003), observaram resistência em 11/37 casos de LMC (37%), todos em FA ou CB.

1.1.6- Mecanismos de resistência ao mesilato de imatinibe

Estudos *in vitro* identificaram alguns mecanismos de resistência ao mesilato de imatinibe: aumento da proteína BCR-ABL, amplificação do gene BCR-ABL e expressão elevada da glicoproteína P (relacionada com resistência a múltiplas drogas) (Mahon *et al*, 2000).

Em pacientes foram descritos como mecanismos de resistência: amplificação gênica ou aumento da expressão do BCR-ABL (Gorre *et al*, 2001), evolução clonal com alterações adicionais do cariótipo (Hochchaus *et al*, 2002) e mutações no domínio tirosino-quinase do BCR-ABL (Branford *et al*, 2002 e 2003) do BCR-ABL.

Estudos cristalográficos revelaram que o imatinibe se liga ao BCR-ABL preenchendo uma região criada no sítio de ligação do ATP através do motivo DFG da alça de ativação, sendo deslocado da posição que ele ocupa na conformação cataliticamente ativa da enzima (Schindler *et al.*, 2000; Nagar *et al*, 2003). Mutações de ponto do BCR-ABL têm sido caracterizadas, como aquelas que desestabilizam esta conformação inativa da proteína, ou aquelas que impedem o contato direto entre a proteína e o imatinibe (Shah *et al*, 2002; Corbin *et al*, 2003; Cowan-Jacob *et al*, 2004). Em geral, as mutações de ponto afetando resíduos em contato próximo com imatinibe conferem um maior grau de resistência do que aquelas afetando a estabilidade da conformação da proteína.

Mutações em pelo menos 17 posições diferentes de aminoácidos dentro do domínio BCR-ABL quinase têm sido associadas com resistência clínica ao mesilato de imatinibe em pacientes com LMC (Branford *et al*, 2002; Hochhaus *et al*, 2002; Roche-Lestienne *et al*, 2002, N. P. Shah *et al*, 2002; Al-Ali *et al*, 2004; Ichihara *et al*, 2004).

A recaída é freqüentemente associada com mutações de ponto no domínio quinase da proteína BCR-ABL que reduzem a afinidade de ligação do mesilato de imatinibe, ou ocasionalmente com amplificação do gene BCR-ABL (Gorre *et al*, 2001; Cowan-Jacob *et al*, 2004; le Coutre *et al*, 2000; Weisberg e Griffin, 2000; Mahon *et al*, 2000; Campbell *et al*, 2002; Hochhaus *et al*, 2002; Morel *et al*, 2003).

1.1.7- Novas terapias para tratamento de LMC refratária ao mesilato de imatinibe

Outra abordagem para controle da resistência ao mesilato de imatinibe seria o uso de inibidores que ligam à proteína BCR-ABL com requerimentos conformacionais menos estringentes que o imatinibe. O mesilato de imatinibe tem como alvo uma conformação inativa do domínio Abl quinase no qual a alça de ativação está numa posição desfosforilada, fechada, que é incompatível com a ligação do substrato (Schindler *et al*, 2000). Diferenças específicas entre as conformações inativas das proteínas ABL e SRC forneceram uma base estrutural para uma descoberta inicialmente surpreendente de que as quinases das famílias SRC não são alvos do imatinibe, apesar do alto grau de homologia de seqüência. As conformações ativas de ABL e SRC são mais similares, e muitos inibidores que se ligam à conformação ativa da Src também são capazes de inibir a Abl (Nagar *et al*, 2003). Dois inibidores da quinase Abl, dasatinibe (BMS-354825) e AMN 107 têm mostrado eficácia em testes clínicos para tratamento de LMC refratária ao imatinibe. Os dados observados foram apresentados no evento *Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology* em 2005 (Sawyers *et al*, 2005; Shah *et al*, 2004). Entretanto, por se tratar de estudos recentes, a eficácia em longo prazo destes novos inibidores ainda não está determinada.

Dasatinibe é um inibidor das quinases Abl e Src e apresentou potente atividade inibitória contra todos os mutantes da quinase BCR-ABL observados em pacientes com recaída, com exceção da mutação T315I. Estruturalmente, dasatinibe é um tiazolecarboxamida não relacionado ao imatinibe. Estudos estruturais de inibidores duais SRC-ABL mostram que estes compostos também podem ligar-se ao sítio de ligação do ATP da Abl, entretanto, sem levar em consideração a posição da alça de ativação, o qual pode estar em uma conformação ativa ou inativa (Nagar *et al*, 2002).

AMN 107 é uma aminopirimidina derivada do imatinibe. Este composto inibiu a atividade de tirosino-quinase dos receptores PDGF e c-Kit, mostrando eficácia similar ao imatinibe, possuindo, portanto, grande seletividade para BCR-ABL. Entretanto, AMN 107 não mostrou atividade contra ampla variedade de proteínas quinases em concentrações abaixo de 3M, incluindo c-Src. Assim como o imatinibe, AMN 107 se liga à conformação inativa da Abl quinase (Cowan-Jacob *et al*, 2004).

O'Hare *et al* (2005) relataram que AMN 107 e BMS-354825 são mais potentes que imatinib contra células expressando BCR-ABL do tipo selvagem e que melhoras similares são mantidas para todos os mutantes resistentes ao imatinibe testados, com exceção da mutação T315I. Entretanto, parece claro que o surgimento mutações adquiridas que acarretem ganho de função não é capaz de explicar todos os casos de resistência e que outros sistemas gênicos podem estar envolvidos no fenótipo da LMC.

Mecanismos de sobrevivência celular que operam independentemente do BCR-ABL podem ser responsáveis por muitos casos de resistência primária (sem resposta ao Glivec® desde o início do tratamento), embora o entendimento destes mecanismos ainda permaneça limitado (Shah *et al*, 2005). Em alguns casos, vias alternativas podem ser responsáveis pela resistência adquirida, como sugerido por estudos em células primárias em um caso associado com um gene de fusão NUP98/DDX10 em adição ao cromossomo *Philadelphia* (Yamamoto *et al*, 2005). Adicionalmente, linhagens celulares estabelecidas de amostras de medula óssea obtidas a partir de pacientes refratários ao Glivec® têm mostrado ativação de SRC em algumas instâncias (Donato *et al*, 2003).

1.1.8- O gene ABR

A avaliação da expressão gênica de um determinado tecido tumoral tem sido utilizada por numerosos autores para identificar genes com papel importante na evolução do câncer. Heisterkamp et al (1989) descreveram pela primeira vez um gene homólogo ao gene BCR, o ABR, localizado no cromossomo 17 (17p13.3), que codifica uma proteína contendo três domínios funcionais. O gene ABR codifica uma proteína de 98 kDa que contém 68% de identidade de sua seqüência às regiões central e terminal da proteína BCR (Heisterkamp, et al 1989, Tan et al, 1993). De maneira similar ao BCR, o transcrito ABR é mais expresso no tecido hematopoético e no cérebro (Heisterkamp et al, 1993). Ambas as proteínas ABR e BCR compartilham três domínios funcionais distintos: um domínio Rho-GEF (fator de troca de nucleotídeo G) ou domínio de homologia Dbl (DH), o qual acelera a troca de GDP por GTP, ativando a GTPase (Bourne et al, 1990; Boguski e McCornick, 1993); um domínio Rho-GAP (proteína ativadora de GTPase), o qual é essencial para elevar a atividade de GTPase (Wittinghofer et al, 1997); e um domínio de homologia pleckstrin, o qual está envolvido em interações proteína-proteína ou ligação de fosfolipídeos ácidos (Rebecchi e Scarlata, 1998; Katan e Allen, 1999). Estes dados sugerem que as proteínas multifuncionais ABR e BCR podem interagir simultaneamente e/ou seqüencialmente com membros da família Rho para regular e coordenar a sinalização celular. Embora as funções biológicas da proteína ABR permaneçam desconhecidas, Chuang et al (1995) sugeriram que ABR pode catalisar a troca de nucleotídeo G e a atividade de GTPase das proteínas CDC42 e Rac (Chuang et al, 1995). De maneira interessante, de acordo com Heisterkamp et al (1989), o gene ABR encontra-se no mesmo locus relacionado à doença genética cerebral denominada síndrome de Miller-Dieker. Além disto, McDonald et al (1994) encontraram deleção do locus do ABR em 7 de 8 casos de

meduloblastoma, tumor maligno mais freqüente do sistema nervoso central em crianças, o que forneceu evidências para concluírem por seu provável papel em biologia de tumores. Em 2004, Diao *et al*, utilizando dados de microarranjos, identificaram expressão elevada do ABR no tecido ovariano em pacientes com síndrome do ovário policístico (SOMP), apresentando um aumento de expressão de 2,15 vezes em comparação com amostras controles. Em contrapartida, ABR mostrou ser menos expresso em pacientes com linfomas de células B grandes e difusas (LCBGDs) (Kobayashi *et al*, 2003).

Alberto e Costa (2003) analisaram a expressão gênica diferencial em amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes com LMC através da técnica de ORESTES (*open reading frame expressed sequence tags*) e comprovaram o aumento da expressão de nove genes por *real-time* RT-PCR quantitativo. Entre os genes com maior expressão no tecido neoplásico em relação ao tecido normal destacou-se o gene ABR (*active* BCR- *related*), sugerindo um papel importante do ABR no controle de proliferação celular de células leucêmicas, eventualmente até nos casos que se mostraram resistentes ao Glivec®. Portanto, este projeto teve como objetivo avaliar a expressão do gene ABR em amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes portadores de LMC em fase crônica ao diagnóstico e em pacientes que receberam transplante alogênico de medula óssea, por meio da técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

2- OBJETIVOS

No presente trabalho, tivemos por objetivos:

- Determinar, pelo método de RT-PCR quantitativo em tempo real (qPCR), a expressão do gene ABR em amostras de medula óssea e sangue periférico de pacientes portadores de LMC em fase crônica ao diagnóstico e em pacientes que receberam transplante alogênico de medula óssea;
- Validar os dados de expressão do gene ABR com qPCR, por meio da normalização dos níveis de expressão gênica relativa com utilização de genes controle apropriados para este estudo.
3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Pacientes e Amostras biológicas

Foram utilizadas quatro amostras de sangue periférico e cinco amostras medula óssea provenientes de nove pacientes de LMC em fase crônica ao diagnóstico. Adicionalmente, seis amostras de medula de quatro pacientes que receberam transplante alogênico de medula óssea (TMO) foram avaliadas em 100 ou 180 dias após o transplante. As amostras foram obtidas dos ambulatórios de Hematologia da UNICAMP e da UNIFESP e foram coletadas no momento da punção e biópsia diagnóstica. Como indivíduos controle, foi utilizado um *pool* de amostras de três doadores de medula óssea para transplante alogênico. O diagnóstico foi confirmado com base nos achados citológicos, anatopatológicos, citogenéticos e moleculares (Jaffe *et al*, 2001). Todos os pacientes assinaram termo de consentimento aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas (Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP).

3.2- Extração do RNA Total

Amostras frescas de medula óssea e sangue periférico de pacientes de LMC em fase crônica foram tratadas com NH₄Cl 0,144M, NH₄HCO₃ 0,01M para lise das hemácias. Células mononucleares amostras de medula óssea de pacientes que receberam transplante alogênico de medula óssea (TMO) foram isoladas por meio de centrifugação de amostras diluídas em Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, 1.077 g/ml) a 2000 rpm durante 30 minutos. As células mononucleares foram coletadas, lavadas em PBS, centrifugadas a 2000 rpm durante 15 minutos e suspensas em 800 µL de PBS.

O RNA total das amostras de pacientes e indivíduos normais foi isolado utilizando TRIzol *Reagent (Invitrogen)*, uma solução monofásica de fenol e guanidina isocianato. Durante a homogeneização, o reagente TRIzol mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares. Para extração de RNA total a camada leucocitária foi homogeneizada em TRIzol na proporção de 1,0 mL / 1,0 x 10⁷ células (Chomczinki e Sacchi, 1987). A solução de Trizol foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissolução dos complexos nucleoprotéicos. Para cada

1 mL de TRIzol utilizado na amostra foi realizado o seguinte procedimento. Acrescentaram-se às amostras 200 µl de clorofórmio (CHCl₃) e estas foram em seguida agitadas vigorosamente. Nova incubação foi realizada por mais 5 minutos à temperatura ambiente e, então, as amostras foram submetidas à centrifugação por 15 minutos a 13.200 rpm, em temperatura de 4°C. A fase orgânica, na qual se encontra o RNA, foi recuperada, transferida para um novo tubo e procedeu-se a precipitação do RNA por adição de 500 µl de isopropanol gelado, incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 13.200 rpm por 15 minutos em temperatura de 4°C. Após a precipitação, o *pellet* de RNA foi lavado com etanol 75% em água destilada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) para remoção do excesso de sal e, novamente centrifugado, a 11.800 rpm por 5 minutos, em temperatura de 4°C. As amostras de RNA total foram ressuspendidas em água com DEPC e incubadas por 10 minutos a 55°C. Adicionaram-se 200 µL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente esta suspensão e incubando-a por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 13.500 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o RNA total foi coletado e foram adicionados 500 µL de isopropanol. Esta suspensão foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada por 13.500 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Em seguida, o pellet de RNA total foi coletado e a este foi adicionado 1 mL de etanol (75% em água destilada tratada com DEPC). Após agitação em vórtex, esta suspensão foi centrifugada a 11.800 rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o *pellet* foi coletado, diluído em água destilada tratada com DEPC e estocado a -80°C.

A quantificação do RNA obtido em solução aquosa foi realizada através da leitura de uma alíquota da amostra (DO = 260 nm) no espectrofotômero de luz UV *GeneQuant (Pharmacia)*. Nestas condições, uma unidade de DO equivale a 40 μ g/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, e resultou, invariavelmente, entre 1,6 e 1,8 (Sambrook e Russel, 2001).

3.3- Avaliação de qualidade do RNA isolado

Além da razão adequada entre os resultados das leituras das amostras de RNA (item 3.2), a qualidade das amostras de RNA foi testada por eletroforese. Um μ g de RNA em *loading buffer* e 0,1 μ g/mL de brometo de etídio a 2% em azul de bromofenol foi aquecido (65⁰ C) por 5 minutos e aplicado em cada poço no gel de agarose (1,2% em tampão MOPS). A qualidade adequada das amostras foi definida pela presença de maior intensidade de coloração na banda referente ao rRNA 28S em relação ao 18S (Figura 2). Eventual degradação do RNA das amostras é preferencialmente percebida na fração 28S, resultando em inversão dessa razão de intensidade de luz ou mesmo ausência destas bandas. As amostras utilizadas neste estudo apresentavam o padrão característico de qualidade do RNA ribossomal (Figura 2).



Figura 2- Avaliação de integridade do RNA. Eletroforese em tampão formamida em gel de agarose e corada por brometo de etídio de amostras de RNA total isoladas para o estudo.

3.4- Transcrição reversa para real- time RT-PCR (qPCR)

Cinco μ g das amostras de RNA foram incubadas com 1U de DNaseI à temperatura ambiente durante 30 minutos) e EDTA foi adicionado a uma concentração final de 2mM para interromper a reação. A enzima foi inativada por incubação a 65[°] C, durante 10 minutos. As amostras de RNA tratadas com DNaseI foram submetidas à transcrição reversa com 200 U de *SuperScript*III (50[°] C, 50 minutos; 85[°] C, 5 minutos). Essa etapa consiste em eliminar a interferência de contaminação das amostras por DNA

genômico. Duas unidades de RNaseH foram adicionadas a seguir e as amostras foram incubadas a 37^{0} C por 20 minutos (*Life Technologies*). As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro de luz UV *GeneQuant (Pharmacia)*. Para uma avaliação qualitativa da transcrição reversa, amplificação por RT-PCR convencional de segmento de 640 pb do gene da β-actina (ACTB) foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ *Research Inc.*). 1µl de reação de cDNA foi adicionado a uma mistura de PCR *Buffer*, dNTP 10mM, MgCl₂ 50 mM, 2,5 U de *Taq* DNA *Polymerase*, 10mM de cada *primer* ACTB. A reação de PCR consistiu de uma ativação inicial da polimerase (94^oC, 3 minutos), seguida por 35 ciclos de amplificação - anelamento (58^oC, 45s) e extensão (72^oC, 40s)- sendo em seguida incubada por 72^oC, 10 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE e visualisadas pelo corante brometo de etídio. Como controle positivo foi incluído cDNA obtido de K562, linhagem celular derivada de LMC (Figura 3). cDNA foi estocado a -20^oC. As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro de luz UV *GeneQuant (Pharmacia)*.



Figura 3- Avaliação de integridade de cDNA por meio de segmento do gene ACTB amplificado. Eletroforese em tampão TAE em gel de agarose e corada por brometo de etídio de amostra de cDNA amplificado e isolado para estudo (A) e controle positivo (cDNA de K562) (C). M, marcador de peso molecular.

3.5- *Real- time* **RT-PCR** (**qPCR**)

Esta técnica foi realizada em equipamento GeneAmp 5700 Sequence Detector System com o agente fluorescente SybrGreen I (Applied Biosystems). O método é baseado na detecção do produto de amplificação através da medida do aumento na fluorescência, detectada por câmara CCD (amplitude de detecção de 530 a 580 nm), causado pela ligação do SybrGreen I à fita dupla de DNA, o que causa aumento de emissão de luz em até 100 vezes para uma mesma concentração de SybrGreen I livre em solução. Essa intensidade de luz vai aumentando ao longo do tempo à medida que são gerados produtos na reação de PCR, e é registrada pelo equipamento no curso da reação (Figura 4). O momento da reação, no intervalo de ciclos de PCR, em que a fluorescência de determinada amostra é detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (background), é denominado CT (threshold *cycle*). Durante a fase de acúmulo exponencial do produto amplificado em experimentos de qPCR há eficiência ótima de reação, permitindo quantificação mais precisa. O threshold é estabelecido em função da quantidade de fluorescência considerada ruído de fundo e é traçado em um ponto no qual o sinal gerado a partir de uma amostra é significativamente maior que o ruído de fundo (Ginzinger, 2002). Por meio da análise das curvas de amplificação, tendo como parâmetros a intensidade de fluorescência (eixo y) versus o número de ciclos de PCR (eixo x), a linha de base (*baseline*) é definida como os ciclos de PCR nos quais um sinal é acumulado, mas está abaixo dos limites de detecção do instrumento. O sinal de fluorescência medido durante estes ciclos de PCR é usado para a escolha manual do threshold em cada experimento. Os parâmetros baseline e threshold podem ser ajustados para cada gene, mas devem ser idênticos para todas as amostras na mesma corrida, tornando-as comparáveis. Um sinal fluorescente detectado acima do threshold é considerado um sinal real que, novamente, pode ser usado para definir o ct para uma amostra. Assim, qPCR foi realizado para quantificar a expressão do gene ABR em amostras de medula óssea de pacientes com LMC em relação a indivíduos controle (doadores de medula óssea para transplante alogênico). Para cada amostra foram empregados 12,5 µL de mistura de PCR contendo solução de SybrGreen I para o volume final de 25µL. As condições de reação de qPCR foram 50^oC por 2 minutos, 95^oC por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de amplificação de 95⁰C por 15s e um passo combinado de extensão e anelamento de 60ºC durante 1min.Na fase de padronização das reações foi

feita análise do produto de amplificação em gel de agarose. Reações controle, sem adição de cDNA, foram incluídas para cada conjunto de iniciadores. Ao final da reação de amplificação foi realizado ciclo de variação crescente de temperatura (de 60 a 95° C) e monitoramento da fluorescência de forma a avaliar a curva de dissociação (Tm) do produto de PCR (melting curve analysis) (Figura 5). Este resultado, expresso em graus Celsius, é característico de cada produto de PCR, dependente de seu tamanho e composição química, podendo revelar a presença de mais de um produto em determinada amostra, o que poderia corresponder à amplificação inespecífica ou à excessiva presença de interferentes da reação de amplificação, como dímeros de iniciadores que eventualmente concatenam-se naquelas condições, produzindo quimeras (User Bulletin #2, Applied Biosystems Inc., 2001). A determinação do nível de expressão do ABR em amostras de LMC em relação aos indivíduos controle foi realizada tendo-se como genes controle β-actina (ACTB), gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase (GAPD) (Schmittgen et al., 2000) e BCR (Branford et al., 1999). Em todos os ensaios foi utilizada a mesma quantidade de cDNA. O aumento da expressão (quantificação relativa) foi calculado com a fórmula (Applied Biossystems *Inc.*, 2001): AE = $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo AE o aumento de expressão e $\Delta\Delta CT$ igual ao CT do gene de interesse (alvo) menos o CT do gene controle em LMC, subtraído do CT do gene alvo menos o CT do gene controle na amostra calibradora (*pool* de indivíduos normais), como se segue:

$$\Delta\Delta CT = (CT_{alvo} - CT_{controle})_{LMC} - (CT_{alvo} - CT_{controle})_{calibradora}$$

Para viabilizar o uso desta fórmula para cálculo do nível de expressão gênica relativa, as eficiências de amplificação das reações de PCR foram avaliadas e resultaram, como mostrado adiante, em valores semelhantes e próximos a 100% (item 3.6.5, Figuras 6 e 7). Com a finalidade de estabelecer o *status* da doença, o transcrito de fusão BCR-ABL foi investigado separadamente como descrito previamente por Branford *et al* (1999) em equipamento 7500 *Sequence Detector System* (*Applied Biosystems*) pelo Grupo de Métodos Moleculares do Fleury Medicina Diagnóstica, sob supervisão do Professor Doutor Fernando L. Alberto.



Figura 4- Monitoramento em tempo real das curvas de amplificação proporciona estabelecimento de nível de fluorescência na fase ótima (aumento exponencial da fluorescência) da reação de amplificação. O nível de fluorescência computado para cada amostra é aquele suficiente para atingir um limiar (traço horizontal azul) de detecção igual para cada conjunto de iniciadores/amostras testado e por convenção denominado de CT. A figura mostra cinco conjuntos de iniciadores e uma única amostra. Para cada conjunto de iniciadores os experimentos foram realizados em duplicadas (visível na figura através da diferença de cores entre as curvas de amplificação, embora com coeficiente de variação reduzido). A fluorescência emitida antes do nível do CT para cada curva é considerada ruído de fundo (*background*). Nota-se que, para algumas curvas de amplificação, o valor do CT para o *threshold* que foi definido não é um número inteiro.



Figura 5- Curva de dissociação dos iniciadores utilizados no método de qPCR. Ciclo de variação crescente de temperatura, de 60 a 95° C (eixo x) e monitoramento da fluorescência (eixo y).

3.6- Clonagem

3.6.1- Reações de Purificação e Ligação

Após a amplificação dos genes ABR, BCR, ACTB e GAPD, os fragmentos foram analisados em um gel de agarose corado com brometo de etídio para determinar a qualidade e a quantidade dos produtos de PCR desejados. Em seguida, 10µL de cada produto da PCR foram preparados para ligação através do uso da atividade de exonuclease 3'-5'de 1µL do fragmento *Klenow* de DNA polimerase I para remover as extremidades 3'contendo uma única dATP. Os fragmentos de PCR foram concomitantemente fosforilados por 1µL de kinase polinucleotídeo T4 na presença 2µL do tampão 10X *Blunting/Kinasing*, adicionando-se água destilada estéril para completar 20µL de reação. Cada reação foi incubada por 30 minutos a 37°C e 10 minutos a 75°C. Então, foi realizada a purificação em coluna *Sephacryl* S-200 HR e, em seguida, 5µL do produto de cada PCR

purificado foi ligado a 1µL do vetor pUC 18 Sma I/BAP desfosforilado (50ng) *overnight* a 4°C utilizando 10µL de 2X *Ligation Buffer*, 1µL de solução DTT, 1µL de T4 DNA ligase, adicionando-se água destilada estéril para completar 20µL de reação (*SureClone Ligation Kit*).

3.6.2- Reação de Transformação

 5μ L de cada produto de PCR purificado ligado foram adicionados a 200 μ L de cultura de bactérias competentes E. coli DH 5 α e mantidos em banho de gelo por 20 minutos e, em seguida, incubados a 42°C por 1,5 minuto e mantidos em banho de gelo por mais 2 minutos. Em seguida, esta mistura foi incubada em 800µL de meio de cultura SOC a 37°C em agitador (350rpm) por 1h. Seguindo este procedimento, a cultura foi centrifugada (8000rpm, 1 minuto) e o *pellet* foi suspenso novamente em 100μ L da cultura e inoculado em placa de Petri contendo meio LB (Luria-Bertani) sólido acrescido de ampicilina (50 mg/mL)e suplementado com 35µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-Dtiogalactopiranosídeo (X-gal) (50mg/mL) e 20μL de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (100 mM) e incubado a 37°C overnight. Apenas as bactérias que possuem o DNA plasmidial, desenhado com os genes de resistência à ampicilina, foram selecionadas. A presença ou ausência de galactosidase pode ser facilmente determinada através do uso de um ensaio cromogênico, usando IPTG e X-Gal. IPTG é o indutor do gene lacZ e é necessário para a produção da galactosidase. O substrato usual para a proteína do gene lacZ é a galactose, que é metabolizada em lactose e glucose. X-Gal é um açúcar sem cor, modificado da galactose. Quando X-Gal é metabolizado pela galactosidase, os produtos resultantes são de cor azul. Assim, as colônias azuis representam as bactérias não recombinantes - já que a região do gene lacZ está intacta. Em vetores recombinantes que possuem um inserto clonado em um dos sítios de enzimas de restrição, este inserto resulta em um gene lacZ alterado e uma galactosidase não funcional. Desta forma, X-Gal não é metabolizado, resultando em colônias brancas. Portanto, as colônias brancas foram selecionadas e crescidas em caldo LB com ampicilina em agitador (130 rpm) a 37°C overnight. PCR com os iniciadores do alvo M13, presente nas extremidades do vetor,

ligadas ao inserto, foi realizada para avaliar a presença de cada inserto, nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C, 3 minutos; 35 ciclos de 94°C, 20s, 58°C, 15s e 1 ciclo de 72°C, 1 minuto. As seqüências amplificadas apresentaram os comprimentos do M13 (Tabela 1) mais o de cada inserto. Os fragmentos foram analisados em um gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para determinar a qualidade e a quantidade dos produtos de PCR desejados.

3.6.3- Seqüenciamento automatizado

Esta técnica foi realizada em equipamento MegaBACE 1000 (Amersham *Biosciences*), um sistema de análise de DNA de 96 capilares por eletroforese. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo padrão, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit com Thermo SequenaseII DNA Polimerase. Para cada reação foram utilizados 20 ng do produto de PCR purificado, 5 pmol dos iniciadores sense e anti-sense do alvo M13 (em reações separadas) (Tabela 1), 4 µL da solução DYEnamic ET reagent premix e água deionizada estéril (volume final 15 µL). A reação, distribuída em placa própria para seqüenciamento, foi protegida da luz com papel de alumínio. Em termociclador automático GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), as amostras foram submetidas desnaturação inicial (94°C - 3 minutos) e 35 ciclos de desnaturação (94°C - 20 segundos) e anelamento (55°C - 15 segundos) e um ciclo de extensão (60°C - 1 minuto). O produto da reação de seqüenciamento foi submetido à purificação com 2µl de acetato de amônio 7,5M e 50µL de etanol absoluto adicionados aos 15 µL de reação, com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e a seguir foram adicionados 100 µL de etanol 70%. Posteriormente, o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. Novamente, o sobrenadante foi desprezado por inversão, tomando-se o cuidado de não remover o *pellet*. Para completa remoção do etanol, a placa foi submetida à centrifugação invertida a 200 rpm por 6 segundos e finalmente aquecida em termobloco a 65°C por 5 minutos para a secagem dos wells. Para a eletroforese capilar, adicionaram-se 10µL de

loading buffer, uma mistura de formamida deionizada, 25mM EDTA (pH 8,0) em cada *well*. As amostras foram homogeinizadas, aquecidas a 65°C por 3 minutos e colocadas em banho de gelo para, a seguir, serem colocadas no seqüenciador para a eletroforese. O gel utilizado para a eletroforese foi o *MegaBACE Long Read Matrix* com poliacrilamida linear (LPAAs), e as condições de eletroforese foram as seguintes: voltagem de injeção da amostra, 3 kv; tempo de injeção da amostra, 60 segundos; voltagem de corrida, 9 kv; tempo de corrida, 70 minutos; potência do laser, 40 mW. As seqüências obtidas foram analisadas no programa *BLAST*, opção *"two sequences"*, disponível em <u>www.ncbi.nlm.nih.gov</u>, do *"National Center for Biotechnology Information"*, para investigar a similaridade entre cada fragmento seqüenciado e a seqüência de referência (Tabela 2).

Tabela 1-Seqüências nucleotídicas dos iniciadores utilizados no método de
seqüenciamento e comprimento do segmento amplificado pelo par de
iniciadores específico em pares de bases (pb).

alvo	iniciador senso	iniciador anti-senso	pb
M13	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC	137

Tabela 2- Seqüências nucleotídicas dos segmentos de DNA utilizados no método de seqüenciamento e comprimento do segmento amplificado pelo par de iniciadores específico em pares de bases (pb).

Alvo	seqüência de referência
ABR	ACACAGACAGCCCGCTTTGTTCTTTCATTTCCTCCAGCACTTTCTTT
(62 pb)	CCTGAGTCCAGC
BCR	CCTTCGACGTCAATAACAAGGATGTGTCGGTGATGATGAGCGAGATGG
(67 pb)	ACGTGAACGCCATCGCAGG
ACTB	AGGCCAACCGCGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACA
(79pb)	CCCCAGCCATGTACGTTGCTATCCAGGCTGT
GAPD	GCACCGTCAAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCATCAATGGAAATCCCA
(89pb)	TCACCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGG

3.6.4- Padronização da concentração de iniciadores

Os iniciadores utilizados foram desenhados com o *software Primer Express* (*Applied Biossystems Inc.*, 2001) (Tabela 3). Para padronização da concentração ótima de iniciadores, foram realizadas reações em duplicata contendo diferentes diluições de iniciadores, com conservação da concentração de cDNA, seguindo a matriz (Tabela 4), adotando-se aquela que proporcionava o CT mais baixo (maior sensibilidade) sem a geração de produtos inespecíficos, avaliados pela curva de dissociação e por eletroforese em gel de agarose. Entre as diferentes concentrações dos iniciadores ABR e BCR, não houve diferença significativa nos valores de CT a partir da concentração de 300nM. Assim, a concentração ótima de iniciadores ABR e BCR é de 300nM. Da mesma forma, a concentração ótima de iniciadores ACTB e GAPD é de 150 nM (Tabela 4).

 Tabela 3- Sequências nucleotídicas dos iniciadores a utilizados no método de qPCR e comprimento do segmento amplificado pelo par de iniciadores específico.

			Tamanho do segmento
Alvo	Iniciador senso	Iniciador anti-senso	amplificado
ABR	5' ACACAGACAGCCCGCTTTG 3'	5' GCTGGACTCAGGCGGAAA 3'	62 pb
ACTB	5' AGGCCAACCGCGAGAAG 3'	5' ACAGCCTGGATAGCAACGTACA 3'	79 pb
BCR	5' CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT 3	5' CCTGCGATGGCGTTCAC 3'	67 pb
GAPD	5' GCACCGTCAAGGCTGAGAAC 3'	5' CCACTTGATTTTGGAGGGATCT 3'	89 pb

Tabela 4- Matriz de concentrações de iniciadores para escolha da proporção ótima das concentrações de iniciadores senso (S) e anti-senso (A). S / A, concentração dos iniciadores senso / anti-senso (nM); CT, *threshold cycle;* StdDevCT, desvio padrão de CT.

Iniciador	S/A	СТ	StdDev CT	Iniciador	S/A	СТ	StdDev CT
ABR	150/150	32,62	8,46	BCR	150/300	26,13	7,88
ABR	150/150	31,33	8,46	BCR	300/150	26,83	7,84
ABR	150/300	30,68	7,88	BCR	300/150	26,6	7,84
ABR	150/300	30,99	7,88	BCR	300/300	25,73	7,38
ABR	150/600	29,62	0,26	BCR	300/300	25,64	7,38
ABR	150/600	29,26	0,26	ACTB	150/150	16,11	7,86
ABR	300/150	30,42	7,84	ACTB	150/150	16,29	7,86
ABR	300/150	30,69	7,84	ACTB	150/300	16,18	7,33
ABR	300/300	29,58	7,38	ACTB	150/300	16,3	7,33
ABR	300/300	29,63	7,38	ACTB	300/150	16,44	7,27
ABR	300/600	30,11	0,87	ACTB	300/150	16,43	7,27
ABR	300/600	31,35	0,87	ACTB	300/300	16,23	6,84
ABR	600/150	29,74	0,26	ACTB	300/300	16,11	6,84
ABR	600/150	30,11	0,26	GAPD	150/150	15,31	7,86
ABR	600/300	29,13	0,2	GAPD	150/150	15,04	7,86
ABR	600/300	29,4	0,2	GAPD	150/300	15,11	7,33
ABR	600/600	27,9	0,04	GAPD	150/300	15,1	7,33
ABR	600/600	27,96	0,04	GAPD	300/150	15,12	7,27
BCR	150/150	27,04	8,46	GAPD	300/150	15,28	7,27
BCR	150/150	27,44	8,46	GAPD	300/300	15,14	6,84
BCR	150/300	26,35	7,88	GAPD	300/300	15,04	6,84

3.6.5- Eficiência e linearidade da reação de qPCR

Ensaio de eficiência da reacão de qPCR foi realizado por meio de diluição de cDNA em escala logarítmica (Tabela 5), utilizando-se os iniciadores dos genes ABR, BCR, ACTB e GAPD na proporção ótima obtida (item 0). A eficiência da reação de qPCR (E) foi determinada pela fórmula $E = 10^{(-1/slope)}$, sendo E igual a eficiência da reação e *slope* igual ao coeficiente de inclinação da reta formada pelos CTs obtidos em cada uma das amostras da diluição seriada. Uma relação linear entre o CT, atravessando o limiar de fluorescência, e o logaritmo da concentração inicial de moléculas da reação foi estabelecida, como indicado pelo coeficiente de correlação linear de 0,99 (Figura 6 e Figura 7). Portanto, o valor de slope desta curva é uma medida acurada da eficiência da reação. A reação de qPCR com eficiência de 100% produz, a cada novo ciclo da reação, o dobro da quantidade de moléculas específicas do produto amplificado no ciclo anterior. Os transcritos investigados ABR, BCR, ACTB e GAPD mostraram eficiência na reação de: 98,2%; 99,8%; 100% e 100%, respectivamente, todas acima de 95%, como sugerido por Vandesompele et al. (2002). Neste contexto, a expressão relativa do gene ABR normalizada com os genes controle (BCR, ACTB e GAPD) - em comparação com uma amostra calibradora (*pool* de indivíduos normais), é dada por $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 5-	Determinação do logaritmo da concentração inicial (CO) de cDNA util	lizado para
	geração da curva padrão de eficiência da reação de qPCR.	

CO de cDNA	Equivalente log	Log CO	
(ng / uL)			
2	2 x 10 ⁰	0,3	
6,32	2 x 10 ^{0,5}	0,8	
20	$2 \ge 10^{-1.0}$	1,3	
63,24	2 x 10 ^{1,5}	1,8	
200	2 x 10 ^{2,0}	2,3	
632,45	2 x 10 ^{2,5}	2,8	



Figura 6- Curva padrão de eficiência da reação de qPCR para os genes ABR (A) e BCR (B). Os valores de CT das curvas de amplificação da PCR foram utilizados para gerar a curva. Eixo x: Logaritmo da concentração inicial de cDNA. Os pontos em vermelho representam as diluições de cDNA em escala logarítmica.



Figura 7- Curva padrão de eficiência da reação de qPCR para os genes ACTB (C) e GAPD
(D). Os valores de CT das curvas de amplificação da PCR foram utilizados para gerar a curva. Eixo x: Logaritmo da concentração inicial de cDNA. Os pontos em vermelho representam as diluições de cDNA em escala logarítmica.

3.6.6- Sensibilidade da reação de qPCR

Os produtos de PCR dos mesmos segmentos utilizados no método de qPCR foram purificados utilizando PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). Os fragmentos de DNA desejados foram cortados do gel de agarose 2%, dissolvidos em 30 µl de perclorato de sódio (Gel Solubilization Buffer (GS1)) para cada 100 mg de gel e incubados a 50°C por 20 minutos. Em seguida, a mistura obtida foi adicionada em uma coluna de extração para cada 400 mg de agarose e centrifugada a 12000 g por 1min. A fração eluída da coluna foi descartada, 500 µl de GS1 foram adicionados à coluna e esta foi incubada à temperatura ambiente por 1 minuto. Novamente, a coluna foi centrifugada a 12000 g por 1min, descartando-se a fração eluída da coluna. Em seguida, 700 µl de Wash Buffer (W9) com etanol foram adicionados à coluna e esta foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Então, a coluna foi centrifugada a 12000 g por 1min, descartando-se o eluído. Novamente, a coluna foi centrifugada a 12000 g por 1 minuto para remover qualquer tampão residual. Em seguida, 50 µl de TE Buffer (TE) aquecido a 65°C foram adicionados no centro da resina da coluna e esta foi incubada à temperatura ambiente por 1 minuto. Então, a coluna foi centrifugada a 12000 g por 2 minutos e o DNA purificado eluído da coluna foi coletado e estocado a -20°C até o momento do uso. Os produtos de PCR purificados foram quantificados em equipamento NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies), através da leitura das absorbâncias a 260 e 280 nm. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada para avaliar a pureza do DNA e resultou em, aproximadamente, 1,8 (ND-1000 Spectrophotometer V3.1 User's Manual). Para o cálculo do número de cópias, foram utilizadas as informações: 1 kb = 6,6 x 10^5 g/mol (dsDNA) (Sambrook e Russel, 2001), massa molecular dos alvos: ABR = 40920 g/mol, BCR = 44220 g/mol, ACTB = 52140 g/mol, GAPD = 58740 g/mol, 1 mol = 6.02×10^{23} moléculas. A sensibilidade analítica da reação de gPCR em *Geneamp* 5700 Sequence Detector System foi definida como a diluição (quantidade mínima de moléculas de DNA) que proporcionou amplificação detectável, e foi determinada por meio de diluição seriada em escala de dez vezes dos produtos de PCR purificados, produzindo 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 moléculas por tubo de diluição. Amplificação com os iniciadores ABR, BCR, ACTB e GAPD resultou em uma detecção mínima de 1, 12, 10 e 9 moléculas,

respectivamente (Tabela 6, Figura 8 e Figura 9), indicando que as quantificações poderiam ser realizadas neste alcance. Estes resultados também mostram a eficácia dos iniciadores desenhados em detectar números de cópias de cDNA muito pequenos através de qPCR.



Figura 8- Curvas de amplificação do ensaio de sensibilidade da reação de qPCR. Diluição seriada de produtos de PCR purificados dos segmentos dos genes ABR (A) e BCR (B). As curvas de amplificação são geradas pelo equipamento *Gene Amp* 5700 *Sequence Detector System*. Eixo x: número de ciclos de qPCR, eixo y: intensidade de luz normalizada. As curvas de amplificação mostradas da esquerda para a direita, correspondem ao número de cópias inicial de 10⁴, 10³, 10², 10¹ e 10⁰, respectivamente, para o ABR, e de 10⁵, 10⁴, 10³, 10² e 10¹, respectivamente, para o BCR.



Figura 9- Curvas de amplificação do ensaio de sensibilidade da reação de qPCR. Reações com diluição seriada de produtos de PCR purificados dos segmentos purificados dos genes ACTB (C) e GAPD (D). As curvas de amplificação são geradas pelo equipamento *Gene Amp* 5700 *Sequence Detector System*. Eixo x: número de ciclos de qPCR, eixo y: intensidade de luz normalizada. As curvas de amplificação mostradas da esquerda para a direita, correspondem ao número de cópias inicial de 10⁵, 10⁴, 10³, 10² e 10¹, respectivamente.

Alvo	Diluição	Moléculas	СТ
ABR	10 -11	10 0	38,63
ABR	10 -10	10 ⁻¹	35,62
ABR	10 -9	10 ²	32,68
ABR	10 -8	10 ³	29,23
ABR	10 -7	10 4	25,45
BCR	10 -10	$12 \ge 10^{0}$	35,81
BCR	10 -9	$12 \ge 10^{-1}$	32,62
BCR	10 -8	12×10^{2}	29
BCR	10 -7	12×10^{3}	25,54
ACTB	10 -10	10 ¹	35,66
ACTB	10 -9	10 ²	32,64
ACTB	10 -8	10 ³	29,03
ACTB	10 -7	10 4	25,51
GAPD	10 -10	9 x 10 ⁰	36,04
GAPD	10 -9	9 x 10 ⁻¹	32,7
GAPD	10 -8	9 x 10 ²	28,45
GAPD	10 -7	9 x 10 ³	25,42

Tabela 6- Valores brutos dos CTs e do número de moléculas correspondente à diluição doproduto de PCR convencional purificado dos segmentos dos genes utilizados nométodo de qPCR.

3.7- Validação experimental

3.7.1-Medida da estabilidade gênica (M) e ranking dos genes controle

Para validar a expressão estável presumida de um dado gene controle, é necessário conhecimento prévio de medida confiável para normalizar este gene com afinalidade de remover qualquer variação não específica. Vandesompele et al (2002) desenvolveram uma medida de estabilidade gênica para determinar a estabilidade de expressão de genes controle com base em níveis de expressão não normalizados. Esta medida é baseada no princípio de que a razão de expressão de dois genes controle ideais é idêntica em todas as amostras, independentemente da condição experimental ou tipo celular. Assim, a variação real das razões de expressão de dois genes controle, na prática, reflete o fato de que um (ou ambos) os genes não é (são) constantemente expressos, com variação crescente na razão correspondendo a uma estabilidade de expressão decrescente. Neste contexto, a medida de estabilidade (M) de um gene controle foi definida como a variação par-a-par média de um gene particular com outros genes controle. Genes com valor de M mais baixos têm expressão mais estável. Para validação dos resultados, os valores de CT de cada amostra para cada gene controle foram transformados em quantidades (Q), valores de entrada do aplicativo geNorm (Visual Basic Application -VBA), através da fórmula $Q = E^{(CTmin - CTamostra)}$, sendo Q a quantidade de amostra relativa à amostra com maior expressão; E, a eficiência de amplificação (2 = 100%) e CTmin, o valor de CT mais baixo, correspondente à amostra com maior expressão. Desta forma, foram avaliados os genes controle mais estáveis entre o grupo compreendido por BCR, ACTB e GAPD, utilizando-se amostras de LMC e uma amostra calibradora (pool de indivíduos normais), como sugerido por Vandesompele et al (2002). Os valores médios de estabilidade gênica (M) foram representados em negrito. O programa permite a eliminação do gene controle com pior desempenho, ou seja, aquele com o maior valor de M, no caso, o BCR (Figura 10), e recalcular novos valores de M para os genes controle remanescentes, ACTB e GAPD (Figura 11).

Change Data	BCR	ACTB	GAPD	Normalisation Factor
Ctl	0,180491149	0,000495097	0,002781348	0,0057
FC1	0,046070913	0,002182201	0,00283979	0,0060
FC2	1,00E+00	0,030606884	0,024013675	0,0820
FC3	0,150725978	1,00E+00	1,00E+00	0,4834
FC4	0,066523136	0,052556026	0,085377516	0,0607
FC5	0,77916458	0,050765775	0,040666933	0,1064
FC6	0,514056913	0,046714039	0,027776334	0,0794
FC7	0,469761375	0,747424624	0,655196702	0,5566
FC8	0,139660892	0,105843164	0,226879789	0,1360
FC9	0,220675749	0,00666121	0,009099481	0,0216
TMO1-D100	0,033960464	5,28E+00	2,61E-01	0,3271
TMO2-D100	0,014179987	0,000230971	2,13E+00	0,0174
TMO2-D180	0,795536484	0,003960779	0,005048253	0,0228
TMO3-D100	0,045436641	7,27E-01	9,52E-01	0,2867
TMO4-D100	0,243163737	0,000898621	0,000211069	0,0033
TMO4-D180	0,358488812	0,000804288	0,000148217	0,0032
M < 1,5	5,041	4,261	4,498	

Figura 10- Determinação dos genes controle mais estáveis entre os genes BCR, ACTB e GAPD. Os valores de CT de cada amostra para cada gene controle foram transformados em quantidades (Q), colunas BCR, ACTB e GAPD, através da fórmula $Q = E^{(CTmin - CTamostra)}$. Os valores médios de estabilidade gênica (M) de cada gene controle estão representados em negrito, na última linha da figura

Change Data			
	ACTB	GAPD	Normalisation Factor
૮૧	0,000495097	0,002781348	0,0010
FC1	0,002182201	0,00283979	0,0022
FC2	0,030606884	0,024013675	0,0235
FC3	1,00E+00	1,00E+00	0,8657
FC4	0,052556026	0,085377516	0,0580
FC5	0,050765775	0,040666933	0,0393
FC6	0,046714039	0,027776334	0,0312
FC7	0,747424624	0,655196702	0,6058
FC8	0,105843164	0,226879789	0,1342
FC9	0,00666121	0,009099481	0,0067
TMO1-D100	5,28E+00	2,61E-01	1,0151
TMO2-D100	0,000230971	2,13E+00	0,0192
TMO2-D180	0,003960779	0,005048253	0,0039
TMO3-D100	7,27E-01	9,52E-01	0,7202
TMO4-D100	0,000898621	0,000211069	0,0004
TMO4-D180	0,000804288	0,000148217	0,0003
M < 1,5	3,718	3,718	

Figura 11- Valores médios de estabilidade gênica (M) dos genes controle remanescentes calculados após a exclusão do gene controle menos estável (BCR). Os valores de CT de cada amostra para cada gene controle foram transformados em quantidades (Q), colunas ACTB e GAPD, através da fórmula $Q = E^{(CTmin - CTamostra)}$. Os valores médios de estabilidade gênica (M) de cada gene controle estão representados em negrito, na última linha da figura.

3.7.2- Variação par-a-par $(V_{n/n+1})$ entre dois fatores de normalização seqüenciais $(NF_n e NF_{n+1})$

Com a finalidade de determinar a necessidade da inclusão de n+1 genes (n=2) para a normalização dos resultados, variação par-a-par (V_{n/n+1}) foi calculada entre dois fatores de normalização seqüenciais (NFn e NFn+1) para todas as amostras de um mesmo tecido. Baseado nos dados de Vandesompele et al. (2002), uma grande variação $(V_{n/npositivas1} > 0,15)$ significa que o gene adicionado tem um efeito significativo e deveria ser incluído para o cálculo de um fator de normalização confiável. O valor V_{2/3} encontrado foi igual a zero. Assim, o fator de normalização deveria preferencialmente conter os dois genes controle com melhor desempenho, ACTB e GAPD. Segundo o mesmo autor, o uso de três genes controle é, na maioria dos casos, uma válida estratégia de normalização, e resulta em uma normalização mais precisa e confiável, comparada ao uso de apenas um único gene controle. Entretanto, por ter apresentado expressão muito instável nos ensaios, o gene controle BCR (Figura), provavelmente não seria a melhor escolha para um terceiro gene controle. Por esta razão, os níveis de expressão do gene ABR foram calculados utilizando-se a média geométrica das quantificações dos dois genes com melhor desempenho (ACTB e GAPD). Segundo o trabalho de Branford et al. (1999), o gene BCR foi escolhido como gene controle apropriado para monitoramento da terapêutica em LMC através de qPCR por ser constitutivamente expresso, e Collins et al (1987) relataram que os níveis de expressão relativos do BCR e do BCR-ABL em LMC são similares.Por este motivo, testamos a estabilidade do BCR como gene controle para este estudo. Entretanto, a normalização da expressão do gene ABR em amostras de LMC proporcionou resultados mais confiáveis quando realizada com os genes controle com melhor desempenho, ACTB e GAPD, como mostrado no item 3.7.1, Figura 10. O gene ABR possui grande homologia com o gene BCR e aparentemente apresenta funções características e outras compartilhadas com esse último, o que poderia explicar a relativa instabilidade do gene BCR neste estudo.

3.8- Análise estatística

Análise estatística dos resultados foi realizada no departamento de Estatística da Universidade Estadual de Campinas, utilizando o programa computacional S-PLUS 2000. O teste *Wilcoxon signed rank* foi utilizado para a comparação entre os grupos e p-valores menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4- RESULTADOS

4.1- Amostras de Pacientes com LMC versus Doadores de Medula Óssea

Os resultados da Figura 12 indicam que o gene ABR apresentou notável aumento de expressão relativa a indivíduos normais (mediana = 5,483) em 8 de 9 pacientes de LMC avaliados em fase crônica ao diagnóstico, de acordo com o teste *Wilcoxon signed rank* (p-valor = 0,01563), o que se correlaciona com resultados anteriores de nosso grupo (Alberto e Costa, 2003). A expressão do gene ABR foi normalizada com os dois genes controle com melhor desempenho, ACTB e GAPD, calculando-se a média geométrica do aumento de expressão e utilizando-se o algoritmo *geNorm* desenvolvido por Vandesompele *et al* (2002). Expressão do gene quimérico BCR-ABL por qPCR quantitativo em tempo real foi avaliada nos pacientes ao diagnóstico (Figura 13).



Figura 12- Níveis de expressão do gene ABR em cada amostra de pacientes com LMC em fase crônica (FC) ao diagnóstico em relação à amostra calibradora (*pool* de indivíduos normais) que apresenta valor igual a 1 (*p*-value = 0,01563).

4.2- Pacientes com LMC pós-transplante de medula óssea (TMO)

Os resultados da Figura 13 indicam que os níveis de expressão do ABR tendem à normalização em seis amostras provenientes de quatro pacientes avaliados 100 ou 180 dias após o transplante alogênico de medula óssea (TMO) e que apresentavam remissão molecular. A diferença entre os valores de expressão gênica em pacientes transplantados com remissão e indivíduos normais não foi considerada significativa, de acordo com o teste *Wilcoxon signed rank* (p > 0,05). Análise de Doença Residual Mínima (DRM) foi realizada utilizando o método qPCR para investigação do transcrito BCR-ABL e mostrou o *status* de remissão dos pacientes pós-TMO.

Ainda, os dados da Figura 13 sugerem que a diminuição nos níveis de expressão do ABR parece correlacionar-se com o *status* de remissão dos pacientes analisados, conforme avaliado pela expressão do transcrito BCR-ABL por PCR quantitativo em tempo real, o que pode ser confirmado nos pacientes em remissão molecular ao transplante alogênico de medula óssea (TMO)(p > 0,05).



Figura 13- Mediana dos níveis de expressão relativos dos genes ABR e BCR-ABL nos diferentes grupos de pacientes de LMC. FC, pacientes em fase crônica ao diagnóstico (n = 9); TMO, amostras de quatro pacientes que receberam transplante alogênico de medula óssea, avaliadas 100 ou 180 dias após o transplante (n = 6).

5- DISCUSSÃO

Leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa crônica resultante de alteração citogenética t(9;22) (q34; q11) que acarreta atividade constitutiva de tirosino-quinase por meio da proteína quimérica BCR-ABL. O tratamento com mesilato de imatinibe (Glivec®) tem sido proposto como primeira linha para a LMC. Entretanto, o desenvolvimento de resistência primária, assim como secundária, pode resultar em progressão da doença. Portanto, parece claro que o surgimento de mutações adquiridas que acarretem ganho de função não é capaz de explicar todos os casos de resistência, e que outros sistemas gênicos podem estar envolvidos na fisiopatogenia molecular da LMC.

O gene ABR, localizado no cromossomo 17, é um gene homólogo ao gene BCR (Heisterkamp *et al*, 1989) e codifica uma proteína que apresenta 68% de identidade com a proteína BCR. Chuang e colaboradores (1995) sugerem que as proteínas multifuncionais ABR e BCR podem interagir simultaneamente e/ou seqüencialmente com membros da família Rho para regular e coordenar a sinalização celular. De maneira interessante, alguns estudos apontaram evidências para provável papel do ABR em biologia de tumores, como relatado nas síndromes de *Miller-Dieker* (Heisterkamp *et al*, 1989) e do ovário policístico (Diao *et al*, 2004), em meduloblastoma (McDonald *et al*, 1994) e em linfomas de células B grandes e difusas (Kobayashi *et al*, 2003).

Neste trabalho, identificamos um aumento de expressão do gene ABR da ordem de cinco vezes em 8 de 9 pacientes de LMC avaliados ao diagnóstico, quando comparados ao *pool* de indivíduos normais. Este resultado, estatisticamente significante, correlaciona-se com estudo preliminar de nosso grupo (Alberto e Costa, 2003), o qual detectou aumento de expressão do ABR em biblioteca de cDNA, e indica a hiper regulação do ABR em células leucêmicas, fato que sugere uma possível importância do gene ABR durante a evolução da doença. Análise dos resultados obtidos em conjunto sugere que a diminuição nos níveis de expressão do ABR parece correlacionar-se com o *status* de remissão dos pacientes analisados, conforme avaliado pela expressão do transcrito BCR-ABL por PCR quantitativo em tempo real, o que pode ser confirmado nos pacientes em remissão molecular após transplante alogênico de medula óssea. O gene ABR possui grande homologia com BCR e aparentemente apresenta funções características e outras compartilhadas com esse último, atuando em vias metabólicas celulares semelhantes, o que

permite conjecturas a respeito de uma suposta função do ABR em LMC, encontrado em altos níveis nas células leucêmicas. O elevado nível de expressão demonstrado para o ABR possibilita perspectivas sobre a possibilidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para LMC. Adicionalmente, uma análise com maior tamanho amostral poderia indicar possível conclusão a respeito da utilização do gene ABR como fator prognóstico em LMC.

Devido à sua sensibilidade, reprodutibilidade e grande alcance dinâmico, a técnica de PCR em tempo real tem sido utilizada recentemente como uma ferramenta de rotina em biologia molecular para estudo de expressão gênica, com aplicações incluindo a quantificação de carga viral (Suryanarayana et al, 1998) e expressão de citocinas (Kruse et al, 1997). Branford e colaboradores (1999) desenvolveram um método para medida dos níveis de expressão do gene quimérico BCR-ABL em LMC por meio de qPCR, utilizado como um método rápido, preciso e confiável para monitoramento de doença residual mínima e resposta ao tratamento. Entretanto, o sucesso de sua aplicação depende do entendimento de problemas práticos e da validação experimental para uma quantificação precisa dos transcritos avaliados. A padronização do método de qPCR, realizada neste estudo, no que se refere à determinação da concentração ótima de iniciadores e à avaliação da eficiência e sensibilidade da reação, foi de fundamental importância para uma medida confiável dos níveis relativos de expressão gênica. Ainda, a expressão do ABR foi normalizada com os genes controle que apresentaram melhor desempenho, de acordo com o algoritmo geNorm, desenvolvido por Vandesompele et al (2002). Segundo os mesmos autores, o uso de três genes controle é, na maioria dos casos, uma válida estratégia de normalização, e resulta em uma normalização mais precisa e confiável, comparada ao uso de apenas um único gene controle. Entretanto, por ter apresentado expressão muito instável nos ensaios, o gene controle BCR, provavelmente não seria a melhor escolha para um terceiro gene controle. Por esta razão, os níveis de expressão do gene ABR foram calculados utilizando-se a média geométrica das quantificações dos dois genes com melhor desempenho (ACTB e GAPD). Segundo o trabalho de Branford et al (1999), o gene BCR foi escolhido como gene controle apropriado para monitoramento da terapêutica em LMC através de qPCR por ser constitutivamente expresso. Ainda, Collins et al (1987) relataram que os níveis de expressão relativos do BCR e do BCR-ABL em LMC eram similares. Por

este motivo, testamos a estabilidade do BCR como gene controle para este estudo. Entretanto, a normalização da expressão do gene ABR em amostras de LMC proporcionou resultados mais confiáveis quando realizada com os genes controle ACTB e GAPD. O gene ABR possui grande homologia com BCR e aparentemente apresenta funções características e outras compartilhadas com esse último, atuando em vias metabólicas celulares semelhantes, o que poderia explicar a relativa instabilidade do gene BCR neste estudo. A estratégia de normalização com a utilização de mais de um gene controle adotada no presente trabalho é recomendada em todos os experimentos de expressão gênica que utilizam qPCR, foi útil para uma medida mais acurada dos níveis de expressão por qPCR, e mostrou-se adequada para estudar a relevância dos sinais biológicos de pequena intensidade, tais como os observados nas amostras com AE < 5.

Os resultados apresentados nesta dissertação são importantes por colaborarem na compreensão da expressão do gene ABR em leucemia mielóide crônica e propõem dados que poderão contribuir para a formulação de outros estudos para a certificação da importância do ABR na fisiopatogenia da doença.

6- CONCLUSÕES
- 1. ABR apresentou elevados níveis de expressão em pacientes de LMC avaliados em fase crônica ao diagnóstico em relação a indivíduos controle.
- 2. A diminuição nos níveis de expressão do ABR parece correlacionar-se com o status de remissão dos pacientes analisados, conforme avaliado pela expressão do transcrito BCR-ABL por PCR quantitativo em tempo real, o que pode ser confirmado nos pacientes em remissão molecular ao transplante alogênico de medula óssea.
- 3. O método de qPCR padronizado mostrou-se preciso, sensível e reprodutível e confirmou os achados anteriores do nosso grupo.
- 4. A estratégia de normalização adotada neste trabalho foi útil para medidas acuradas dos níveis de expressão por qPCR, e mostrou-se adequada para estudar a relevância dos sinais biológicos de pequena intensidade, tais como os observados nas amostras com aumento de expressão menor que cinco.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ALI H, HEINRICH MC, LANGE T, KRAHL R, MUELLER M, MULLER C, NIEDERWIESER D, DRUKER BJ, WERNER M, DEININGER N. High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the PDGFR and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib. **Hematol. J.** 2004. 5(1): 55-60.

ALBERTO FL, COSTA FF. Avaliação do Transcriptoma da Leucemia Mielóide Crônica por ORESTES (Open Reading Frame Expression Sequence Tags). **Tese de doutorado.** Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, 2003.

APPLIED BIOSYSTEMS INC. User Bulletin # 2.

http://www.appliedbiosystems.com/suport. 2001.

BEDI A, ZEHNBAUER BA, BARBER JP, SHARKIS SJ, JONES RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. **Blood.** 83, 2038–2044, 1994.

BOGUSKI MS, MCCORMICK F. Proteins regulating Ras and its relatives. Nature. 366(6456):643-54, 1993.

BOURNE HR, WRISCHNIK L, KENYON C. Ras proteins. Some signal developments. **Nature.** 348 (6303): 678-9, 1990.

BRANFORD S, HUGHES TP, RUDZKI Z. Monitoring chronic myeloid leukemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. **Brit. Jour. Haematol.**, 107, 587-599.

BRANFORD S, RUDZKI Z, WALSH S *et al.* High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR-ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop Imatinib (STI571) resistance. **Blood,** v. 99, p. 3472-3475, 2002.

BRANFORD S, RUDZKI Z, WALSH S *et al.* Detection of BCR-ABL mutation in patients wih 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,** v. 102, p. 276-283, 2003.

CAMARGO AA, SAMAIA HP, DIAS-NETO E *et al.* The contribution of 700,000 ORFsequence tags to the definition of the human transcriptome. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA. 98(21): 12103-12108, 2001.

CAMPBELL LJ, PATSOURIS C, RAYEROUX, KC, SOMANA, K, JANUSZEWICZ EH, SZER J. BCR-ABL amplification in chronic myelocytic leukemia blast crisis following imatinib mesylate administration. **Cancer Genet. Cytogenet.** 139, 30–33, 2002.

CHOMCZINKI P e SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem**. 162(1): 156-159, 1987.

CHUANG TH, XU X, KAARTINEN V *et al.* Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 92(22): 10282-10286, 1995.

COLLINS S, COLEMAN H, GROUDINE M. Expression of bcr and BCR-ABL fusion transcripts in normal and leukemic cells. **Molec. and Cellular Biol.**, 7, 2870-2876, 1987.

COWAN-JACOB SW, GUEZ V, GRIFFIN JD, FABBRO D, FENDRICH G, FURET P, LIEBETANZ J, MESTAN J, MANLEY PW. BCR-ABL kinase muta tions and drug resistance to imatinib (STI571) in chronic myelogenous leu kemia. **Mini Rev. Med. Chem**. 4, 285–299, 2004.

DEININGER M W, GOLDMAN J M, LYDON N, MELO JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. **Blood**, v. 90, p. 3691-3698, 1997.

DIAO FY, XU M, HU Y, LI J, XU Z, LIN M, WANG L, ZHOU Y, ZHOU Z, LIU J, SHA J. The molecular characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS) ovary defined by human ovary cDNA microarray. **J. Mol. Endocrinol.** 33 (1): 59-72, 2004.

DOBLIN JA, GADELHA MIP. Mesilato de imatinibe para tratamento da Leucemia Mielóide Crônica. **Rev. Bras. Cancerol.** 48(3): 429-438, 2002.

DONATO NJ, WU JYJ *et al.* BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. **Blood**. 2003;101:690-698.

DRUKER BJ, TAMURA S, BUCHDUNGER E *et al.* Effects of a seletive inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells. **Nat. Med.**, v. 2, p. 561-566, 1996.

DRUKER BJ, LYDON NB. Lessons learned from the development of na abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. J. Clin. Invest. 105: 3-7, 2000.

DRUKER BJ. STI571 (Gleevec/Glivec[®], Imatinib) versus interferon (IFN) positivas cytarabine as initial therapy for patients with CML: results of a randomized study. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, v. 20, abstr 1, 2002.

FADERL S, TALPAZ M, ESTROV Z *et al*. The biology of chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med**. 341(3): 164-172,1999.

FISCHER T, REIFENRATH C, HESS GR *et al.* Safety and efficacy of STI-571 (imatinib mesylate) in patients with bcr/abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) after autologous peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT). **Leukemia**. 16: 1220-1228, 2002.

GAMBACORTI-PASSERINI CB, LE COUTRE P, MOLOGNI L *et al.* Inhibition of the Abl-kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL positivas leukemic cells and induces apoptosis. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 23, p. 380-394, 1997.

GAMBACORTI-PASSERINI CB, BUNGARO S, CAZZANIGA G *et al.* BCR-ABL amplification causes reversuble cytogenetic relapse and resistance to Imatinib (STI571) in a chronic phase CML patients. **Blood**, v. 100, p. 216a, abstr 4376, 2002.

GAMBACORTI-PASSERINI CB, ROSSI F, VERGA M *et al.* Differences between in vivo and in vitro sensitivy to Imatinib of Bcr/Abl positivas cells obtained from leukemic patients. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 28, p. 361-372, 2002.

GAMBACORTI-PASSERINI CB, GUNBY EH, PIAZZA R, GALIETTA A, ROSTAGNO R, SCAPOZZA L. Molecular mechanisms of resistence to Imatinib in Philadelphiachromosome-positive leukemias. **The Lancet Oncology**, v. 4 (2), p. 75-85, 2003.

GINZINGER DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experim. Hematol**, (30) 503-512, 2002.

GOLDMAN JM, DRUKER BJ. Chronic myeloid leukemia:current treatment options. **Blood**, v. 98, p. 2039-2042, 2001.

GOLDMAN JM, MELO JV. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.** 344: 1084-1086, 2001.

GORDON MY, DOWDING CR, RILEY GP, GOLDMAN JM, GREAVES MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of heamotopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. **Nature** 328, 342–344, 1987.

GORRE ME, MOHAMMED M, ELWOOD K. Clinical resistance to STI571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. **Science**, v. 293, p. 876-880, 2001.

GORRE ME, SHAH NP, ELLWOOD K. Roots of clinical resistance to STI571 cancer therapy. **Science**, v. 293, p. 2163a, abstr, 2001.

HEISTERKAMP N, MORRIS C, GROFFEN J. ABR, an active BCR-related gene. Nucleic Acids Res. 17: 8821-8831,1989.

HEISTERKAMP N, KAARTINEN V, VAN SOEST S *et al.* Human ABR encodes a protein with GAPrac activity and homology to the DBL nucleotide exchange factor domain. **J. Biol. Chem**. 268 (23):16903-6, 1993.

HOCHHAUS A, KREIL S, CORBIN AS, LA ROSEE P, MULLER MC, LAHAYE T, HANFSTEIN B, SCHOCH C, CROSS NC, BERGER U, GSCHAIDMEIER H, DRUKER BJ, HEHLMANN R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to Imatinib (STI571) therapy. **Leukemia**, (11):2190-6, 2002.

HOLYOAKE, DT. Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukaemia: lessons to be learned from the laboratory. **Br. J. Haematol.** 113: 11-23, 2001.

ICHIHARA E, COSTA FF, BUSOLI N, VIGORITO AC, DELAMAIN MT, LORAND-METZE I, SAAD STO, SOUZA CA, PAGNANO KBB. Mutações de ponto do gene BCR/ABL em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica resistentes ao mesilato de imatinib. *In*: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2004, São Paulo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26. p. 118-119, 2004. JAFFE ES, HARRIS NL, STEIN H, VARDIMAN JW. Eds. *World Health Organization*. **Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** 20-26, 2001.

KANTARJIAN H, TALPAZ M. Definition of the accelerated phase of chronic myelogenous leukemia. J. Clin. Oncol. 6, 180–182, 1988.

KANTARJIAN H, SAWYERS CL, HOCHHAUS A *et al.* Hematologic and cytogenetic responses to Imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. **N. Engl. J. Med.** (346): 645-652, 2002.

KATAN M, ALLEN VL. Modular PH and C2 domains in membrane attachment and other functions. **FEBS Lett.** 452(1-2):36-40,1999.

KOBAYASHI T, YAMAGUCHI M, KIM S, MORIKAWA J, OGAWA S, UENO S, SUH E, DOUGHERTY E, SHMULEVICH I, SHIKU H, ZHANG W. Microarray reveals differences in both tumors and vascular specific gene expression in de novo CD5+ and CD5- diffuse large B-cell lymphomas. **Cancer Res.** 63 (1): 60-6, 2003.

KOLIBABA KS, DRUKER BJ. Protein tyrosine kinases and cancer. **Biochim. Biophis.** Acta, 1333: 217-248, 1997.

KRUSE N, PETTE M, TOYKA K, RIECKMANN P. Quantification of cytokine mRNA expression by RT-PCR in samples of previously frozen blood. **Journal of Immunological Methods**.(210): 195–203, 1997.

LE COUTRE P, TASSI E, VARELLA-GARCIA M, BARNI R, MOLOGNI L, CABRITA G, MARCHESI E, SUPINO R, GAMBACORTI-PASSERINI C. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. **Blood.** 95, 1758–1766, 2000.

MAHON FX, DEININGER AWN, SCHULTHEIS B, CHABROL J, REIFFERS J, GLOLDMAN JM, MELO JV. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine knase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. **Blood**. (96), 3:1070-1079, 2000.

MAURO M J, O'DWYER M, HEINRICH MC, DRUKER BJ. STI571: a paradigm of new agents for cancer therapeutics. **J. Clin. Oncol**. v. 20, p. 325-334, 2002.

MCDONALD JD, DANESHVAR L, WILLERT JR *et al.* Physical mapping of chromossome 17p13.3 in the region of a putative tumor supressor gene important in medulloblastoma. **Genomics**. 23(1): 229-232, 1994.

MOREL F, BRIS MJ, HERRY A, CALVEZ GL, MARION V, ABGRALL JF, BERTHOU C, BRAEKELEER MD. Double minutes containing amplified BCR-ABL fusion gene in a case of chronic myeloid leukemia treated by imatinib. **Eur. J. Haematol.** 70, 235–239, 2003.

NAGAR B, BORNMANN WG, PELLICENA P *et al.* Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). **Cancer Research**. 62: 4236–43, 2002.

O'BRIEN SG, GUILHOT F, LARSON RA, GATHMANN I, BACCARANI M, CERVANTES F, CORNELISSEN JJ *et al.* Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. **N. Engl. J. Med.** (348): 994-1004, 2003.

OTTMANN OG, DRUKER BJ, SAWYERS CL. *et al.* A phase 2 study if Imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. **Blood**. (100): 1965-1971, 2002.

PATRICIO V, PAGNANO KBB, DELAMAIN MT, ROSSINI M, FATTORI A, LIMA CSP, DE SOUZA CA, LORAND-METZE I. Avaliação da resposta hematológica e citogenética com uso do Imatinib em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, agosto; 25, suplemento 2:1-189, p.163, resumo 539, 2003.

PUIL L, LIU J, GISH G, MBAMALU G, BOWTELL D, PELICCI PG, ARLINGHAUS R, PAWSON T. BCR-ABL oncoproteins bind directly to activators of the Ras signaling pathway. **EMBO J.** 13, 746–773, 1994.

REBECCHI MJ, SCARLATA S. Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** (27):503-28, 1998.

ROCHE-LESTIENNE CR, SOENEN-CORNU V, GRARDEL-DUFLOS N, JEAN-LUC LAÝ J, PHILIPPE N, FACON T, FENAUX P, PREUDHOMME C. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. **Blood.** (100): 3, 1014-1018, 2002.

SAMBROOK J, DAVID W, RUSSELL JS. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edition, 2001.

SAVAGE DG, ANTMAN KH. Imatinib Mesilate – A New Oral Targeted Therapy. N. Engl. J. Med. (346): 9, 683-693, 2002.

SAWYERS CL, HOCHHAUS A, FELDMAN E *et al.* Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: result of a phase II study. **Blood**. (99): 3530-3539, 2002.

SCHMITTGEN TD, ZAKRAJSEK BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J. Biochem. Biophys. Methods. 20; 46(1-2):69-81, 2000.

SHAH NP, NICOLL JM, NAGAR B, GORRE ME, PAQUETTE RL, KURYAN J, SAWYERS CL. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. **Cancer Cell.** (2), 117-125, 2002.

SHAH NP. Loss of Response to Imatinib: Mechanisms and Management. American Society of Hematology. **Hematol.**183-187, 2004.

SCHINDLER T, BORNMANN W, PELLICENA P et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. **Science**. (289): 1938-1942, 2000.

SURYANARAYANA K, WILTROUT TA, VASQUEZ GM, HIRSCH VM, LIFSON JD. Plasma SIV RNA viral load determination by real-time quantification of product generation in reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **AIDS Research and Human Retroviruses**. 14, (2): 183-189, 1998.

TALPAZ M, SILVER RT, DRUKER BJ *et al.* Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. **Blood**. (99): 1928-1937, 2002.

TAN EC, LEUNG T, MANSER E, LIM L. The human active breakpoint cluster region-related gene encodes a brain protein with homology to guanine nucleotide exchange proteins and GTPase-activating proteins. **J. Biol. Chem.** 268 (36): 27291-8, 1993.

VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, ROY NV, DE PAEPE A, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 3(7):research0034.1–0034.11, 2002.

WEISBERG E, GRIFFIN JD. Mechanism of resistance to the abl tyrosine kinase inhibitor sti571 in BCR-ABL-transformed hematopoietic cell lines. **Blood.** (95), 3498–3505, 2000.

WITTINGHOFER A, SCHEFFZEK K, AHMADIAN MR. The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. **FEBS Lett.** 410 (1): 63-7, 1997.

YAMAMOTO M, KAKIHANA K, KUROSU T, MURAKAMI N, MIURA O. Clonal evolution with inv(11)(p15q22) and NUP98/DDX10 fusion gene in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**(157):104-108, 2005.

ZIMMERMANN J, BUCHDUNGER E, METT H *et al.* Potent and selective inibitors of the Abl-kinase: phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives. **Bioorg. Méd. Chem. Lett**. (7): 187-192, 1997.

8- ANEXOS

Anexo 1- Termo de Consentimento Livre Esclarecido





CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DA UNICAMP TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, o Corpo Clínico deste Centro (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Por meio desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento.

Você está sendo admitido(a) neste Centro para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de LMC. Para fins de diagnóstico, fator prognóstico e/ou como parte de seu tratamento, há a necessidade da coleta de amostra de medula óssea, para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo.

O presente trabalho envolve o Estudo da Expressão do Gene ABR em Leucemia Mielóide Crônica (LMC), cuja pesquisadora responsável é Carolina Yaeko Namasu sob orientação do Prof. Dr. Fernando Lopes Alberto. Estes estudos são realizados em amostras de medula óssea e/ou sangue periférico de pacientes com diagnóstico de LMC.

As amostras serão coletadas exclusivamente no momento da punção diagnóstica. O restante do material biológico retirado e não utilizado será descartado, conforme Legislação Sanitária regulamentar sobre o assunto.

Os riscos a que os sujeitos participantes serão submetidos são mínimos, pois serão coletadas somente amostras de medula óssea.

O aspirado de medula óssea coletado de cada paciente será identificado no laboratório por um código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão sempre preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso do material para os fins acima descritos, é necessário esclarecê-lo(a) que não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu tratamento. Você tem o direito de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu tratamento.

Caso você ainda tenha questões a fazer sobre este Termo de Consentimento ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida, por gentileza, entre em contato com a Pesquisadora responsável, **Carolina Yaeko Namasu, pelos telefones:** (19)3788-8734/8611/8661, ou com o **Comitê de Ética em Pesquisa, pelo telefone:** (19)3788-8936. Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário. Somente assine este Termo se consentir.

DECLARACÃ O
Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e
concordando com todo o teor.
Campinas (SP),dede
• · · · ·
Responsável ou Paciente
Nome:
RG :
RGH :
KGH :