



VANESSA ALINE BERNUSSO

**“ESTUDO DA EXPRESSÃO E PARTICIPAÇÃO DE VASP E
ZYXIN NA DIFERENCIAÇÃO HEMATOPOIÉTICA, NA
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA E NA VIA DE
SINALIZAÇÃO BCR-ABL”**

Campinas

2013

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

VANESSA ALINE BERNUSSO

**“ESTUDO DA EXPRESSÃO E PARTICIPAÇÃO DE VASP E
ZYXIN NA DIFERENCIAÇÃO HEMATOPOIÉTICA, NA
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA E NA VIA DE
SINALIZAÇÃO BCR-ABL”**

Orientadora: Dra. Karin Spat Albino Barcellos Silveira

Co-orientadora: Dra Sara Teresinha Olalla Saad

Dissertação de Mestrado apresentada ao **Programa de Pós
Graduação em Fisiopatologia Médica** da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de **MESTRA EM CIÊNCIAS**.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA VANESSA ALINE BERNUSSO
E ORIENTADA PELA DRA. KARIN SPAT ALBINO BARCELLOS SILVEIRA

Assinatura do Orientador

Campinas

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B458e Bernusso, Vanessa Aline, 1980-
Estudo da expressão e participação de VASP e Zyxin na diferenciação hematopoética, na leucemia mieloide crônica e na via de sinalização BCR-ABL / Vanessa Aline Bernusso. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Karin Spat Albino Barcellos Silveira.
Coorientador : Sara Teresinha Olalla Saad.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia mieloide crônica. 2. Adesão celular. 3. Diferenciação megacariocítica. 4. VASP. 5. Zixina I. Barcellos, Karin Silveira. II. Saad, Sara Teresinha Olalla, 1956-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: VASP and Zyxin expression and participation in hematopoietic differentiation, in chronic myeloid leukemia and BCR-ABL signaling pathway

Palavras-chave em inglês:

Chronic myeloid leukemia

Cell adesion

Megakaryocytic differentiation

VASP

Zyxin

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Karin Spat Albino Barcellos Silveira [Orientador]

Mariana Lazarini

João Gustavo Pessini Amarante Mendes

Data da defesa: 02-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

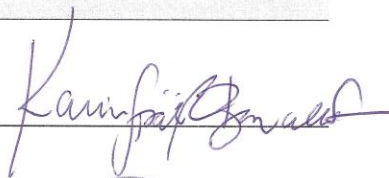
VANESSA ALINE BERNUSSO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). KARIN SPAT ALBINO BARCELLOS SILVEIRA

Co-orientador (a) PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD

MEMBROS:

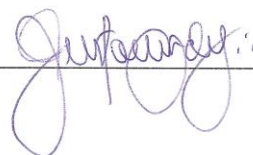
1. PROF(A). DR(A). KARIN SPAT ALBINO BARCELLOS SILVEIRA



2. PROF(A). DR(A). MARIANA LAZARINI



3. PROF(A). DR(A). JOÃO GUSTAVO PESSINI AMARANTE MENDES



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 02 de julho de 2013

Dedicatória

*Dedico este trabalho a todos que me apoiaram
e em especial aos meus pais por me fornecerem
a base para adquirir o conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos e amigos, pelo constante apoio, incentivo, carinho, amizade, compreensão, amor. Agradeço por compartilharem de minhas conquistas, dos momentos de incertezas e de alegria.

À minha orientadora Dra. Karin Barcellos pela oportunidade oferecida. Agradeço a sua compreensão, confiança e dedicação. Essa mesma orientadora é uma brilhante pesquisadora, mãe, esposa e empresária, sempre alegre, divertida e vendo o lado positivo de tudo e principalmente nessa fase final o seu apoio foi fundamental. Muito obrigada por tudo. Eu cresci muito profissionalmente e a finalização deste trabalho é mais uma conquista que compartilhamos juntas, fruto da sua orientação.

À Profa. Dra. Sara Saad pela co-orientação neste trabalho, disponibilidade e apoio em seu laboratório. Agradeço as oportunidades oferecidas e por fazer parte da minha formação.

Ao colaborador João, que teve grande participação na minha formação, pela constante presença e incentivo durante a realização deste trabalho. Agradeço a seus ensinamentos, na aprendizagem das técnicas, ajuda nos experimentos, análises e acima de tudo a sua amizade. Muito obrigada pela companhia alegre e extrovertida.

Ao colaborador e amigo Dr. Fernando pelo tempo disponibilizado para a realização do meu trabalho, ao classificar amostras de pacientes e pela amizade sincera.

Às pesquisadoras, Dra. Mariana Lazarini, Dra. Patrícia Favaro, Dra. Fabíola Traina e Dra. Letícia, pela disponibilidade de compartilhar ensinamentos e favores.

À equipe de trabalho que me auxiliou em diferentes momentos durante a realização deste trabalho: Adriana, Simone, Lena, Karla, Fernanda Niemann, Irene, Ana Leda, Luís Gustavo, Janine, Audrey, Dulcinéia, Patrícia, Raquel, Silvia, Michel (apoio didático), Regina (pós-graduação) e Tereza. Agradeço amizades carinhosas e sinceras realizadas com Adriana, Simone, Karla e Fernanda, fortalecidas com companheirismo e bom humor.

Aos amigos de trabalho, Matheus, João Kleber, Isabela, Andrana, Victor, Aline, Thiago, Paula, Rita, Cristiane, Bruna, Anamika, Flávia, Renata, Fernanda Roversi, Laure, Moisés e Juliana agradeço a oportunidade de compartilhar as experiências, o carinho e muitas risadas e também a oportunidade de fazer a amizade com vários alunos de outro departamento como Regiane, Tatiane, Renata, Flávia, Cintia e Telma.

Em especial à Gisele pela oportunidade de me apresentar à Karin e conviver comigo durante a faculdade e república em São Carlos. Obrigada pela confiança de acreditar no meu esforço e trabalho.

Agradeço ao Wagner por ter ficado sempre ao meu lado, me apoiando, me fortalecendo nos momentos mais difíceis e compartilhando também momentos alegres. Devo toda a ternura e merecimento do meu mestrado à sua companhia.

Aos pacientes, um agradecimento especial, pois sem eles este trabalho não teria sido idealizado e nem realizado. Torço sempre para possível melhora deles.

Às funcionárias da citogenética Maristela e Rose por disponibilizarem sobras de amostras de pacientes utilizadas por elas nas análises.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq e INCT do sangue.

Agradeço à Deus pela oportunidade de realizar este trabalho, de ter conhecido todas as pessoas aqui citadas, de me fazer enxergar a vida de outra forma e no final, sentir que essa vivência em laboratório foi de grande valia.

*“Os preceitos do Senhor são retos,
nos dá sabedoria e refrigera a alma”*

Novo Testamento.

RESUMO

VASP (*Vasodilator-stimulated phosphoprotein*) e Zyxin são proteínas reguladoras de actina que controlam a adesão célula-célula. Zyxin dirige a montagem da actina através da interação e recrutamento da VASP a sítios específicos da adesão. A fosforilação da VASP ou da Zyxin altera suas atividades nas junções aderentes. PKA fosforila VASP em serina 157, regulando, assim, importantes funções celulares de VASP. VASP interage com ABL e é substrato da oncoproteína BCR-ABL. A presença da proteína BCR-ABL promove a oncogênese em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) devido à ativação constitutiva da atividade tirosina quinase. Apesar de já descrita alteração da expressão de VASP e Zyxin em diferentes tumores epiteliais, o papel de VASP e Zyxin na LMC, na via de sinalização BCR-ABL e a participação destas proteínas na hematopoiese são desconhecidos. Desta maneira, demonstramos aqui ausência de p-VASP ser157 em células de medula óssea de pacientes com LMC, em contraste com a presença de p-VASP ser157 em doadores saudáveis. Pacientes com LMC em remissão, responsivos a inibidores de tirosina quinase, apresentam p-VASP ser157, enquanto os pacientes resistentes não expressam p-VASP ser157. Utilizando células K562 inibidas para VASP ou Zyxin, observamos que VASP e Zyxin modulam as proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-XL da via de sinalização do BCR-ABL. Em adição, células K562 silenciadas para a VASP apresentam diminuição na atividade de FAK y925 e demonstramos que VASP interage com FAK. A expressão de VASP e Zyxin e de suas formas ativas aumenta durante a diferenciação megacariocítica e a inibição de VASP implica em diminuição na expressão do marcador CD61. Identificamos no presente estudo a participação de VASP e Zyxin na via do BCR-ABL, regulando a expressão de proteínas efetoras anti-apoptóticas e,

também, na diferenciação megacariocítica. Desta maneira, a expressão alterada da atividade de VASP nos pacientes com LMC pode contribuir para a patogênese da doença, seja afetando a diferenciação celular ou a adesão das células leucêmicas.

ABSTRACT

VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) and Zyxin are actin regulatory proteins that control cell-cell adhesion. Zyxin directs actin assembly by interacting and recruiting VASP to specific sites of adhesion. The phosphorylation of VASP and Zyxin modifies their activity in cell-cell junctions. PKA phosphorylates VASP at serine 157 regulating VASP cellular functions. VASP interacts with ABL and VASP is a substrate of BCR-ABL oncoprotein. The presence of BCR-ABL protein drives oncogenesis in patients with chronic myeloid leukemia (CML) due to a constitutive activation of tyrosine kinase activity. It has been described an altered expression of VASP and Zyxin in different types of tumor; however the function of VASP and Zyxin in CML, in BCR-ABL pathway and in hematopoiesis remains unknown. We describe here the absence of p-VASP ser157 in CML bone marrow cells, in contrast to p-VASP ser157 expression in healthy donors. Patients responsive to tyrosine kinase inhibitors present p-VASP ser157, while resistant patients do not have p-VASP ser157. In K562 cells we observed that VASP and Zyxin modulate anti-apoptotic proteins BCL-2 and BCL-XL. VASP depletion in K562 cells decreases FAK y925 activity and VASP interacts with FAK. Expression of VASP, p-VASP, Zyxin and p-Zyxin increases during megakaryocyte differentiation and VASP inhibition affects this differentiation through reduced CD61 expression in VASP depleted cells. We identify here the participation of VASP and Zyxin in BCR-ABL pathway affecting anti-apoptotic proteins and, also, in megakaryocyte differentiation. Then, the altered expression of VASP activity in CML patients may contribute to CML pathogenesis, affecting cellular differentiation or leukemic cell adhesion.

LISTA DE ABREVIACÕES:

ABL	abelson tirosina quinase
AMPc	receptor de proteína A ou PKA
ATRA	all-trans retinoico
BAD - <i>BCL2</i>	associado à morte celular
BAX - <i>BCL2</i>	proteína x associada a Bcl-2
BCL2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i> , proteína inibidora de apoptose detectada primeiramente em linfomas de células B
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BCR	região ponto de quebra
BCR-ABL	fusão do gene <i>BCR</i> com o gene <i>ABL</i> ou <i>breakpoint cluster region-abelson</i>
CMSPIS	células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis
CRKL	<i>V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like</i>
Ct	ciclo de amplificação
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAc	DNA complementar
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Ena	<i>Enabled</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GAPDH	gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase
GMPc	receptor de proteínas G ou PKG
HE	Hemina
HU	Hydroxyurea
ITK	inibidores de tirosina quinase
JNK	<i>c-Jun NH(2)-terminal Kinase</i>
LLA	leucemia linfoide aguda
LMA	leucemia mieloide aguda

LMC	leucemia mieloide crônica
MTT	<i>Methylthiazoletetrazolium</i>
p-VASP ser157	fosfo-VASP ser157
P70S6K	<i>70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1</i>
PBS	phosphate buffer solution
PCRq	reação em cadeia da polimerase em tempo real
Ph	cromossomo Filadélfia ou <i>Philadelphia</i>
PI	iodeto de propídio
PKA	proteína quinase A
PKG	proteínas quinase G
PMA	phorbol-13 myristate-12 acetate
RCC	resposta citogenética completa
RCM	resposta citogenética menor
RCm	resposta citogenética mínima
RCP	resposta citogenética parcial
RHC	resposta hematológica completa
RMC	resposta molecular completa
RMM	resposta molecular maior
Rn	intensidade de fluorescência
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAm	RNA mensageiro
Ser	serina
SFB	soro fetal bovino
shRNA	<i>short harpin RNA</i>
STATs	<i>signal transducers and activators of transcription</i> : moléculas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição
Tyr	tirosina
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela I.	Critérios Diagnósticos da Fase Acelerada da Leucemia Mieloide Crônica.....	36
Tabela II.	Critérios Diagnósticos da Crise Blástica da Leucemia Mieloide Crônica.....	36
Tabela III.	Tipos de Respostas ao Tratamento de Pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.....	37
Tabela IV.	Concentração e Sequência dos Iniciadores para Amplificação Gênica de <i>VASP</i> , <i>Zyxin</i> e <i>HPRT</i>	51
Tabela V.	Descrição das Linhagens Celulares Leucêmicas.....	61
Tabela VI.	Caracterização Clínica dos Pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Representação da proteína VASP e de seus domínios. VASP apresenta domínio EVH1, região central rica em prolina e domínio EVH2.....	29
Figura 02.	Representação da proteína Zyxin e de seus domínios. Zyxin apresenta domínio rico em prolina próximo à região amino-terminal e três domínios LIM próximos à região carboxi-terminal.....	31
Figura 03.	Representação esquemática da via de sinalização do BCR-ABL, dividida de forma resumida em três partes: proliferação/diferenciação, apoptose e adesão.....	35
Figura 04.	Amplificação de <i>VASP</i> (A) e <i>Zyxin</i> (B) por PCRq, respectivamente. O eixo vertical indica a intensidade de fluorescência (ΔRn) e o eixo horizontal indica ciclos de amplificação do gene.....	50
Figura 05.	Curvas de eficiência de <i>VASP</i> a 150nM (A) e <i>Zyxin</i> a 300nM (B). O eixo vertical indica o Ct e o eixo horizontal a concentração do DNAC utilizado. Todos os iniciadores apresentaram 100% de eficiência.....	50
Figura 06.	Expressão gênica de <i>VASP</i> (A) e <i>Zyxin</i> (B) em células hematopoiéticas de indivíduos saudáveis, em linhagens leucêmicas mieloides e linfoides. O eixo vertical representa a expressão relativa do RNAm normalizada pelo endógeno <i>HPRT</i> e o eixo horizontal representa as diferentes linhagens celulares. (C) Expressão proteica de VASP e Zyxin em células hematopoiéticas de indivíduos saudáveis, em linhagens mioide e linfóide. A amostra calibradora foi a linhagem celular HEL. Representativo de três experimentos independentes.....	63
Figura 07.	(A) Imagens de confocal mostram a localização de VASP (verde), Zyxin (branco), Actina (vermelho) e Dapi (azul) nas células K562, HEL e Jurkat. MERGE representa a sobreposição de imagens. Representativo de três experimentos independentes.....	64
Figura 08.	(A) Análise por <i>Western blotting</i> da expressão de p-VASP ser157 e VASP em pacientes com leucemia mioide crônica (LMC) ao diagnóstico, em remissão e resistentes a inibidores de tirosina quinase (ITK). As amostras 6 e 7 são do mesmo paciente em diferentes estágios da doença: ao diagnóstico e em remissão, respectivamente. A marcação com ponceau indica a quantidade de proteína em cada poço. (B) e (C) <i>Western blotting</i> demonstrando a expressão de p-VASP157 em pacientes LMC ao diagnóstico e em diferentes subtipos de remissão. A expressão de p-Zyxin não variou entre as amostras e indica a quantidade de proteína em cada poço. Na figura, pacientes responsivos ao tratamento apresentaram remissão hematológica completa (RHC), remissão citogenética parcial (RCP), remissão citogenética completa (RCC), remissão molecular maior (RMM) e remissão molecular completa (RMC).....	67
Figura 09.	(A) <i>Western blotting</i> usando o anticorpo anti-p-VASP ser157 e anti-VASP em células K562 tratadas com imatinibe por 3 e 6 horas. (B) Extrato total de células K562 tratadas com imatinibe foi submetido à imunoprecipitação (IP) com o anticorpo anti-VASP e, em seguida, analisado por <i>western blotting</i> usando anticorpo anti-ABL e anti-VASP.....	68

Figura 10.	Análise da expressão de VASP por PCRq (A) e <i>western blotting</i> (B) em células K562 transduzidas com lentivírus mediado shRNA controle e lentivírus mediado shRNA VASP . Análise da expressão de Zyxin por PCRq (A) e <i>western blotting</i> (B) em células K562 transduzidas com lentivírus mediado shRNA controle e lentivírus mediado shRNA Zyxin. Os gráficos de barras representam a média±DP e os anticorpos usados para o <i>imunoblotting</i> (IB) são indicados.....	69
Figura 11.	(A e B) e (C e D) Análise da apoptose por citometria de fluxo em células controle e inibidas para VASP e Zyxin, respectivamente, incubadas na ausência ou presença de imatinibe (0,1; 0,5 e 1µM por 48 horas), utilizando marcação com anexina-V e PI. (A) e (C) O quadrante inferior indica a porcentagem de células apoptóticas. (B) e (D) Os gráficos de barras representam a média±DP. Representativo de três experimentos independentes. Teste <i>Two-Way Anova</i> e pós-teste <i>Bonferroni</i> . (E) Diagrama simplificado representando a via de sinalização BCR-ABL e proteínas apoptóticas efectoras. (F) Análise de <i>Western Blotting</i> de extratos proteicos de células shControle, shVASP e shZyxin para avaliação da expressão de BCL-2, BCL-XL p-BAD, BAX e BAK; as membranas foram re-incubadas com o anticorpo para detecção da proteína total respectiva ou da actina como controle.....	71
Figura 12.	(A) e (B) Proliferação celular analisada por MTT depois de 48 horas de incubação de células shControle ou shVASP e shZyxin, respectivamente, tratadas e não tratadas com imatinibe (0,1; 0,5 ou 1 µM). Os valores normalizados pelas células shControle. Os resultados são apresentados como média±DP de seis replicatas e é representativo de três experimentos independentes. (C) e (D) colônias viáveis foram detectadas por MTT depois de oito dias de incubação de células shControle ou shVASP e shZyxin, respectivamente, tratadas e não tratadas com imatinibe (0.1; 0.5 or 1 µM) e valores normalizados pelas células shControle não tratadas. Os resultados são apresentados como média±DP e são representativos de três experimentos independentes. Teste <i>Two-Way Anova</i> e pós-teste <i>Bonferroni</i> . (E) Representação da via de sinalização BCR-ABL para a proliferação e diferenciação celular. (F) Análise de <i>Western Blotting</i> de extratos proteicos de células shControle, shVASP e shZyxin para avaliação da expressão de p-JNK, p-ERK, p-STAT5 e p-70S6K em células K562. As membranas contendo o extrato proteico foram re-incubadas com o anticorpo total para detecção da proteína.....	73
Figura 13.	(A) Representação das proteínas de adesão celular da via de sinalização BCR-ABL. (B) Análise por <i>western blotting</i> de extrato celular shControle ou shVASP e shZyxin para p-FAK y925, p-FAK y397, p-FAK y576+577, p-FAK y861, FAK, p-p130 CAS, p130CAS, p-CRKL e CRKL. (C) <i>Western blotting</i> do imunoprecipitado de VASP e Zyxin e marcação com anticorpos anti-VASP, anti-Zyxin e anti-FAK. Os resultados demonstram interação de VASP e FAK e, também, que VASP não interage com Zyxin em células K562.....	74
Figura 14.	Análise de <i>western-blotting</i> de extrato celular shControle ou shVASP e shZyxin utilizando anticorpos anti-p-STAT3 y705 e anti-STAT3.....	75

Figura 15.	Análise da expressão gênica e proteica de VASP e Zyxin em modelos celulares para a diferenciação eritroide (A-C), granulocítica (D-F) e megacariocítica (G-I). Células não diferenciadas para eritrócitos são representadas por -HU+HE e diferenciadas por +HU+HE, as não diferenciadas para granulócito são representadas por -ATRA e diferenciadas por +ATRA e as não diferenciadas para megacariócitos por -PMA e as diferenciadas por +PMA. Os gráficos de barras representam a média±DP; representativo de três experimentos independentes. O Valor de <i>P</i> está indicado na Figura, análise Teste t de <i>Student</i>	76
Figura 16.	Análise de <i>Western blotting</i> apresentando a expressão de p-VASP ser157, VASP, p-Zyxin ser142 e Zyxin durante diferenciação megacariocítica de células K562 (A) e HEL (B). Os dias de indução de diferenciação e as linhagens celulares estão indicados na Figura. As membranas foram re-blotadas com anti-Actina como controle.....	77
Figura 17.	(A) e (B) Porcentagem da população CD61 em células K562 shControle ou shVASP e shZyxin, respectivamente, durante a diferenciação megacariocítica. (C) Análise da expressão gênica de <i>Zyxin</i> em células shZyxin ao longo da diferenciação megacariocítica. Os resultados são apresentados como média±DP e é representativo de três experimentos independentes. Teste <i>Two-Way Anova</i> e pós-teste <i>Bonferroni</i>	79
Figura 18.	(A) Em células BCR-ABL positivas, VASP não fosforilada está associada ao BCR-ABL e não participa da adesão celular. (B) O tratamento com inibidores de tirosina quinase (ITK) resulta em aumento de PKA e consequente fosforilação de VASP em ser157. (C) Essa fosforilação induz a dissociação da VASP do complexo BCR-ABL. (D) Sem estar ligada ao ABL, VASP vai atuar na adesão celular.....	85

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ix
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xvii
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE FIGURAS.....	xxi
SUMÁRIO.....	xxv
INTRODUÇÃO.....	27
VASP- Vasodilator-stimulated phosphoprotein.....	29
Zyxin.....	30
VASP, Zyxin e Neoplasias.....	32
Leucemia Mieloide Crônica.....	34
VASP e BCR-ABL.....	38
PKA e p-VASP ser157.....	39
STAT3 e LMC.....	39
OBJETIVOS.....	41
Objetivo Geral.....	43
Objetivos Específicos.....	43
METODOLOGIA.....	45
Pacientes.....	47
Cultura de células e imatinibe.....	47
Extração do RNA total.....	47
Tratamento do RNA total com DNase I.....	48
Transcrição em DNAc.....	48
PCR quantitativo (PCRq).....	49
Padronização e curva de eficiência de VASP e Zyxin para PCRq.....	49
Transdução de lentivírus.....	51
Extração de proteína.....	52
Imunoprecipitado/Western blotting.....	52
Diferenciação celular.....	54
Deprivação de soro.....	55
Ensaio de proliferação.....	55
Ensaio de crescimento clonal.....	55
Avaliação de apoptose por marcação com anexina-Ve PI.....	56
Imunofluorescência.....	56
Análise estatística.....	57

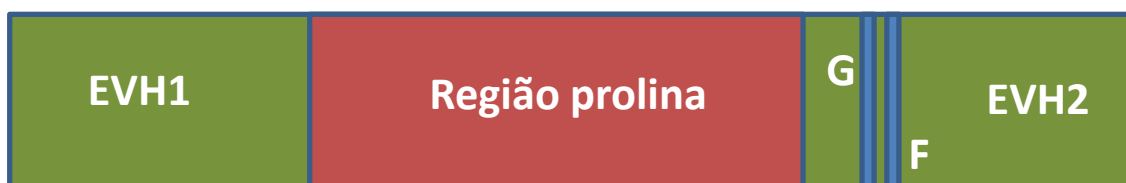
RESULTADOS.....	59
1. Expressão gênica de VASP e Zyxin em linhagens leucêmicas.....	61
2. Expressão de VASP em pacientes com LMC.....	64
3. P-VASP ser157 e BCR-ABL.....	68
4. Papel de VASP e Zyxin na via BCR-ABL.....	69
4.1 Silenciamento de VASP e Zyxin em células K562.....	69
4.2 Efeito do silenciamento de VASP e Zyxin na apoptose em células K562.....	70
4.3 Proliferação celular e crescimento clonal de células com inibição de VASP e Zyxin.....	72
4.4 Efeito do silenciamento de VASP e Zyxin na adesão celular.....	74
4.5 STAT3 e células silenciadas para VASP e Zyxin.....	75
5. Expressão gênica e proteica de VASP e Zyxin ao longo da diferenciação celular.....	75
5.1 Expressão de VASP e Zyxin ao longo da diferenciação megacariocítica.....	77
5.2 Efeito do silenciamento de VASP e Zyxin na diferenciação de megacariócitos.....	78
DISCUSSÃO.....	81
CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS.....	93
Anexo I.....	100
Anexo II.....	103
Anexo III –Artigo.....	104

INTRODUÇÃO

O citoesqueleto celular é constituído por uma complexa rede de filamentos proteicos que se prolongam pelo citoplasma em todas as células eucarióticas, compreendendo os filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos. A principal proteína do citoesqueleto, na maioria das células, é a actina (quando polimerizada forma os filamentos de actina). As proteínas do citoesqueleto celular exercem as mais variadas funções como mobilidade, adesão, manutenção do formato celular [1], transporte de vesículas, divisão do ciclo celular e controle nos sinais de diferenciação [2]. Uma série de doenças oncológicas tem sido relacionada a alterações em proteínas citoesqueléticas.

VASP- Vasodilator-stimulated phosphoprotein

VASP é uma proteína reguladora de actina que se localiza nas junções celulares, faz parte da família Ena/VASP e regula a adesão célula-célula [3]. Os membros da família Ena/VASP contêm estruturas conservadas como o domínio EVH1 na região N-terminal (amino-terminal), a região central rica em prolina e o domínio EVH2 na região C-terminal (carboxi-terminal) [4] [5]. A representação da proteína VASP está ilustrada na Figura 1.



380aa – 46kDa

Figura 1. Representação da proteína VASP e de seus domínios. VASP apresenta domínio EVH1, região central rica em prolina e domínio EVH2.

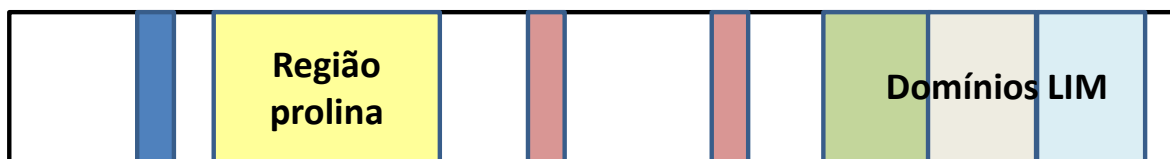
O domínio EVH1 se associa a outras proteínas que contém sequências específicas ricas em prolina (FPPPP) e direcionam as proteínas Ena/VASP para as adesões focais. A

região central da proteína com o domínio rico em prolina liga-se a domínios SH3 e WW de outras proteínas [4] [5]. O domínio EVH2 das proteínas Ena/VASP controlam a polimerização dos filamentos de actina G e F através de uma estrutura tetrâmera [6]. Regiões ricas em prolina normalmente aparecem em proteínas envolvidas na montagem e desmontagem de actina, principalmente em situações onde o citoesqueleto sofre mudanças rápidas como em locais de adesão celular [7], proliferação e diferenciação [3] [6] [7].

VASP está associada à formação da actina filamentosa e desempenha papel na adesão celular e mobilidade, VASP está envolvida nas vias de sinalização intracelular que regulam interações entre integrinas e matriz extracelular [8] e participa, também, de processos de ativação e agregação de plaquetas [9]. VASP contém três sítios de fosforilação: ser-157, ser-239 e thr-278. Proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e proteína quinase dependente de GMPc (PKG) estão envolvidas na fosforilação da VASP [10] [11]. Foi observado que a fosforilação da VASP gera mudança em sua estrutura molecular, regulando a interação com actina e alterando sua atividade na adesão celular [11].

Zyxin

Zyxin é uma proteína que se concentra nas adesões focais e ao longo do citoesqueleto de actina [12]. Zyxin tem um domínio N-terminal rico em prolina e três domínios LIM na sua metade C-terminal. O domínio rico em prolina pode interagir com domínios SH3 de proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal, enquanto os domínios LIM provavelmente estão envolvidos em interação proteína-proteína [13]. Representação da proteína Zyxin está ilustrada na Figura 2.



572aa – 82kDa

Figura 2. Representação da proteína Zyxin e de seus domínios. Zyxin apresenta domínio rico em prolina próximo à região amino-terminal e três domínios LIM próximos à região carboxi-terminal.

Zyxin pode funcionar como um mensageiro da via de transdução de sinal que medeia alterações na expressão gênica estimuladas pela adesão e pode modular a organização do citoesqueleto de feixes de actina [14]. Zyxin dirige a montagem da actina através do recrutamento de VASP a sítios específicos de adesão, o domínio EVH1 da VASP interage com a região rica em prolina da Zyxin ou através do domínio LIM [15] [16]. Proteínas contendo região rica em prolina, tal como Zyxin, são necessárias para a localização de VASP nos contatos célula-célula [15] [17]. Assim, Zyxin provavelmente altera adesão celular se ligando a VASP.

VASP e Zyxin atuam como um complexo de proteínas envolvido na transdução de sinal para a polimerização da actina, no controle de divisão celular e formação e manutenção das junções aderentes [18] [19]. Zyxin pode ser fosforilada em ser142 e essa fosforilação pode resultar em alterações da atividade de Zyxin nos contatos célula-célula [20]. A interação de Zyxin com a VASP pode, também, bloquear a atividade e a fosforilação de VASP [11].

Zyxin é expressa em altos níveis em tecidos mecano-sensíveis como bexiga, pulmão e vascular, indicando que Zyxin desempenha um papel fundamental na resposta ao estresse mecânico, devido a um rearranjo na dinâmica do citoesqueleto de actina [21].

VASP, Zyxin e Neoplasias

Uma série de pesquisas tem se concentrado na expressão de genes envolvidos no câncer, que é a causa mais frequente de morbidade e mortalidade populacional. Quando o câncer invade o tecido ou gera a metástase, várias etapas estão envolvidas, como a dissociação do tumor primário no estroma circundante e sua invasão para o sistema vascular [22]. Durante essas etapas, o carcinoma invasivo adquire caráter migratório associado à alteração da expressão de vários genes, os quais, inclusive, regulam a polimerização da actina [23] [24]. Portanto, é fundamental a compreensão da expressão dos genes que regulam a polimerização de actina na migração celular.

Pesquisar os mecanismos moleculares relativos à remodelação da actina é necessário para compreender como as células regulam a adesão, migração e invasão, desta maneira, as proteínas associadas à actina foram estudadas mais detalhadamente nos últimos anos [25]. As proteínas de adesão têm importante participação na manutenção da integridade tecidual, proliferação e diferenciação, assim, a perda da sua função possibilita o desenvolvimento tumoral, com frequência células tumorais têm um comportamento alterado na expressão das proteínas de adesão [26].

Alterações no citoesqueleto de actina podem causar transformação maligna do tecido e progressão tumoral [27]. Estudos demonstraram aumento da expressão da VASP em câncer de pulmão [28] e câncer de mama [29]. VASP é pouco expressa em linhagens de células de câncer de mama com morfologia epitelial pouco invasiva, no entanto, está super expressa em células altamente invasivas, indicando um possível papel de VASP na progressão tumoral em neoplasias malignas [29].

Além disso, foi estudado por *Tao* e colaboradores [30] a localização da VASP fosforilada (p-VASP ser157) em células de câncer de estômago durante a mitose. A

localização de p-VASP muda de acordo com os diferentes estágios do ciclo celular. Na intérfase p-VASP foi detectada no citoplasma, já no estágio da prófase à telófase, a p-VASP foi localizada sobre o fuso mitótico, o que sugere sua participação na divisão celular. A perda da função das proteínas de adesão celular interrompe a regulação do ciclo celular normal, possivelmente levando ao desenvolvimento tumoral.

Em tecido carcinogênico de bexiga, Zyxin apresentou expressão reduzida em tumor invasivo em relação ao tumor superficial, indicando potencial função supressora na progressão do tumor; essa expressão reduzida pode estar relacionada com aumento da diferenciação e mobilidade celular [31]. Entretanto, Zyxin está mais expressa em carcinoma hepatocelular [32] e melanoma [33]. Os autores sugerem que Zyxin aumenta a migração e invasão celular em carcinoma hepatocelular através de sua ação no citoesqueleto de actina [32].

Em 2005, *Wang* e colaboradores [34] publicaram um resultado de microarranjos de DNA comparando diversos genes em dois tipos de leucemia: leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA). Foi observada diminuição na expressão de Zyxin nas amostras dos pacientes com LLA quando comparada às amostras de pacientes com LMA. Os autores identificaram que Zyxin apresentava o mais significativo traço para classificação e recomendaram futuras investigações do papel de Zyxin em leucemia.

Desta maneira, tem sido demonstrado que alterações da expressão das proteínas VASP e Zyxin podem estar relacionadas com o crescimento de células tumorais e de sua progressão maligna. Entretanto, ainda é desconhecida a participação e expressão de VASP e Zyxin na hematopoiese e em desordens hematológicas.

Leucemia Mieloide Crônica

Leucemia mieloide crônica (LMC) é uma desordem hematológica resultante de uma neoplasia mieloproliferativa clonal da célula-tronco da medula óssea. É caracterizada por aberração citogenética ocasionada por translocação entre os cromossomos 9 e 22; t(9;22), resultando em um cromossomo 22 mais encurtado, chamado de cromossomo Filadélfia (Ph). O gene BCR do cromossomo 22 se funde ao gene ABL do cromossomo 9, formando um cromossomo alterado que codifica a proteína de fusão BCR-ABL (*breakpoint cluster region-abelson*). O ponto de quebra no gene BCR mais comum na LMC e o produto da fusão resultam em uma proteína de 210 kDa [35] [36]. A confirmação do diagnóstico de pacientes com LMC é obtido pela identificação do cromossomo Ph e/ou pela presença da proteína BCR-ABL em sangue periférico ou em medula óssea [35].

A proteína ABL possui domínio capaz de adicionar grupos fosfatos aos resíduos de tirosina, o produto da fusão BCR-ABL possui atividade tirosina quinase constitutivamente ativa [35]. Esforços significativos estão sendo realizados para a compreensão dos mecanismos moleculares da ação do BCR-ABL através da identificação das vias de sinalização que são afetadas pela sua atividade tirosina quinase. Inúmeros substratos e ligantes de BCR-ABL têm sido identificados e os esforços atuais estão dirigidos para a investigação dos defeitos patológicos específicos que caracterizam a LMC [37].

A proteína BCR-ABL ativa uma cascata de proteínas que aceleram a divisão celular, inibem a apoptose e a reparação do DNA celular, causando instabilidade genômica ao aumentar a mutagenicidade; sendo estes, provavelmente, os responsáveis pela progressão da doença [38]. Além disso, a proteína BCR-ABL interage com proteínas do citoesqueleto e as fosforilam, promovendo aumento da mobilidade, redução da adesão celular e prejudicando a transmissão de sinais regulatórios pelo citoesqueleto [39]. De maneira

resumida, a via BCR-ABL pode ser dividida em três partes: proliferação/diferenciação, apoptose e adesão. As proteínas efetoras da via de proliferação/diferenciação são JNK, ERK, STAT5 e P70S6K; as proteínas efetoras da apoptose são BAD, BAX, BAK, BCL-2 e BCL-XL; e as efetoras da adesão são CAS, FAK e CRKL [40] [41]. A Figura 3 ilustra de maneira resumida a via de sinalização BCR-ABL.

Via de sinalização BCR-ABL

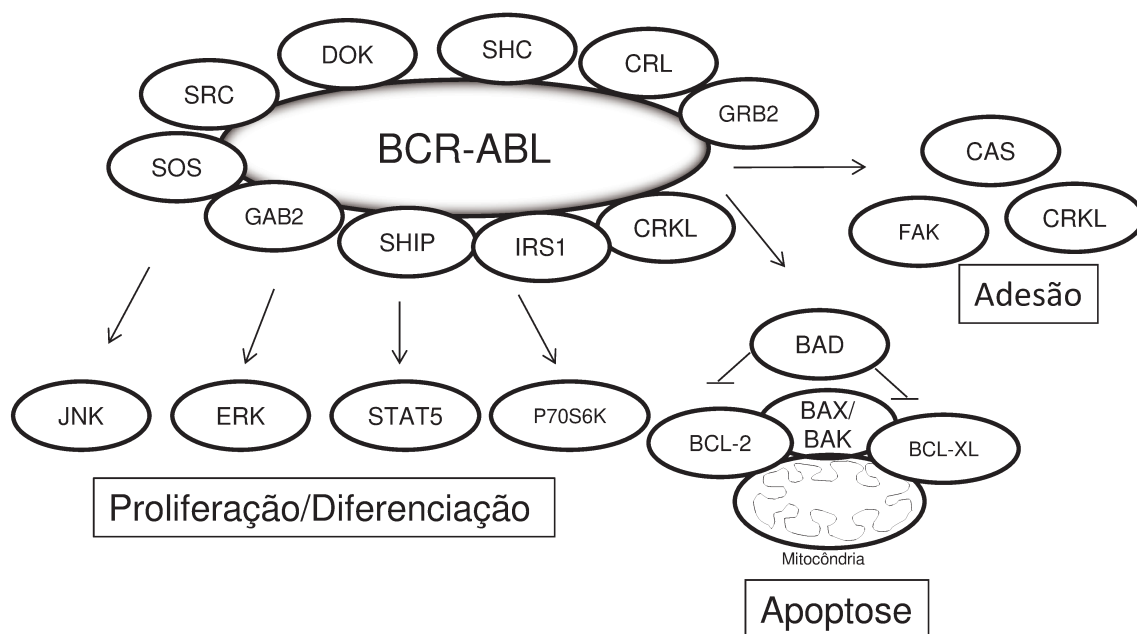


Figura 3. Representação esquemática da via de sinalização do BCR-ABL, dividida de forma resumida em três partes: proliferação/diferenciação, apoptose e adesão (modificado: [40] [41]).

A LMC é uma doença bifásica ou trifásica, constituída por uma fase inicial chamada de fase crônica que pode evoluir espontaneamente para a crise blástica com ou sem uma fase intermediária, denominada de fase acelerada. A fase crônica é caracterizada pela hiperplasia da medula, com o aumento do número de células mieloides circulantes, porém são minimamente invasivas, localizadas mais em tecidos hematopoiéticos. A progressão

para a fase acelerada e crise blástica está associada ao aumento da invasão de células imaturas que podem estar localizadas em tecidos não hematopoiéticos [42]. Os critérios utilizados para identificação das fases dos pacientes estão indicados nas Tabelas I e II [43].

Tabela I. Critérios Diagnósticos da Fase Acelerada da Leucemia Mieloide Crônica.

Persistência ou aumento da leucometria $> 10.000/\mu\text{L}$ e/ou esplenomegalia persistente ou aumentada não responsiva a terapia
Trombose persistente $> 1.000.000/\mu\text{L}$, não responsiva a tratamento
Trombocitopenia persistente, $< 100.000/\mu\text{L}$, não relacionada à terapia
Evolução citogenética clonal (aparecimento de anomalias cromossômicas adicionadas ao cromossomo Filadélfia)
Basófilos $\geq 20\%$ no sangue periférico
Presença de 10% a 19% de blastos no sangue periférico ou na medula óssea

Tabela II. Critérios Diagnósticos da Crise Blástica da Leucemia Mieloide Crônica.

Contagem de Blastos $\geq 20\%$ no sangue periférico ou na medula óssea
Presença de infiltrados extramedulares (sarcoma mieloide, denominado também de sarcoma granulocítico ou cloroma)

Pacientes responsivos ao tratamento são considerados pacientes em remissão e sua resposta é avaliada por diversos critérios indicados na Tabela III. A resposta hematológica completa constitui o desaparecimento dos sintomas, da esplenomegalia e a normalização do hemograma. A resposta citogenética é estabelecida conforme a porcentagem de células Ph residuais na medula óssea. A resposta molecular é estabelecida de acordo com a quantificação de transcritos BCR-ABL por PCR em tempo real [44].

Tabela III. Tipos de Respostas ao Tratamento de Pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.

Hematológica	
Completa (RHC)	Normalização do sangue periférico com leucometria $<10.000/\mu\text{L}$; plaquetas $< 450.000/\mu\text{L}$ Ausência de células imaturas, mielócitos, promielócitos ou blastos no sangue periférico Ausência de sinais e sintomas da doença com desaparecimento do baço palpável
Citogenética	
Completa (RCC)	Ausência de Ph
Parcial (RCP)	1 a 35% de metáfases com Ph
Menor (RCM)	36% a 65% de metáfases com Ph
Mínima (RCm)	66% a 95% de metáfases com Ph
Nenhuma	$> 95\%$ de metáfases com Ph
Molecular	
Completa (RMC)	Ausência de transcritos BCR-ABL
Maior (RMM)	Redução RNAm BCR/ABL $> 3 \log$

No final da década de 90 foi publicada uma diretriz para o tratamento da LMC utilizando quimioterapia convencional, alfa-interferon e transplante alogênico de células hematopoiéticas [45]. Com o aumento do conhecimento da natureza da proteína BCR-ABL, medicamentos têm sido desenvolvidos com especificidade inibidora da tirosina quinase (ITK) da proteína BCR-ABL [46]. Assim surgiu uma nova classe de medicamento com ação ITK, o mesilato de Imatinibe (Gleevec/Glivec, STI571, Novartis, Basel, Suíça), que mudou completamente a abordagem terapêutica dessa doença e tornou-se a primeira opção terapêutica para pacientes em fase crônica da LMC [46]. Mesilato de Imatinibe induz à parada da proliferação e a apoptose das células leucêmicas [47] [48], sendo o principal

objetivo no tratamento de LMC eliminar o clone de células BCR-ABL positivas e levar à remissão completa dos pacientes [49]. Entretanto, o desenvolvimento de resistência ao imatinibe tem emergido como um problema importante a ser estudado em pacientes com LMC, que na sua maioria se deve à aquisição de mutações no domínio quinase de BCR-ABL [50] [51]. Diferentes estratégias têm sido implementadas para superar essa resistência por meio de outras drogas ITK como dasatinibe, nilotinibe, bosutinibe, porém a resistência persiste em alguns pacientes com células residuais leucêmicas resistentes quiescentes na medula óssea [52].

VASP e BCR-ABL

A sinalização pela proteína ABL desempenha papel fundamental no desenvolvimento normal, considerando que a sua ativação inapropriada ajuda a desencadear o desenvolvimento de várias formas de leucemia. Vários potenciais efetores permitem as quinases ABL modularem a atividade do citoesqueleto, incluindo p190RhoGap, Abi e N-WASP. Em drosófila, Enabled (Ena), membro da família Ena/VASP de reguladores de actina, é alvo da proteína quinase Abl. Proteínas Ena/Vasp regulam a polimerização da actina, Abl regula a localização intracelular de VASP e fosforila VASP. Em mamíferos os homólogos de Ena, que são Mena e VASP, também são alvos da proteína ABL [53]. Os mecanismos bioquímicos pelos quais ABL regula a função das proteínas Mena/VASP ainda precisam ser elucidados em mamíferos [53]. Um recente estudo de fosfoproteoma demonstrou que a VASP é fosforilada em tirosina nas células BCR-ABL positivas [54]. Um estudo recente descreveu que VASP é fosforilada em tirosina no sítio 39 em células leucêmicas BCR-ABL positivas, esta fosforilação diminui a afinidade da VASP

com a região rica em prolina da Zyxin [55]. No entanto, não é bem compreendida a função de VASP e Zyxin na via de sinalização BCR-ABL e a sua participação na LMC.

PKA e p-VASP ser157

PKA induz a fosforilação da VASP em serina 157 e essa fosforilação pode mediar sua ligação à Zyxin e regular a interação de VASP com outras proteínas [17]. Sabe-se que a fosforilação de VASP por PKA possibilita a localização de VASP nas junções célula-célula modulando a adesão e mobilidade celular [56] [57]. A p-VASP ser157 atua como importante interruptor regulador da formação dos filamentos de actina, a ativação de PKA diminui a ligação da VASP à actina F, suprimindo a polimerização de actina [11]. Além disso, a adesão célula/matriz e a interação VASP-ABL é regulada por PKA [58] [59].

STAT3 e LMC

STAT3 é um transdutor de sinal e ativador de transcrição [60]. O aumento da ativação de STAT3 tem sido associado com transformação de células cancerígenas malignas e de tumores resistentes a drogas [61]. Células K562 resistentes a ITK e células de pacientes em crise blástica apresentaram aumento de fosforilação constitutiva de STAT3 em tyr705 [61], mas os mecanismos que levam a isso ainda são desconhecidos. Acredita-se que a ativação de STAT3 pode ter um papel crítico na progressão da doença e talvez possa contribuir para a sobrevivência residual de células tronco leucêmicas, mesmo no caso de uma inibição completa do BCR-ABL [60], como pacientes que reincidiram após o tratamento.

Desta maneira, a oncoproteína BCR-ABL induz múltiplas anormalidades na função do citoesqueleto, alterando a atividade das proteínas citoesqueléticas e a reorganização de actina. A via BCR-ABL atua em diversos processos celulares, como mobilidade celular, divisão celular, diferenciação celular, apoptose e estabelecimento e manutenção da adesão celular [62]. As funções de VASP e Zyxin já foram descritas em diversos tumores epiteliais, porém pouco se sabe sobre o envolvimento delas em doenças hematopoiéticas. Sabendo-se da interação entre VASP e BCR-ABL, observamos a importância de estudar a expressão de VASP e Zyxin em pacientes com LMC, a função destas proteínas na via BCR-ABL e a participação de VASP e Zyxin na diferenciação celular.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar a expressão de VASP e Zyxin em células de medula óssea de pacientes com LMC e observar a participação destas proteínas na diferenciação hematopoiética e na via de sinalização BCR-ABL.

Objetivos específicos

- Caracterizar a expressão de VASP e Zyxin em linhagens leucêmicas.
- Analisar a expressão proteica de VASP e Zyxin em pacientes com LMC.
- Analisar o envolvimento da VASP e Zyxin com as proteínas efetoras da via BCR-ABL.
- Estudar o efeito da inibição de VASP e Zyxin na apoptose, proliferação e crescimento clonal de células hematopoiéticas.
- Avaliar a participação da VASP e Zyxin na diferenciação de células hematopoiéticas.

METODOLOGIA

Pacientes

Células totais de medula óssea foram coletadas e submetidas à lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio. Estas mesmas células foram submetidas à extração de proteína. Amostras de medula óssea foram coletadas de 29 indivíduos sendo: 5 doadores saudáveis, 5 pacientes com diagnóstico de LMC, 16 pacientes em remissão responsivos ao tratamento com ITK e 3 pacientes resistentes ao tratamento. Características dos pacientes estão descritas na Tabela VI. As amostras foram coletadas entre 2011 e 2012, após consentimento informado e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Campinas.

Cultura de células e imatinibe

Utilizamos como modelo de LMC, linhagem celular K562. A linhagem celular K562 foi estabelecida a partir do cultivo de células de paciente com leucemia mieloide crônica em crise blástica onde o cromossomo Ph estava presente [63]. As células foram cultivadas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e mantida a 37 °C com 5% CO₂. Imatinib mesylate foi gentilmente cedido pela Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland, e preparado na concentração de 50 mM em DMSO.

Extração do RNA total

O RNA de células foi isolado utilizando Trizol (Life Technologies, USA). O Trizol é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. A extração de RNA com esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczinski e Sacchi [64]. Ao precipitado de células, contendo 5×10^6

a 1×10^7 células, foi acrescentado 1 mL de Trizol e a amostra foi homogeneizada até que se tornasse bastante fluida. A purificação do RNA foi realizada de acordo com instruções do fabricante. A quantificação do RNA obtido foi através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO a 260 nm equivale a 40 µg/mL de RNA.

Tratamento do RNA total com DNase I

Dez unidades da enzima DNase (1U/µl, Promega) foram acrescentadas a 1 µg de RNA e incubados à 37°C por 60 min com a finalidade de eliminar possível contaminação do material com DNA genômico. A reação foi bloqueada pela adição de solução de EDTA na concentração final de 2 mM. Subsequentemente, a enzima foi inativada por incubação de 10 minutos a 65°C.

Transcrição em DNAc

As amostras contendo 1 µg de RNA total e tratadas com DNase I foram transcritas reversamente em DNAc (híbrido RNA-DNAc) em uma reação de volume final de 20 µL (Fermentas). A reação foi iniciada adicionando aos 1 µg de RNA tratado 1 µL de oligonucleotídeo (dT) 500 µg/mL. Essa mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C e, em seguida, incubada no gelo. Adicionou-se, então, 4 µL do tampão de reação 5x (250 mM Tris-HCl (pH 8,3); 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,1 M DTT), 2 µL da mistura (10 mM) de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e 200 U enzima transcriptase reversa Revertaid, que catalisa a reação de extensão da fita complementar.

Essa mistura foi incubada por 1 hora à 42°C. A seguir, foi feita a desnaturação da reação por 5 minutos a 70°C. As amostras de DNAc foram quantificadas através do espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer).

PCR quantitativo (PCRq)

Amplificação em tempo real foi realizada no aparelho ABI 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando-se SyberGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Quarenta ng de cada amostra de DNAc foram utilizados na reação com os iniciadores. A sequência dos iniciadores utilizados encontra-se na Tabela IV. Controles sem adição de primers também foram utilizados e todas as amostras foram processadas em triplicata na mesma placa de 96 poços (MicroAmp Optical 96-well reaction plate - Applied Biosystems). As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As expressões de *HPRT* foram utilizadas como controle endógeno. Ao final da reação a curva de dissociação foi utilizada para verificação da especificidade da reação. A quantificação relativa das expressões de cada gene normalizado pelo controle endógeno foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ [65].

Padronização e curva de eficiência de VASP e Zyxin para PCRq

Para a verificação da concentração ideal dos iniciadores para análise dos genes *VASP* e *Zyxin* por PCRq, diferentes concentrações (150nM, 300nM, 400nM e 600nM) foram analisadas em amostras de DNAc (DNA complementar) de linhagem K562. A concentração escolhida para *VASP* (Figura 4A) foi de 150nM e *Zyxin* (Figura 4B) foi de 300nM. Os genes endógenos *GAPDH* e *HPRT* foram previamente padronizados pelo nosso grupo de pesquisa com a concentração de 150nM. A concentração escolhida dos iniciadores

foi a que apresentou o menor Ct (ciclo de amplificação) e o maior ΔRn (intensidade de fluorescência), conforme ilustrados na Figura 4. As reações de PCRq foram realizadas no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

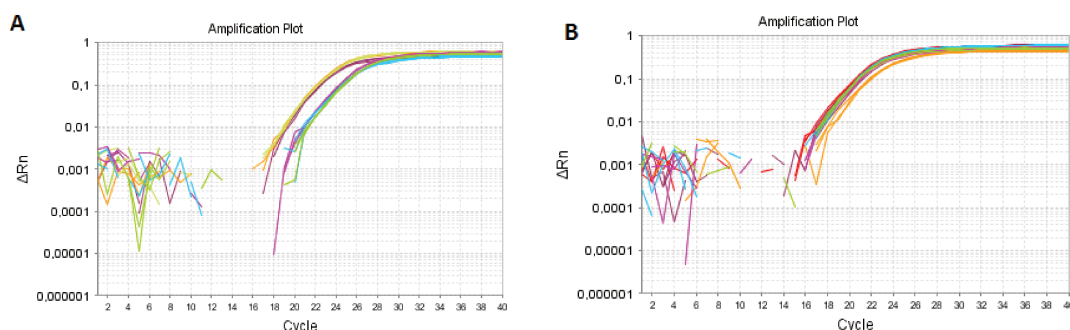


Figura 4. Amplificação de *VASP* (A) e *Zyxin* (B) por PCRq, respectivamente. O eixo vertical indica a intensidade de fluorescência (ΔRn) e o eixo horizontal indica ciclos de amplificação do gene.

A eficiência dos iniciadores de *VASP* e *Zyxin* foi verificada através da curva de diluição na ordem de 1:2. O experimento foi realizado em duplicata e as concentrações analisadas foram 240ng, 120ng, 60ng, 30ng e 15ng. Os genes tiveram ótima eficiência ilustrada na Figura 5.

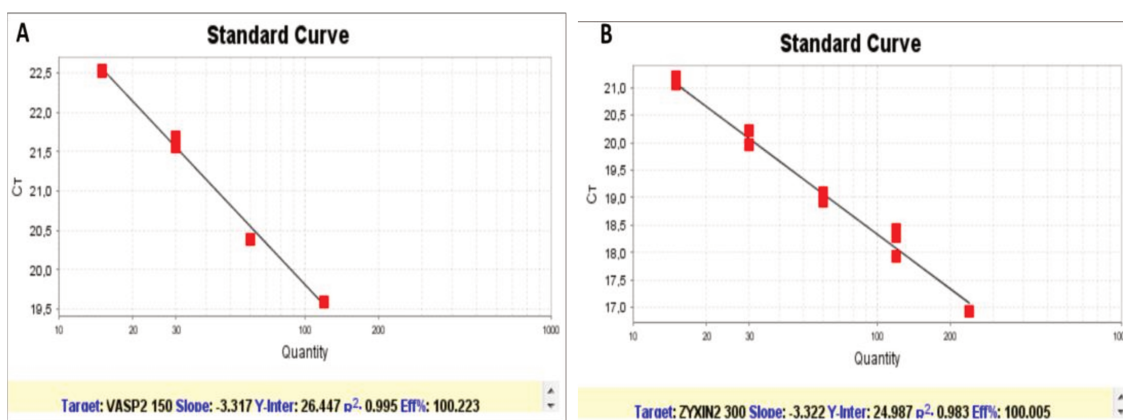


Figura 5. Curvas de eficiência de *VASP* a 150nM (A) e *Zyxin* a 300nM (B). O eixo vertical indica o Ct e o eixo horizontal a concentração do DNAc utilizado. Todos os iniciadores apresentaram 100% de eficiência.

Os controles endógenos utilizados para normalização da expressão gênica foram *GAPDH* e *HPRT*. Ambos os endógenos apresentaram ótima cinética de reação com *VASP* e *Zyxin*. O gene *HPRT* apresentou um Ct de expressão muito próximo aos dos genes alvo e teve a menor variação entre as amostras, portanto, foi o gene escolhido para normalização de expressão relativa de *VASP* e *Zyxin*. A sequência dos iniciadores utilizados estão descritos na Tabela IV.

Tabela IV. Concentração e Sequência dos Iniciadores para Amplificação Gênica de *VASP*, *Zyxin* e *HPRT*.

Gene	Concentração	Sequência dos Iniciadores
<i>VASP</i>	150nM	FW: 5'GCC GGG CCA CTG TGA TGC TT 3'
		RW: 5'GGC TGC ATC TTC CGG CCC AC 3'
<i>Zyxin</i>	300nM	FW: 5' GCA GTC CAT GCC CCA TTG TGG A 3'
		RW: 5' GAC CAT GTT GGG TCC TGG GTC A 3'
<i>HPRT</i>	150nM	FW: 5' GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A 3'
		RW: 5' TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT 3'

Transdução de lentivírus

Células K562 foram transduzidas com lentivírus contendo *short hairpin* RNA (shRNA) controle não específico (sc-108080), shRNA alvo para o gene *VASP* (sc-29516-V) ou shRNA alvo para o gene *Zyxin* (sc-36370-V) obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Resumidamente, 2×10^5 células foram transduzidas com lentivírus através da técnica de inoculação por centrifugação, que consiste em centrifugar as células por 30 minutos à 800g na presença de 3 µg/mL de polibrene

(Sigma, St. Louis, MO, EUA). Após a transdução, as células foram selecionadas com 1,75 µg/mL de puromicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) por 15 dias [66].

Extração de proteína

Ao precipitado celular contendo 5×10^6 a 1×10^7 células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 40 minutos a 4°C, essas amostras passaram por um processo de centrifugação a 4°C durante 20 minutos à 12000 rpm para remoção dos restos celulares.

Imunoprecipitado/Western blotting

Ao produto do extrato total proteico, adicionou-se tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aqueceu-se à 94°C por 4 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel poliacrilamida SDS-PAGE ou armazenadas a -80°C. Para produção de imunoprecitado, 500 µg do extrato proteico de células K562 incubadas com 20 µL anti-VASP antibody (Santa Cruz Biotechnology) ou com imunoglobulina IgG para controle negativo por 12 horas e adicionou-se às alíquotas a proteína G-Sepharose 6MB por 1 hora. Após o término da incubação e da lavagem, os complexos precipitados foram ressuspensos em 20 µL tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aquecidas em água fervente por 4 minutos. Em seguida, as proteínas imunoprecipitadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories,

Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite desnatado, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0,02% Tween 20) a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (0,3% de leite desnatado) por 12 horas a 4°C e então lavadas 3 vezes com solução (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0,02% Tween 20). Os anticorpos primários utilizados da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) foram: ABL (sc-23), p-ERK (sc-7383), P70S6K (sc-8418), CRKL (sc-319), BAX (sc-20067), Actina (sc-1616), p-P70S6K (sc-7984), BCL-XL (sc-8392), BCL2 (sc-492), p-BAD (sc-7999), BAD (sc-943), p-STAT 5 (C11C5), STAT 5 (SC-835), FAK (SC-558), BAK (SC-G23) e VASP (sc-1853). Os anticorpos utilizados da Cell Signaling Technology (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) foram p-CRKL (3181), p-130 CAS (4011), p130 CAS (12015), p-VASP (3111) e da Zymed (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi Anti-ERK1/2 (13-6200). Anticorpos p-JNK (44690G) e JNK (446826) foram da Invitrogen e p-FAK 397 (ab4803), p-FAK 576+577 (ab76244), p-FAK 861 (ab38458), p-FAK 925 (ab38512), p-Zyxin (ab78910) e Zyxin (ab58210) foram da Abcam (Cambridge, MA, USA). O sistema de revelação usado foi baseado em quimioluminêscencia e realizado de acordo com orientações do fabricante, ECLTM *Western Blot Analysis System* (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em suma, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado à HRP (Horseradish peroxidase), lavadas novamente, e então submetidas ao substrato da enzima, resultando em um produto luminescente, detectado por autoradiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Análises quantitativas da intensidade das bandas de proteínas foram

determinadas utilizando-se o *Scion Image software* (ScionCorp, Frederick, MD, USA). A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão da actina e a intensidade da fosforilação proteica foi normalizada pela expressão da proteína correspondente.

Diferenciação celular

Células KU812 foram induzidas a diferenciação eritroide pelo tratamento com 50 μ M hemina (HE) (Sigma; St. Louis, MO, USA) e 100 μ M hydroxyurea (HU) (Sigma) por 4 dias e avaliada pela coloração com a benzidina e análise de expressão de α -globina, β -globina and γ -globina. Células NB4 foram induzidas a diferenciação granulocítica pelo tratamento com 10^{-6} M de ácido all-trans retinoico (ATRA) (Roche; Basel, Switzerland) por 4 dias e avaliado pela análise morfológica e expressão de CD11b. Células K562 e HEL foram induzidas a diferenciação de megacariócito pelo tratamento com 20 nM phorbol-13 myristate-12 acetate (PMA) (Sigma) por 4 dias e avaliada a análise morfológica e expressão de CD61. Todos os tratamentos foram realizados pelo nosso grupo de pesquisa como descrito por Machado-Neto e colaboradores [67] e células tratadas e não tratadas foram coletadas para extração de RNA e submetidas a análises de expressão proteica e fosforilação de VASP e Zyxin. A amostra do Dia 0 não recebeu tratamento e as amostras do Dia 1, Dia 2, Dia 3 e Dia 4 foram tratadas com PMA e coletadas nos respectivos dias. A avaliação da diferenciação celular por citometria de fluxo foi realizada através da expressão de marcadores de superfície celular, os quais os anticorpos foram incubados separadamente com as células por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS e ressuspensas em formaldeído 1%. Dez mil eventos foram adquiridos com um *FACSCalibur* (Becton–Dickinson, CA, USA) e analisados através do *CellQuest Software* (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA). A marcação não específica com o anticorpo IgG

foi subtraída do percentual de população correspondente positiva. Células K562 inibidas ou não para VASP e Zyxin foram submetidas aos ensaios de diferenciação para megacariócito, como descrito acima.

Deprivação de soro

Para ensaios de proliferação, crescimento clonal e apoptose, células inibidas e não inibidas foram submetidas à privação de soro fetal bovino (SFB) a 0,5% por 12 horas.

Ensaio de proliferação

Células K562 com e sem inibição foram submetidas a este ensaio. Para isso, 5×10^4 células foram cultivadas por poço em uma placa de 96 poços em meio RPMI com 10% de SFB na ausência ou presença de diferentes concentrações de imatinibe (0,1; 0,5 ou 1 μ M) por 48 horas. Em cada poço, foi adicionado 10 μ L de uma solução de MTT (*Methylthiazoletetrazolium* 5 mg/mL em PBS, Sigma) e incubado à 37°C por 4 horas. Após esse período, 100 μ L de 0,1N HCl em isopropanol foi adicionado aos poços. O crescimento celular foi avaliado pela mensuração da absorbância à 570 nm, utilizando um leitor automático de placas. Todas as condições foram testadas em seis replicatas.

Ensaio de crescimento clonal

A formação de colônias foi realizada em meio semissólido de metilcelulose ($0,5 \times 10^3$ células/mL; MethoCult 4230; StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada). As colônias foram detectadas após 8 dias de cultura pela adição de 1 mg/mL de

reagente MTT e as contagens foram realizada com o auxílio do *Image J quantification software* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Células shControle e shVASP e shZyxin foram submetidas ao ensaio de formação de colônias na ausência e presença de imatinibe (0,1; 0,5 ou 1 μ M). Todas as condições foram testadas em duplicatas.

Avaliação de apoptose por marcação com anexina-V e PI

Células shControle e inibidas para as proteínas VASP e Zyxin foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com diferentes concentrações de imatinibe (0,1; 0,5 ou 1 μ M) por 48 horas. As células foram então lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação contendo 1 μ g/mL de PI e 1 μ g/mL de FITC anexina-V (Becton–Dickinson, CA, USA). Após incubação no escuro durante 15 minutos em temperatura ambiente, todas as amostras foram analisadas em um FACSCalibur. Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

Imunofluorescência

Células K562, HEL e Jurkat foram colocadas sobre lamínulas de vidro previamente tratados com Poli L lisina, lavadas com PBS e fixadas em solução de paraformaldeído 4%. Em seguida, foi realizados o bloqueio e a permeabilização das células com uma solução contendo 3% de leite desnatado e 0,6% de triton. Células foram incubadas com os anticorpos primários VASP e Zyxin diluídos em solução 1% de leite desnatado, em câmara úmida a 4°C por 18 horas. Após 3 lavagens com PBS, foi realizada marcação com os anticorpos secundários com fluorocromos específicos e faloidina para visualizar a actina F por 1 hora à temperatura ambiente. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS e

montadas em lâminas utilizando-se o meio de montagem para fluorescência (ProLong® Gold com DAPI, da Molecular Probes). As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando-se a objetiva de 40x de imersão em óleo. Em todos os experimentos foram feitos controles negativos, somente com anticorpo secundário, os quais não apresentaram fluorescência.

Análise Estatística

Análise estatística foi realizada utilizando GraphPad InStat 5 (GraphPad Software, Inc., San. Diego, CA, USA). A comparação dos valores da quantidade relativa de expressão do RNAm de *Zyxin* e *VASP* entre as linhagens foi realizada através do teste estatístico de Mann-Whitney U. A comparação entre as amostras diferenciadas foi realizado pelo teste *t Student's*. Nos estudos comparando células K562 submetidas ou não a inibição de VASP e *Zyxin*, as comparações entre dois grupos ou mais condições foram realizadas através dos testes estatísticos *two-way ANOVA* com pós-teste *Bonferroni* e valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os testes.

RESULTADOS

1. Expressão de VASP e Zyxin em linhagens leucêmicas

Não há dados na literatura relatando a expressão de VASP e Zyxin em diferentes linhagens hematopoiéticas. Para avaliar a expressão da VASP e Zyxin foram utilizadas quinze linhagens de células leucêmicas, sendo nove linhagens mieloides (K562, KU812, NB4, HL60, P39, HEL, U937, KG1 e THP1) e seis linhagens linfoides (Jurkat, MOLT4, Daudi, Raji, Namalwa e Karpas 422), como descritas na Tabela V. Três amostras de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis (CMSPIS 1, CMSPIS 2 e CMSPIS 3) foram utilizadas como controle.

Tabela V. Descrição das Linhagens Celulares Leucêmicas.

Linhagem	Descrição
K562	Leucemia mieloide crônica em crise blástica
KU812	Leucemia mieloide crônica em crise blástica
NB4	Leucemia promielocítica aguda
HL60	Leucemia mielocítica aguda
P39	Leucemia mielomonocítica secundária à mielodisplasia
HEL	Leucemia mieloide eritroblástica
U937	Leucemia mieloide histiocítica
KG1	Leucemia mieloide aguda
THP1	Leucemia mieloide monocítica aguda
Jurkat	Leucemia Linfoide Aguda T
MOLT4	Leucemia Linfoide Aguda T
Daudi	Leucemia Linfoide Aguda B/Linfoma de Burkitt
Raji	Leucemia Linfoide Aguda B/Linfoma de Burkitt
Namalwa	Leucemia Linfoide Aguda B/Linfoma de Burkitt
Karpas 422	Leucemia Linfoide Aguda B/Linfoma de Burkitt

Os resultados da expressão gênica de *VASP* e *Zyxin* nas diferentes linhagens hematopoiéticas estão ilustrados nas Figuras 6A e B, respectivamente. A linhagem HEL foi utilizada como amostra calibradora para a expressão gênica pois é uma linhagem mieloide e negativa para BCR-ABL. A expressão gênica de *VASP* nas diferentes linhagens foi heterogênea, com tendência a menor expressão nas linhagens linfoides (Figura 6A). Para *Zyxin*, observou-se nitidamente que nas linhagens linfoides o gene é menos expresso quando comparado com as linhagens mieloides ($P < 0,0001$; teste de *Mann Whitney* Figura 6B) e está de acordo com a literatura que descreve a expressão diminuída de *Zyxin* em pacientes LLA em relação a pacientes LMA [34].

Os resultados de expressão proteica corroboraram com a expressão gênica de *VASP* e *Zyxin* (Figura 6C). Interessante foi notar a presença de duas bandas ou de apenas uma banda para *VASP* nas diversas linhagens (Figura 6C). A banda superior é descrita na literatura como sendo a p-*VASP* ser157 (50kDa) e a banda inferior é a *VASP* não fosforilada (46kDa) [68]. Observamos que a *VASP* fosforilada e não fosforilada estão diferencialmente expressas nas diversas linhagens leucêmicas, mostrando que sua atividade está modulando de acordo com cada linhagem. Além da análise da expressão gênica e proteica, foi observada a localização de *VASP* e *Zyxin* por microscopia confocal (Figura 7A), *VASP* e *Zyxin* estão predominantemente localizadas no citoplasma das células leucêmicas estudadas, com diminuição da expressão de *Zyxin* em células linfoides Jurkat (Figura 7A).

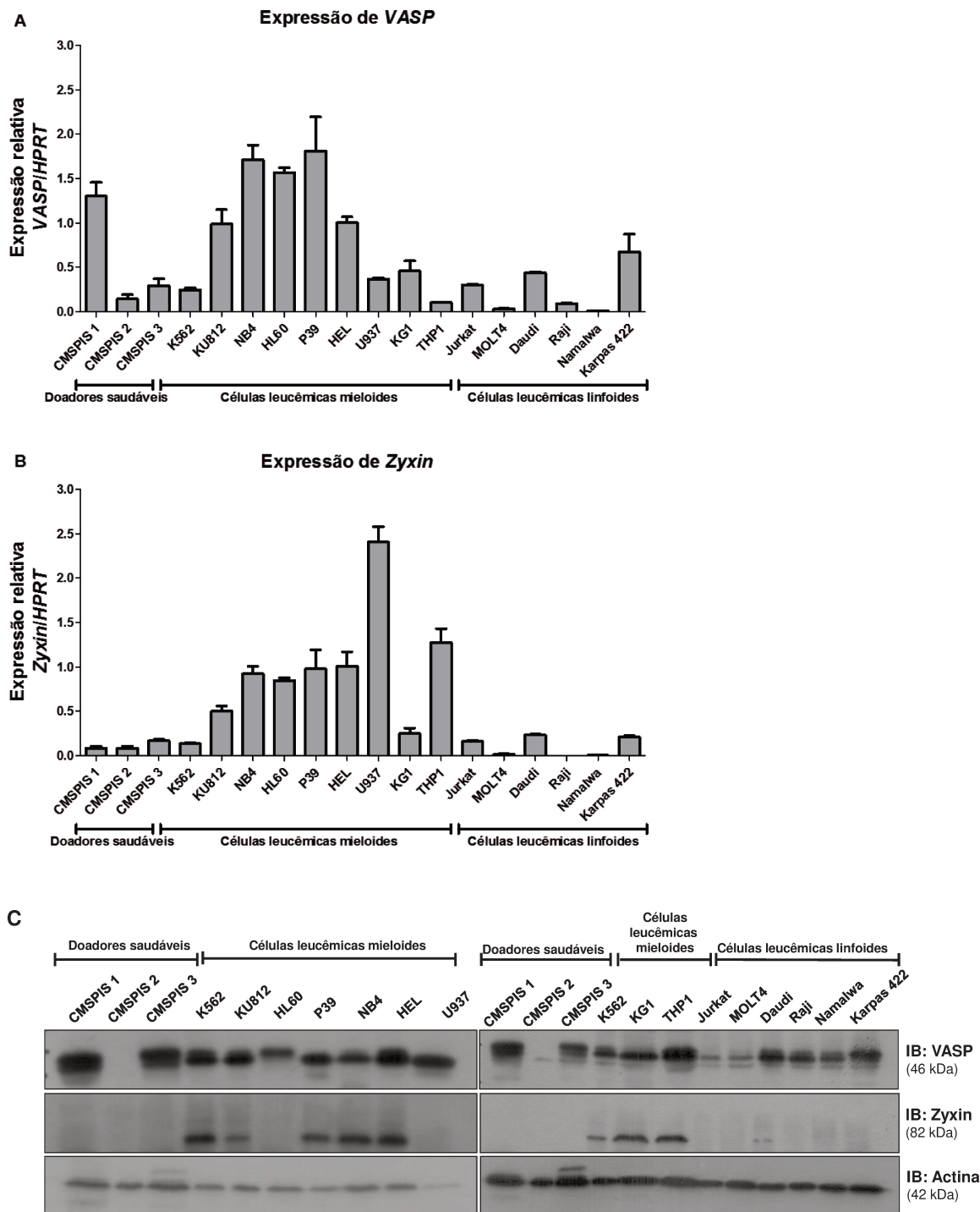


Figura 6. Expressão gênica de *VASP* (A) e *Zyxin* (B) em células hematopoiéticas de indivíduos saudáveis, em linhagens leucêmicas mieloides e linfoides. O eixo vertical representa a expressão relativa do RNAm normalizada pelo endógeno *HPRT* e o eixo horizontal representa as diferentes linhagens celulares. (C) Expressão proteica de *VASP* e *Zyxin* em células hematopoiéticas de indivíduos saudáveis, em linhagens mielóide e linfóide. A amostra calibradora foi a linhagem celular HEL. Representativo de três experimentos independentes.

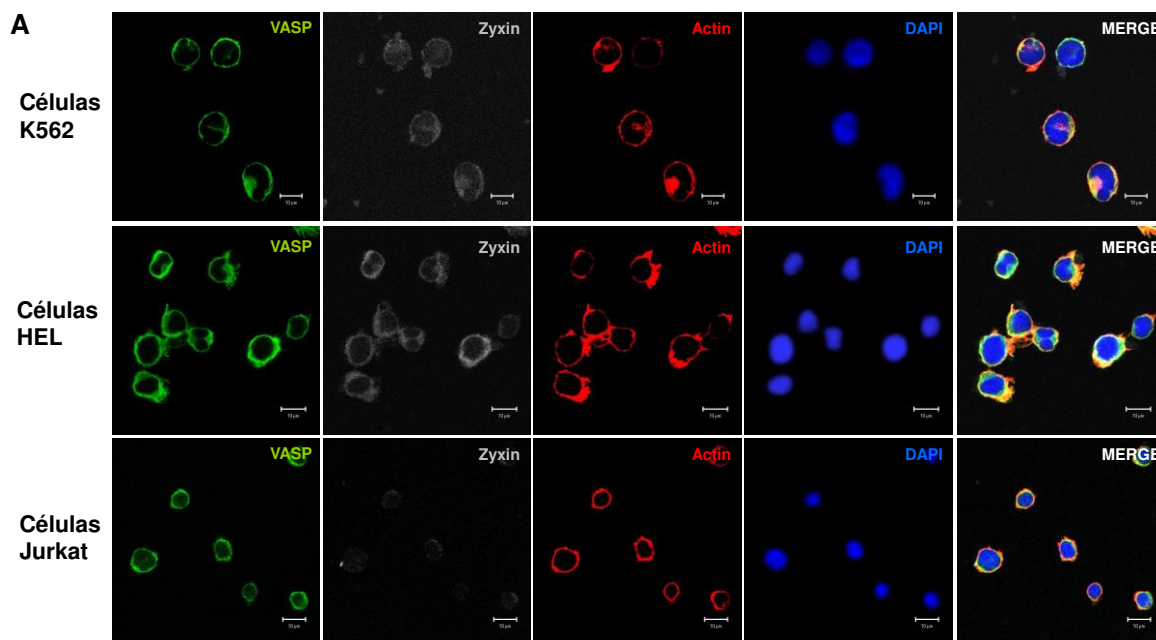


Figura 7. (A) Imagens de confocal mostram a localização de VASP (verde), Zyxin (branco), Actina (vermelho) e Dapi (azul) nas células K562, HEL e Jurkat. MERGE representa a sobreposição de imagens. Representativo de três experimentos independentes.

2. Expressão de VASP em pacientes com LMC

Uma vez que alterações na rede de actina estão relacionadas com a progressão tumoral e que VASP ser157 tem papel na regulação de actina, foi investigada a expressão proteica de VASP e sua fosforilação em ser157 em células de medula óssea de pacientes com LMC. Assim, amostras proteicas de células de medula óssea de 29 indivíduos foram analisadas, sendo 5 amostras de doadores saudáveis, 5 amostras de pacientes diagnosticados com LMC, 16 pacientes em remissão responsivos ao tratamento com ITK e 3 pacientes resistentes ao tratamento. Os 16 pacientes responsivos foram divididos em subgrupos, conforme estabelecido pelo LeukemiaNet [44], sendo 4 com resposta hematológica completa (RHC), 2 com resposta citogenética parcial (RCP), 4 com resposta citogenética completa (RCC), 3 com resposta molecular maior (RMM) e 3 com resposta molecular completa (RMC). As características dos pacientes estão descritas na Tabela VI.

Tabela VI. Caracterização Clínica dos Pacientes com Leucemia Mieloide Crônica

Sexo
Feminino: 14
Masculino: 10
Média de idade no momento do diagnóstico
55 anos (mínimo 33 – máximo 77)
BCR-ABL transcrito
P210 b3a2: 16
P210 b2a2: 7
P210 b3a2/b2a2: 1
Fase do estudo
Fase crônica: 16
Fase acelerada: 8
A resposta ao tratamento no momento do estudo
Resposta hematológica (RHC): 4
Resposta citogenética parcial (RCP): 2
Resposta citogenética completa (RCC): 4
Resposta molecular maior (RMM): 3
Resposta molecular completa (RMC): 3
Resistentes: 3
Sem Tratamento
Diagnóstico: 5
Com tratamento
Apenas imatinibe: 1 (mesmo paciente como diagnóstico e após 3 meses)
Hydroxyurea e imatinibe: 11
Imatinibe e após outros ITK (dasatinibe, nilotinibe ou bosutinibe): 5
Somente ITK (dasatinibe, nilotinibe ou bosutinibe): 3

A Figura 8A é representativa de parte dos resultados dos pacientes. Interessantemente, células de doadores saudáveis apresentaram expressão de VASP e de p-

VASP ser157, no entanto, os pacientes LMC ao diagnóstico não apresentaram a fosforilação na ser157 e foi observada redução na expressão de VASP (Figura 8A). Após o tratamento com ITK, pacientes em remissão restauraram a fosforilação de VASP ser157 e pacientes resistentes não apresentaram fosforilação em ser157. Devemos salientar que o mesmo paciente foi analisado no momento do diagnóstico (amostra 6) e após três meses de tratamento com imatinibe (amostra 7), a amostra deste paciente nos permitiu observar claramente a ausência de p-VASP ser157 no momento do diagnóstico de LMC e, após tratamento, quando adquire a resposta citogenética completa (RCC), passa a expressar p-VASP ser157 (Figura 8A). As amostras 8, 9 e 10 são de pacientes com melhor resposta ao tratamento (RMC) e indicam semelhanças na fosforilação de VASP ser157 em relação aos doadores saudáveis (Figura 8A). Estes resultados se confirmam nas Figuras 8B e C, onde os pacientes LMC ao diagnóstico não apresentam p-VASP ser157, ao contrário dos doadores saudáveis e pacientes responsivos ao tratamento (Figuras 8B e C). Como a expressão da p-Zyxin ser142 foi semelhante entre os doadores saudáveis, diagnóstico e remissão, ela foi utilizada como controle da quantificação proteica das amostras (Figuras 8B e C). Não conseguimos detectar a expressão de Zyxin total em nenhuma das amostras analisadas.

Em amostras de medula óssea de pacientes LMC há grande dificuldade de utilizar os controles endógenos tradicionais para *western blot* como Actina ou GAPDH. Desta maneira, utilizamos aqui a marcação por Ponceau e a detecção de p-Zyxin para demonstrar a quantidade de proteína em cada poço. Na literatura estudos com amostras de pacientes LMC descreveram o uso de coomassie blue como indicador da quantidade proteica [69] e foi demonstrado que Ponceau e coomassie blue são alternativas adequadas utilizadas como quantificação ao invés de Actina [70] [71].

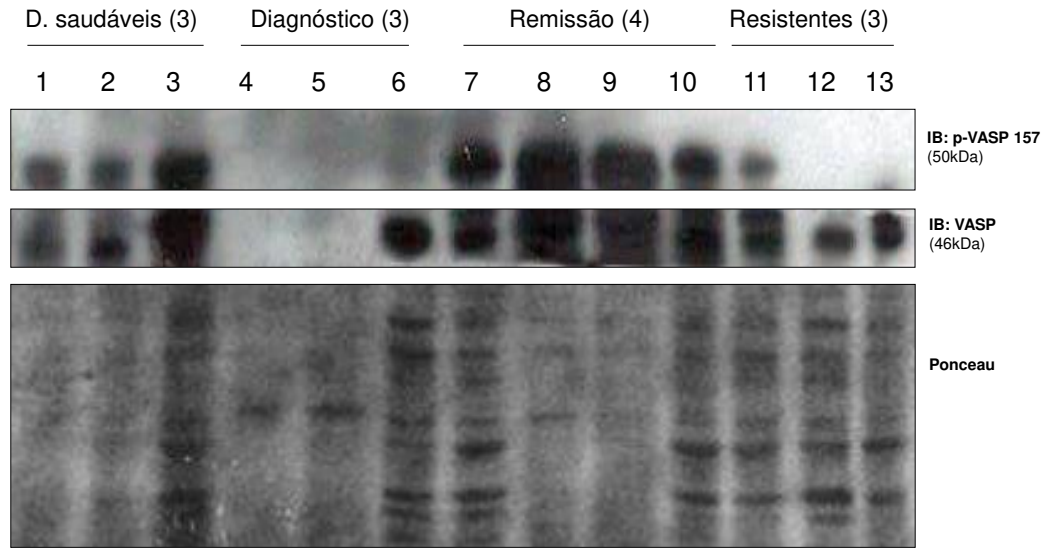
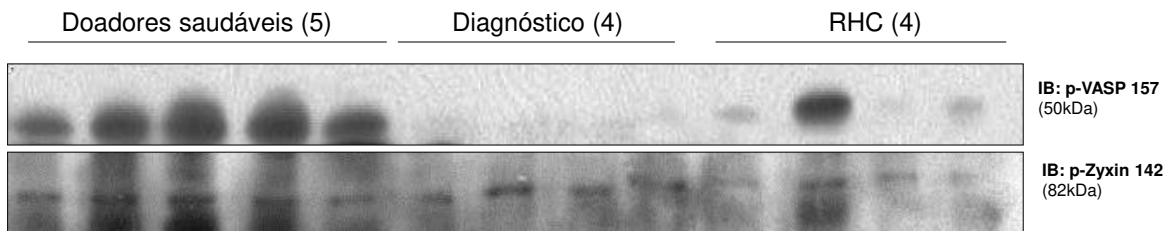
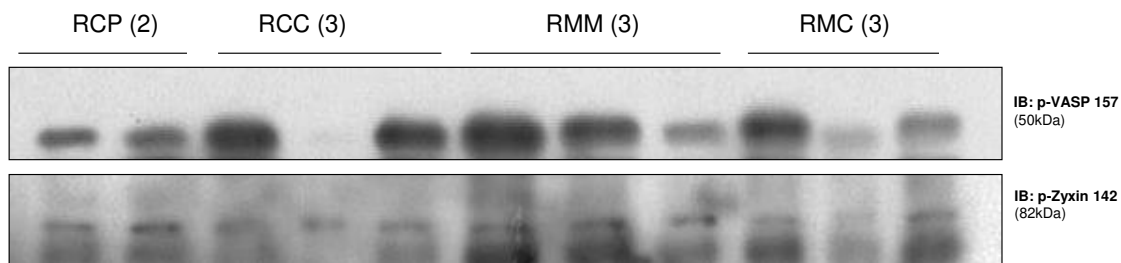
A**B****C**

Figura 8. (A) Análise por *Western blotting* da expressão de p-VASP ser157 e VASP em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) ao diagnóstico, em remissão e resistentes a inibidores de tirosina quinase (ITK). As amostras 6 e 7 são do mesmo paciente em diferentes estágios da doença: ao diagnóstico e em remissão, respectivamente. A marcação com ponceau indica a quantidade de proteína em cada poço. (B) e (C) *Western blotting* demonstrando a expressão de p-VASP157 em pacientes LMC ao diagnóstico e em diferentes subtipos de remissão. A expressão de p-Zyxin não variou entre as amostras e indica a quantidade de proteína em cada poço. Na figura, pacientes responsivos ao tratamento apresentaram remissão hematológica completa (RHC), remissão citogenética parcial (RCP), remissão citogenética completa (RCC), remissão molecular maior (RMM) e remissão molecular completa (RMC).

3. P-VASP ser157 e BCR-ABL

Para analisar o possível efeito de imatinibe sobre p-VASP ser157, células K562 foram tratadas com 1 μ M de imatinibe por 3 e 6 horas e foi observado aumento na fosforilação ser157 após tratamento (Figura 9A). Este resultado está de acordo com o aumento de p-VASP ser157 em pacientes LMC em remissão após o tratamento com imatinibe (Figura 8A). Sabendo-se que VASP se associa com ABL e VASP é fosforilada em tirosina por BCR-ABL, foi investigada a associação de VASP e BCR-ABL em células K562 e os possíveis efeitos do imatinibe nesta interação. O tratamento com imatinibe foi realizado como descrito anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (1). Lisados de células K562 tratadas e não tratadas com 1 μ M de imatinibe por 3, 6, 9 e 12 horas foram imunoprecipitados com anti-VASP e incubados com anti-ABL. *Western blot* demonstrou a associação de VASP e BCR-ABL (210 kDa) (Figura 9B). Interessantemente, foi observado que ao longo do tratamento com o imatinibe há diminuição da interação da VASP e BCR-ABL (Figura 9B). Estes resultados em conjunto indicam que o tratamento com imatinibe e a fosforilação de VASP podem modular a associação da VASP e BCR-ABL.

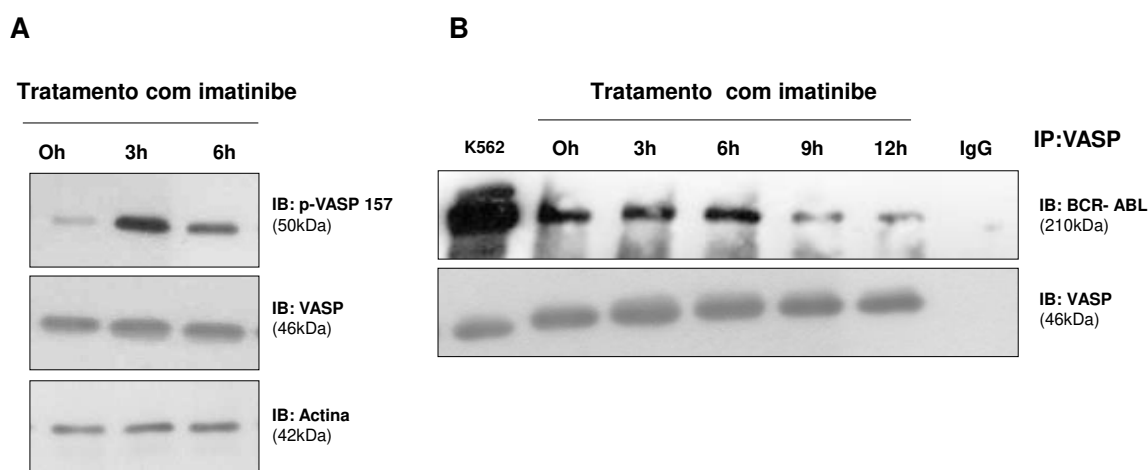


Figura 9. (A) *Western blotting* usando o anticorpo anti-p-VASP ser157 e anti-VASP em células K562 tratadas com imatinibe por 3 e 6 horas. (B) Extrato total de células K562 tratadas com imatinibe foi submetido à imunoprecipitação (IP) com o anticorpo anti-VASP e, em seguida, analisado por *western blotting* usando anticorpo anti-ABL e anti-VASP.

4. Papel de VASP e Zyxin na via BCR-ABL

4.1 Silenciamento de VASP e Zyxin em células K562

Na tentativa de compreender os efeitos da associação de VASP com BCR-ABL, inibimos VASP e Zyxin em células K562 e as proteínas efetoras da via BCR-ABL foram analisadas. Células K562 foram transduzidas com shRNA mediado por lentivírus específico para VASP (shVASP), Zyxin (shZyxin) e sem sequência específica (shControle). Após a seleção por 15 dias, a expressão dos genes foi determinada por PCRq e *Western Blot*. A análise por PCRq evidenciou redução significativa na expressão gênica de VASP (60%) (Figura 10A) e Zyxin (75%) (Figura 10C) e a análise por *western blot* revelou redução da expressão proteica de VASP (81%) (Figura 10B) e Zyxin (99%) (Figura 10D) quando comparadas com shControle. O silenciamento de VASP e Zyxin em células BCR-ABL positivas permitiu analisar seus efeitos em estudos funcionais.

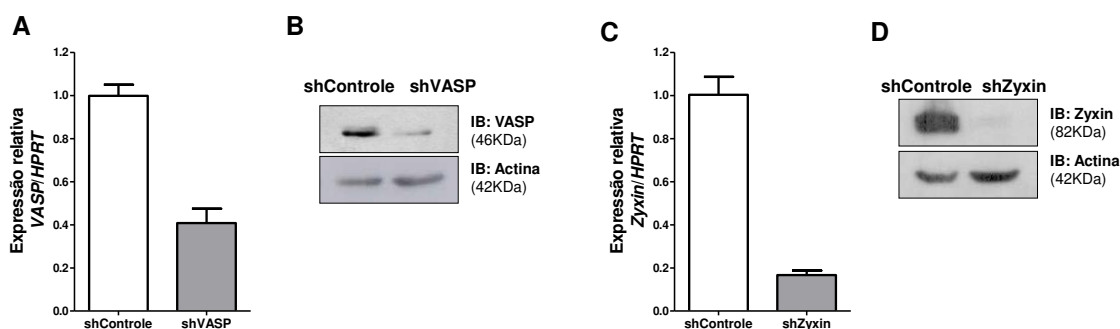


Figura 10. Análise da expressão de VASP por PCRq (A) e *western blotting* (B) em células K562 transduzidas com lentivírus mediado shRNA controle e lentivírus mediado shRNA VASP. Análise da expressão de Zyxin por PCRq (A) e *western blotting* (B) em células K562 transduzidas com lentivírus mediado shRNA controle e lentivírus mediado shRNA Zyxin. Os gráficos de barras representam a média±DP e os anticorpos usados para o *imunoblotting* (IB) são indicados.

4.2 Efeito do silenciamento de VASP e Zyxin na apoptose em células K562

Para investigar os efeitos do silenciamento das proteínas VASP e Zyxin na apoptose celular, a taxa de apoptose foi avaliada por citometria de fluxo após incubação das células com anexina-V e PI, as células silenciadas foram submetidas ou não ao tratamento com imatinibe. O tratamento com a droga apresentou dois objetivos: primeiro atuando como controle positivo da eficiência dos métodos, já que sabidamente o imatinibe induz a redução da proliferação celular e aumento da apoptose [66] e, segundo, para aumentar a sensibilidade das células silenciadas [72]. Conforme esperado, o imatinibe teve efeito dose-resposta na indução da apoptose (Figura 11A-D). Células silenciadas para o gene VASP (Figura 11A e B) e Zyxin (Figura 11C e D) tiveram maior taxa de apoptose quando comparadas com as células controle ao serem tratadas com 1 μ M de imatinib em 48 horas ($P < 0.05$), demonstrando que o silenciamento de VASP e Zyxin tem um efeito adicional ao tratamento com imatinibe, aumentando a apoptose em células BCR-ABL positivas.

Para o estudo do efeito da inibição das proteínas VASP e Zyxin na ativação da via de apoptose (Figura 11E), células shVASP e células shZyxin foram avaliadas para a expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas. Os resultados relativos ao estudo dessas proteínas foram semelhantes entre as células silenciadas para o gene VASP e as células silenciadas para Zyxin. O nível de expressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-XL apresentou redução na expressão nas células inibidas para VASP e Zyxin (Figura 11F). Entretanto, não houve alteração da fosforilação da proteína pró-apoptótica BAD e da expressão das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK nas células silenciadas em relação às células controles. A alteração das proteínas anti-apoptóticas confirmou os resultados obtidos referentes aos ensaios funcionais de anexina-V e PI.

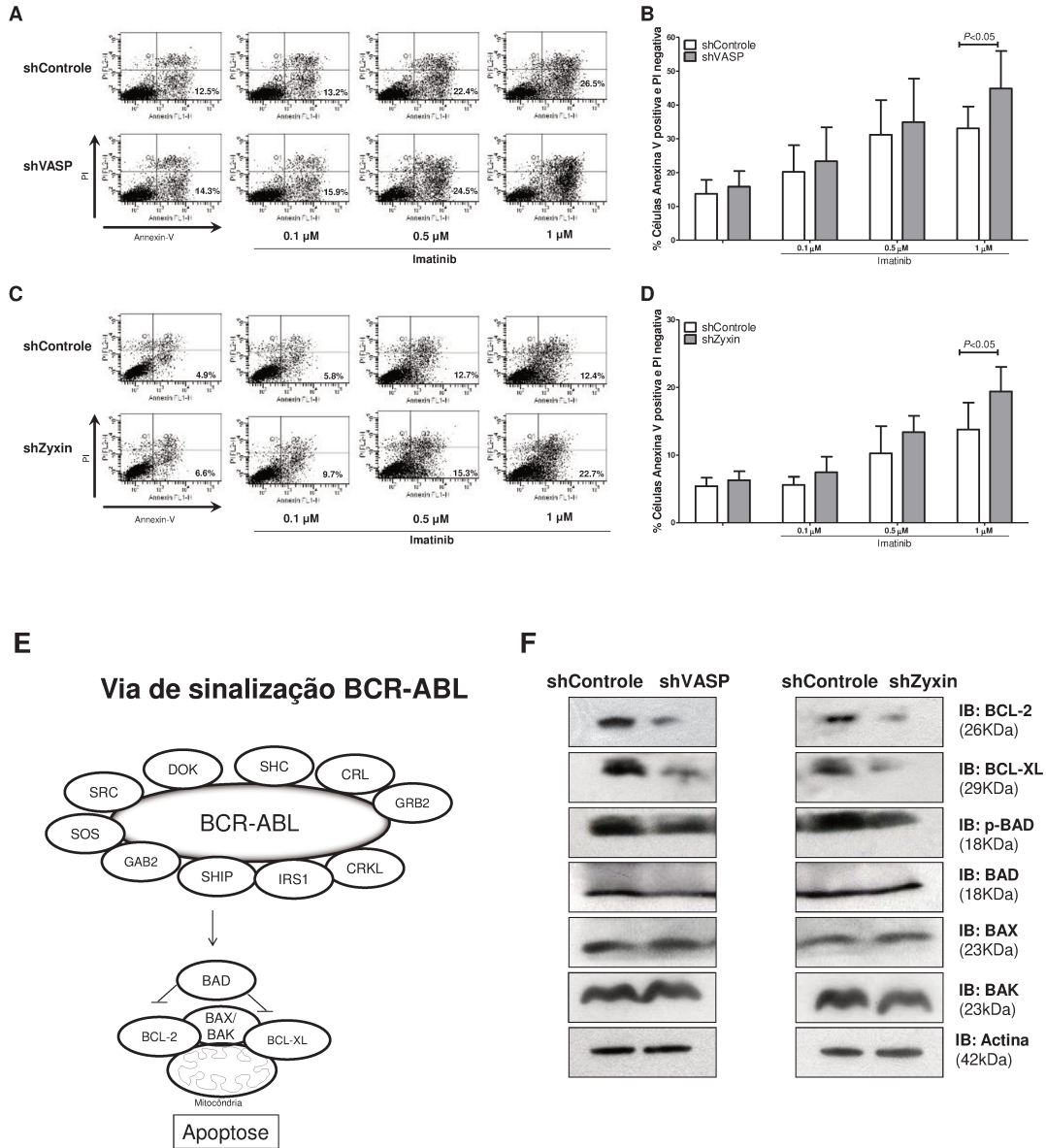


Figura 11. (A e B) e (C e D) Análise da apoptose por citometria de fluxo em células controle e inibidas para VASP e Zyxin, respectivamente, incubadas na ausência ou presença de imatinibe (0,1; 0,5 e 1 μM por 48 horas), utilizando marcação com anexina-V e PI. (A) e (C) O quadrante inferior indica a porcentagem de células apoptóticas. (B) e (D) Os gráficos de barras representam a média ± DP. Representativo de três experimentos independentes. Teste *Two-Way Anova* e pós-teste *Bonferroni*. (E) Diagrama simplificado representando a via de sinalização BCR-ABL e proteínas apoptóticas efetoras. (F) Análise de *Western Blotting* de extratos proteicos de células shControl, shVASP e shZyxin para avaliação da expressão de BCL-2, BCL-XL p-BAD, BAX e BAK; as membranas foram re-incubadas com o anticorpo para detecção da proteína total respectiva ou da actina como controle.

4.3 Proliferação celular e crescimento clonal de células com inibição de VASP e Zyxin

O efeito do silenciamento de VASP e Zyxin na proliferação de células K562 foi avaliado por MTT após 48 horas de cultura. Células K562 shControle, shVASP e shZyxin foram submetidas ou não ao tratamento com imatinibe. O experimento demonstrou que células com inibição de VASP não apresentaram alteração na proliferação quando comparadas com as células controle, tratadas ou não com imatinibe (Figura 12A). Células inibidas para Zyxin não tratadas com o imatinibe não tiveram alteração na proliferação celular quando comparadas com o controle, porém ao serem tratadas com 0,5 e 1 μ M de imatinibe, houve redução significativa da proliferação (Figura 12B). Este resultado pode ser consequência do aumento da apoptose e morte celular. O ensaio de formação de colônia foi utilizado para determinar se o silenciamento de VASP e Zyxin altera o crescimento clonal de células K562. Células controle e inibidas para os genes respectivos foram cultivadas em meio de metilcelulose e as colônias foram analisadas após 8 dias de cultura. O tratamento com imatinibe também resultou em uma inibição dose-dependente na formação de colônias como esperado, mas não houve alteração do número de colônias nas células shVASP (Figura 12C) e shZyxin (Figura 12D) comparado com as células shControle.

Quatro vias de sinalização foram descritas na literatura como responsáveis pela proliferação/diferenciação dentro da via BCR-ABL, via JNK, ERK, STAT5 e P70S6K (Figura 12E). Nenhuma das proteínas avaliadas nestas vias foram moduladas em células shVASP e células shZyxin quando comparadas às células shControle, como observado na Figura 12F. Portanto, os resultados obtidos nos ensaios funcionais, estão de acordo com os resultados obtidos pela análise de expressão das proteínas.

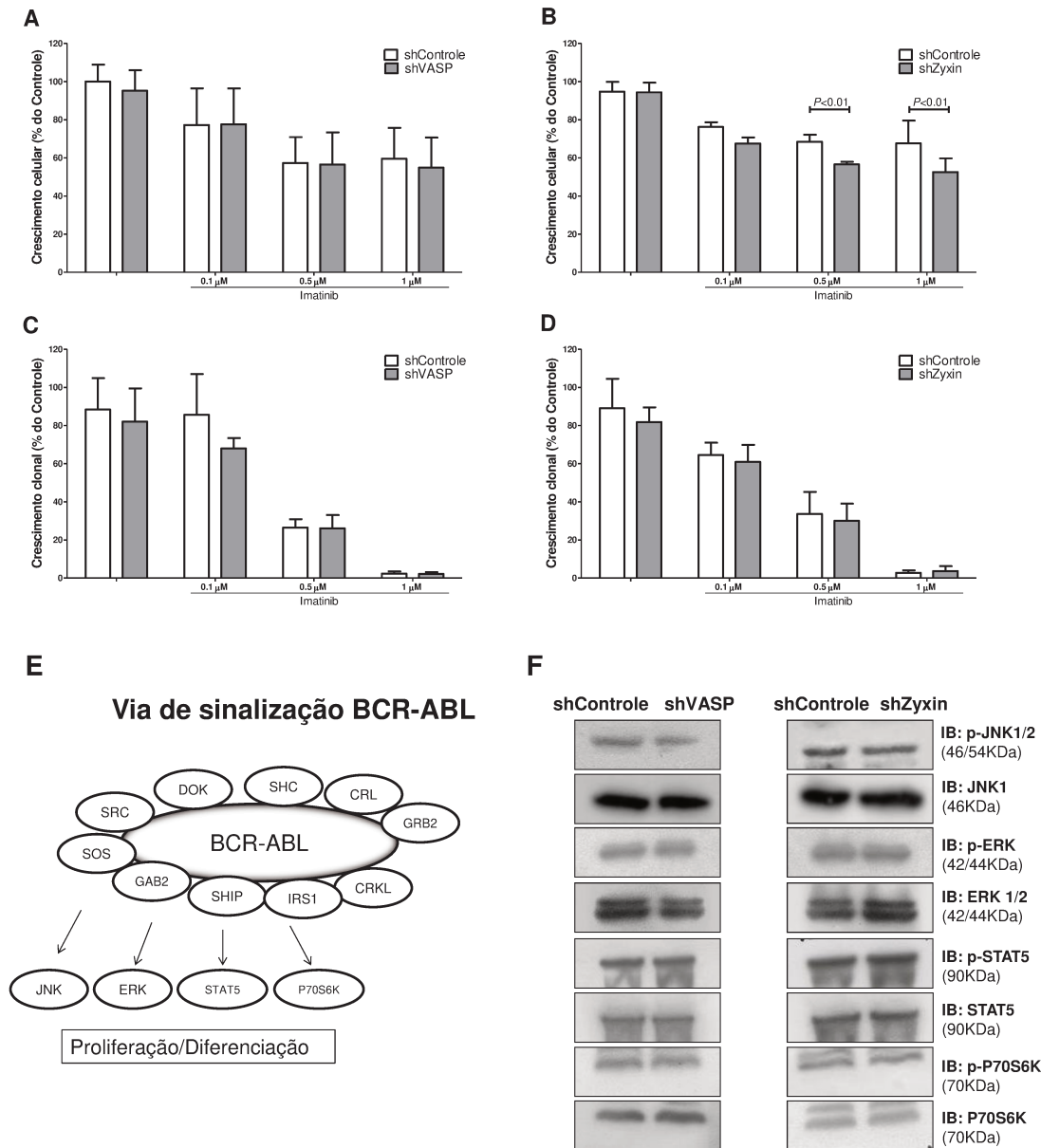


Figura 12. (A) e (B) Proliferação celular analisada por MTT depois de 48 horas de incubação de células shControl ou shVASP e shZyxin, respectivamente, tratadas e não tratadas com imatinibe (0,1; 0,5 ou 1 μ M). Os valores normalizados pelas células shControl. Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de seis replicatas e é representativo de três experimentos independentes. (C) e (D) colônias viáveis foram detectadas por MTT depois de oito dias de incubação de células shControl ou shVASP e shZyxin, respectivamente, tratadas e não tratadas com imatinibe (0,1; 0,5 or 1 μ M) e valores normalizados pelas células shControl não tratadas. Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP e são representativos de três experimentos independentes. Teste *Two-Way Anova* e pós-teste *Bonferroni*. (E) Representação da via de sinalização BCR-ABL para a proliferação e diferenciação celular. (F) Análise de *Western Blotting* de extratos proteicos de células shControl, shVASP e shZyxin para avaliação da expressão de p-JNK, p-ERK, p-STAT5 e p-70S6K em células K562. As membranas contendo o extrato proteico foram re-incubadas com o anticorpo total para detecção da proteína.

4.4 Efeito do silenciamento de VASP e Zyxin na adesão celular

Dentre as proteínas de adesão envolvidas na via de sinalização BCR-ABL (Figura 13A), células shVASP apresentaram diminuição na expressão de p-FAK y925, esta alteração não é observada em células shZyxin (Figura 13B). A atividade das proteínas de adesão p130CAS e CRKL não foi alterada em células shVASP e shZyxin quando comparadas com as células shControle (Figura 13B).

Ao imunoprecipitar VASP observamos que VASP interage com FAK, mas observamos que FAK não interage com Zyxin (Figura 13C). Estes resultados sugerem que a VASP pode regular a adesão de células hematopoiéticas leucêmicas através da atividade da p-FAK y925. Neste mesmo imunoprecipitado podemos observar que em células K562 VASP não interage com Zyxin (Figura 13C).

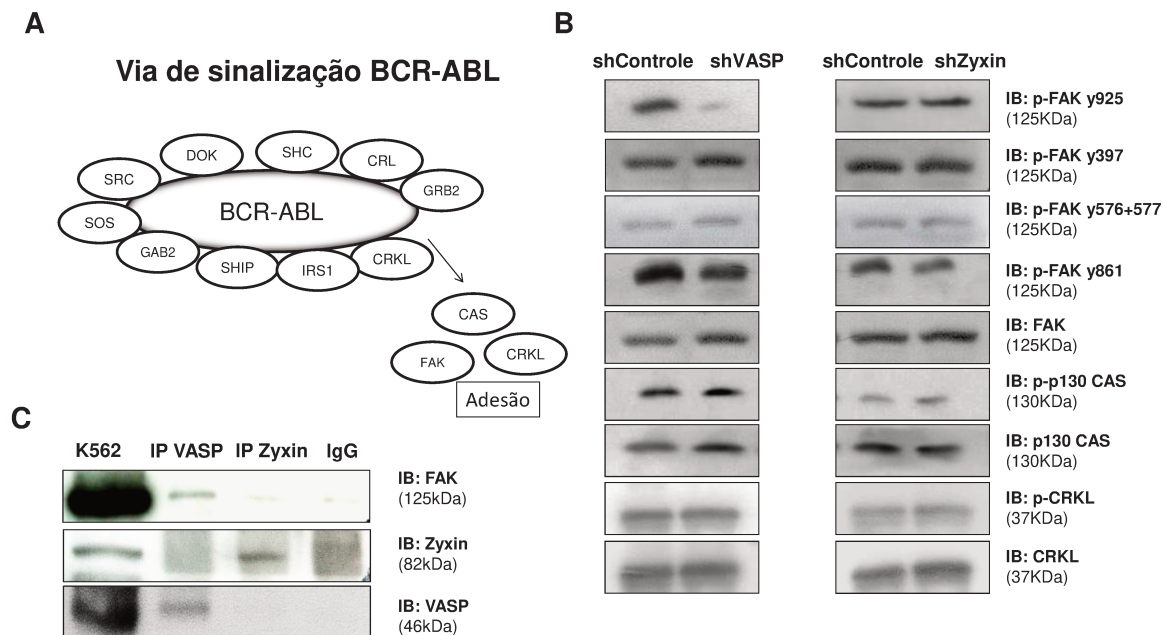


Figura 13. (A) Representação das proteínas de adesão celular da via de sinalização BCR-ABL. (B) Análise por *western blotting* de extrato celular shControle ou shVASP e shZyxin para p-FAK y925, p-FAK y397, p-FAK y576+577, p-FAK y861, FAK, p-p130 CAS, p130CAS, p-CRKL e CRKL. (C) *Western blotting* do imunoprecipitado de VASP e Zyxin e marcação com anticorpos anti-VASP, anti-Zyxin e anti-FAK. Os resultados demonstram interação de VASP e FAK e, também, que VASP não interage com Zyxin em células K562.

4.5 STAT3 e células silenciadas para VASP e Zyxin

Células silenciadas para a VASP apresentaram aumento da fosforilação em tirosina no sítio 705 de STAT3, enquanto que células com inibição de Zyxin não mostraram alteração desta proteína (Figura 14).

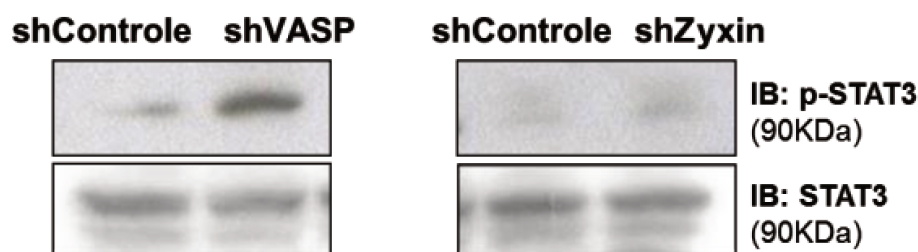


Figura 14. Análise de *western blotting* de extrato celular shControle ou shVASP e shZyxin utilizando anticorpos anti-p-STAT3 y705 e anti-STAT3.

5. Expressão gênica e proteica de VASP e Zyxin ao longo da diferenciação celular

Para avaliar o papel de VASP e Zyxin na hematopoiese, foi analisada a expressão de VASP e Zyxin durante a diferenciação eritroide, granulocítica e megacariocítica, usando modelos de linhagem celular que se diferenciam nestas células. A expressão gênica e proteica de VASP e Zyxin não modularam em células KU812 diferenciadas para eritrócitos (Figura 15A, B e C). Células NB4 diferenciadas para granulócito apresentaram aumento da expressão genica de *VASP* e aumento da expressão proteica de Zyxin (Figura 15D e F). Células K562 diferenciadas para megacariócito apresentaram aumento da expressão gênica (8,7 vezes maior, $P = 0,0115$ e aumento de 3,6 vezes, $P = 0,015$, respectivamente) e proteica de VASP e Zyxin (Figura 15G e H).

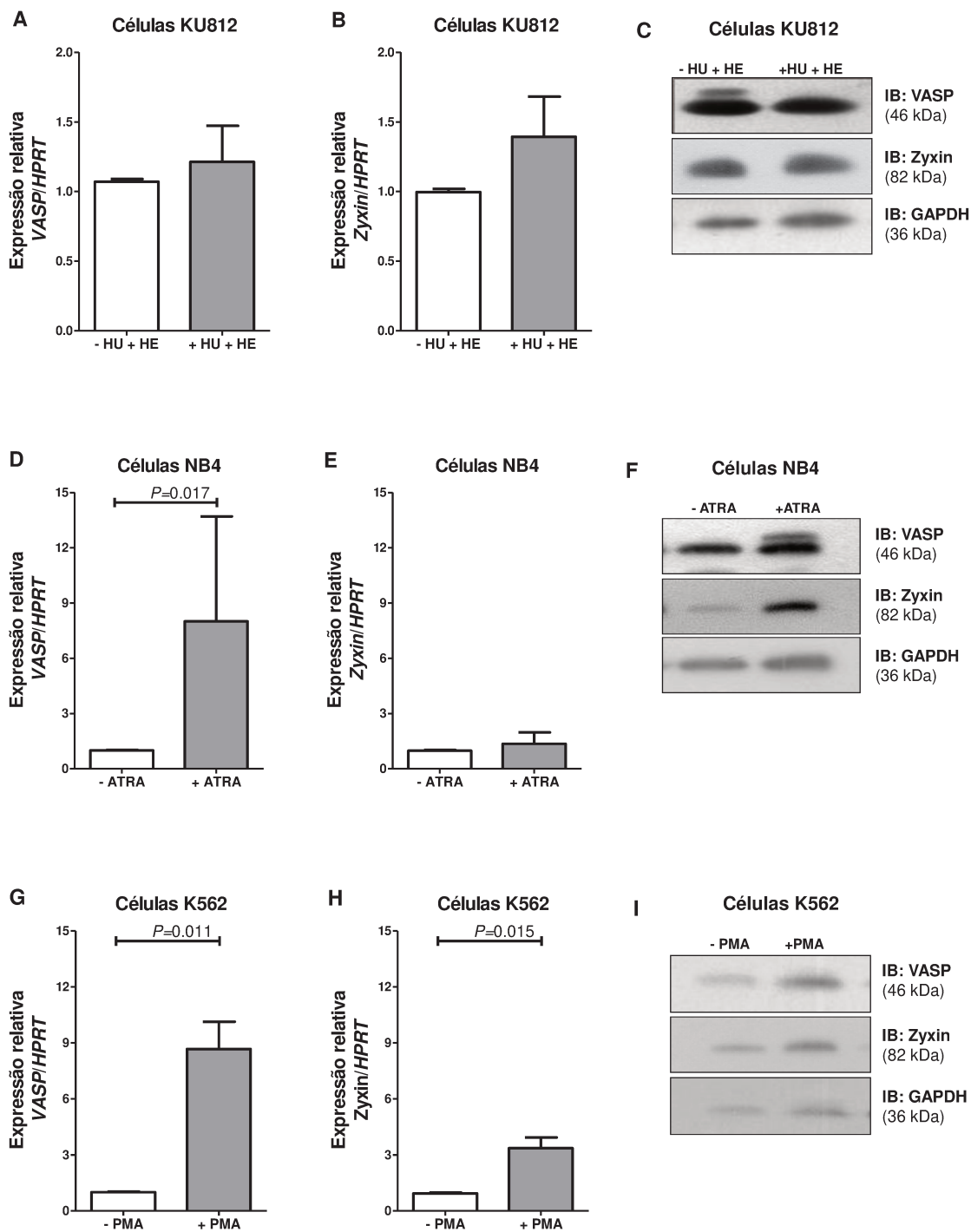


Figura 15. Análise da expressão gênica e proteica de VASP e Zyxin em modelos celulares para a diferenciação eritroide (A-C), granulocítica (D-F) e megacariocítica (G-I). Células não diferenciadas para eritrócitos são representadas por -HU+HE e diferenciadas por +HU+HE, as não diferenciadas para granulócito são representadas por -ATRA e diferenciadas por +ATRA e as não diferenciadas para megacariócitos por -PMA e as diferenciadas por +PMA. Os gráficos de barras representam a média±DP; representativo de três experimentos independentes. O Valor de P está indicado na Figura, análise Teste t de *Student*.

5.1 Expressão de VASP e Zyxin ao longo da diferenciação megacariocítica

Devido ao aumento significativo da expressão gênica e proteica de *VASP* e *Zyxin* na diferenciação para megacariócitos, foi investigado se a presença da proteína BCR-ABL afeta a participação de VASP e Zyxin ao longo desta diferenciação celular. Para isso, células K562 (células positivas BCR-ABL) e HEL (células negativas BCR-ABL) foram diferenciadas para megacariócitos. O resultado observado foi o aumento da expressão da proteína VASP e Zyxin ao longo da diferenciação megacariocítica nas células K562 e Hel (Figura 16A e B, respectivamente), bem como o aumento na forma ativa dessas proteínas (p-VASP ser157 e p-Zyxin ser142). O comportamento proteico indicou que a ativação e expressão de VASP e Zyxin desempenha papel na diferenciação de megacariócitos e que a presença de BCR-ABL não afeta este processo.

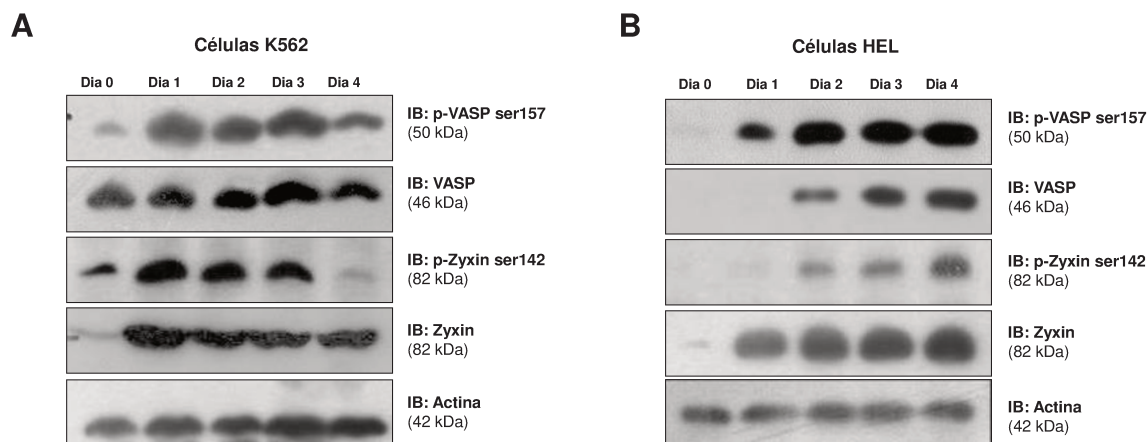


Figura 16. Análise de *Western blotting* apresentando a expressão de p-VASP ser157, VASP, p-Zyxin ser142 e Zyxin durante diferenciação megacariocítica de células K562 (A) e HEL (B). Os dias de indução de diferenciação e as linhagens celulares estão indicados na Figura. As membranas foram re-blotadas com anti-Actina como controle.

5.2. Efeito do silenciamento de VASP e Zyxin na diferenciação de megacariócitos

Para entender a importância de VASP e Zyxin na regulação da diferenciação de megacariócitos, células shVASP, shZyxin e shControle foram induzidas à diferenciação megacariocítica com tratamento de PMA. Durante o tratamento, as células foram analisadas de acordo com a porcentagem de células que expressa CD61 (integrina $\beta 3$) na membrana celular. Células inibidas para VASP tiveram redução significativa da população marcada com CD61 (Figura 17A), já as células inibidas para Zyxin não apresentaram diferença na população de células marcada com CD61 em comparação às células shControle (Figura 17B). A diminuição da expressão do marcador CD61 em células inibidas demonstrou que a ausência da proteína VASP afeta a diferenciação megacariocítica.

Como não observamos diferença na porcentagem da população marcada com CD61 nas células shZyxin, decidimos confirmar se as células continuavam com a inibição ao longo da diferenciação megacariocítica. Desta maneira, realizamos a análise da expressão gênica de células inibidas para *Zyxin* durante os dias da diferenciação e observamos que a inibição se manteve até o último dia (Figura 17C).

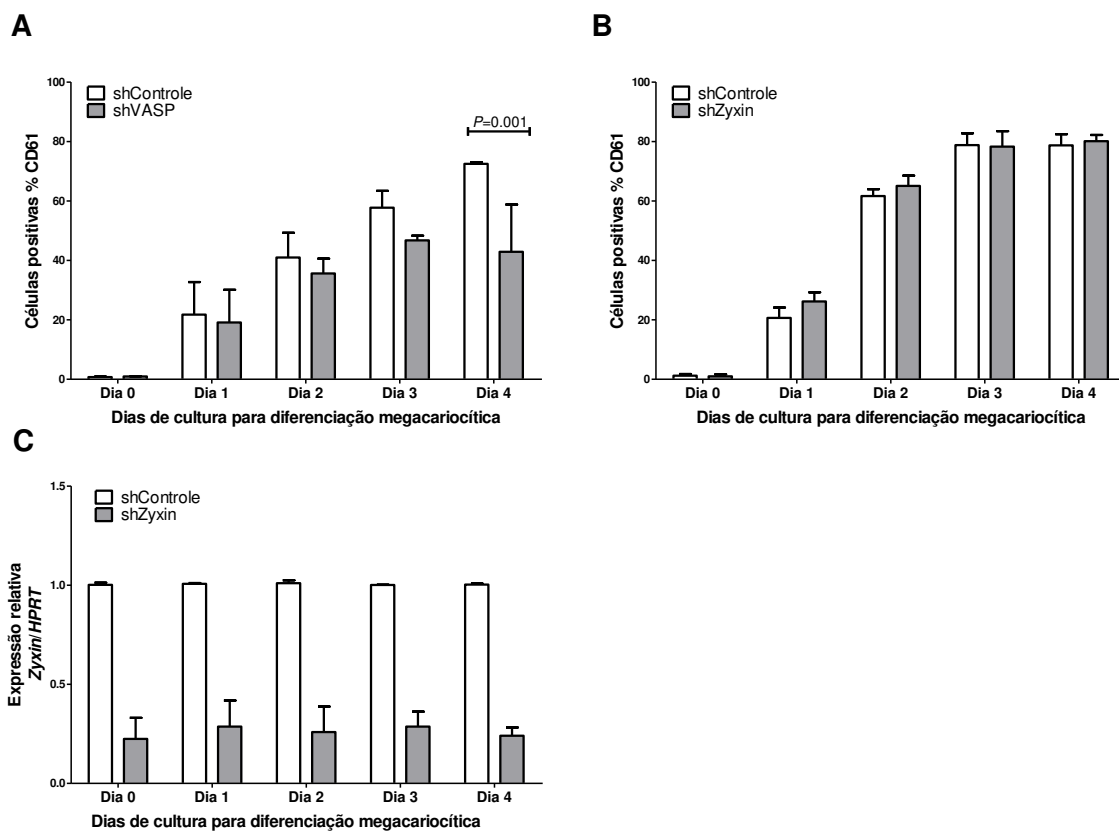


Figura 17. (A) e (B) Porcentagem da população CD61 em células K562 shControle ou shVASP e shZyxin, respectivamente, durante a diferenciação megacariocítica. (C) Análise da expressão gênica de *Zyxin* em células shZyxin ao longo da diferenciação megacariocítica. Os resultados são apresentados como média±DP e é representativo de três experimentos independentes. Teste *Two-Way Anova* e pós-teste *Bonferroni*.

DISCUSSÃO

A proteína ABL desempenha papel chave na regulação de diversos processos celulares, incluindo a organização do citoesqueleto e adesão celular [73]. A oncoproteína BCR-ABL presente nos pacientes com LMC também influencia o citoesqueleto e afeta a adesão de células leucêmicas ao estroma da medula óssea [74]. Em *Drosófila*, Abl modula a dinâmica do citoesqueleto através de sua interação com Ena [53] e em mamíferos ABL interage com VASP através do conector Abi e VASP também é substrato de BCR-ABL [53]. A relação entre a atividade oncogênica do BCR-ABL e seu papel na LMC não é completamente conhecida, assim, estudamos o papel das proteínas VASP e Zyxin em pacientes com LMC e na via de sinalização BCR-ABL, além disso, estudamos a expressão destas proteínas na diferenciação hematopoiética.

Sabe-se que a VASP é fosforilada em tirosina por BCR-ABL em células leucêmicas [53], no entanto, a relação entre a fosforilação de VASP em serina 157 e células BCR-ABL positivas é desconhecida. VASP é um importante regulador da dinâmica do citoesqueleto de actina, as funções e interações de VASP com outras proteínas são reguladas pela sua fosforilação em serina 157 [11]. Uma vez que a fosforilação em serina 157 é essencial para regular funções da VASP na adesão e migração [56] [57], estudamos aqui a expressão de p-VASP ser157 em células totais de medula óssea de pacientes com LMC e observamos que não há fosforilação da VASP ser157 nestes pacientes ao diagnóstico. Sabe-se que a ativação de PKA interrompe a interação VASP-ABL, bloqueando a ligação da VASP ao domínio SH3 do ABL [75]. A inibição da atividade de PKA impede a fosforilação da VASP ser157 e promove a associação de VASP a ABL [58]. Estes resultados sugerem que a ausência de p-VASP ser157 em pacientes com LMC pode promover a interação da VASP com a oncoproteína BCR-ABL.

Em drosófila, Abl regula a localização intracelular de Ena e na ausência de Abl, Ena localiza-se na adesão celular [76]. Abl pode impedir Ena de se ligar à proteínas de adesão celular ou pode promover a ligação de Ena à proteínas que a mantêm no citoplasma [76]. Além disso, foi relatado que p-VASP ser157 localiza-se nas adesões focais e que o estímulo celular por PKA faz com que VASP vá para a adesão focal [56] [57]. Desta maneira, nossos resultados indicam que a ausência de p-VASP ser157 em células de pacientes com LMC promove a interação de VASP com BCR-ABL, mantendo, assim, VASP no citoplasma e prevenindo a localização de VASP na adesão celular, podendo contribuir para a alterada adesão das células leucêmicas.

Nossos resultados mostram que os pacientes com LMC tratados com ITK restauram a expressão de p-VASP ser157. A atividade de p-VASP ser157 foi analisada em dois estágios diferentes da doença em um mesmo paciente. No momento do diagnóstico, não havia expressão de p-VASP ser157, mas após tratamento com imatinibe, o mesmo paciente passa a expressar p-VASP ser157. Interessantemente, pacientes em remissão que fizeram tratamento com outros ITK como dasatinibe, nilotinibe, bosutinibe apresentaram, também, p-VASP ser157. Já foi descrito que ITK aumentam a atividade de PKA, tendo sido até sugerido o aumento de PKA como alvo terapêutico para LMC [77]. Após o tratamento com ITK, a atividade de PKA deve aumentar em pacientes responsivos, fosforilando, então, VASP em serina 157. De acordo com esta ideia, observamos o aumento na expressão de p-VASP ser157 em células K562 tratadas com imatinibe. Nossa hipótese seria que, em pacientes responsivos ao tratamento com ITK, a presença de p-VASP ser157 passa a impedir a interação de VASP com BCR-ABL, translocando VASP para os sítios de adesão celular, restaurando, assim, a adesão das células leucêmicas. Interessante que alteração na via de sinalização de PKA já foi descrita em diferentes tumores [78]. Os

pacientes com LMC resistentes a ITK não apresentam p-VASP ser157, reforçando a idéia do papel da p-VASP ser157 na patogênese da LMC e no tratamento com ITK. Nossa hipótese está ilustrada na Figura 18.

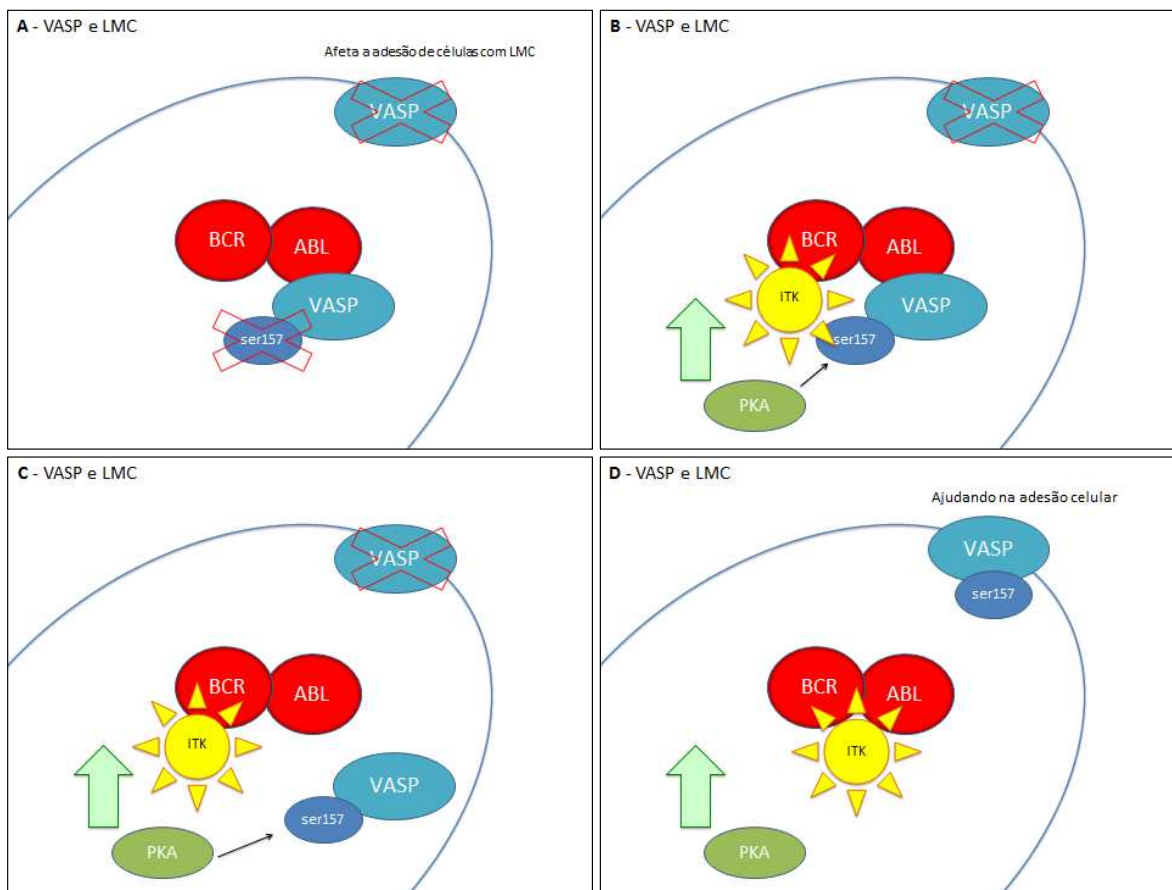


Figura 18. (A) Em células BCR-ABL positivas, VASP não fosforilada está associada ao BCR-ABL e não participa da adesão celular. (B). O tratamento com inibidores de tirosina quinase (ITK) resulta em aumento de PKA e consequente fosforilação de VASP em ser157. (C) Essa fosforilação induz a dissociação da VASP do complexo BCR-ABL. (D) Sem estar ligada ao ABL, VASP vai atuar na adesão celular.

Para uma melhor compreensão da via de sinalização BCR-ABL e os efeitos da interação da VASP e BCR-ABL, inibimos a expressão de VASP e Zyxin em células K562. O silenciamento de VASP e Zyxin diminuiu a expressão das proteínas anti-apoptóticas

BCL-2 e BCL-XL. Assim, propomos um novo papel das proteínas VASP e Zyxin na regulação da apoptose, além do papel destas proteínas na adesão celular.

Na literatura, não há informações sobre o papel de VASP na apoptose; entretanto, há controvérsias sobre o papel da Zyxin como proteína reguladora da apoptose [79] [80]. Sabe-se que uma das estratégias para o tratamento de câncer é fazer uso de quimioterápicos que induzam a eliminação completa de células tumorais ao estimular a apoptose celular. STAT-3 induz a expressão de genes anti-apoptóticos BCL-2 e BCL-XL [81] [82] [60]. A ativação de STAT-3 contribui para a sobrevivência de células leucêmicas mesmo com a completa inibição de BCR-ABL, esta ativação de STAT-3 está relacionada com a resistência de pacientes LMC a ITK [60]. Demonstramos que células inibidas para VASP apresentam aumento de p-STAT3 tyr705, indicando uma possível participação de VASP nesta via em pacientes com LMC. A compreensão dos mecanismos que levam a sobrevivência de células leucêmicas após tratamento com ITK é importante para obtenção de novas estratégias terapêuticas para pacientes resistentes.

Nós demonstramos que a VASP interage e seu silenciamento diminuiu a fosforilação da FAK, apontando um possível papel da VASP na hematopoiese ao controlar através de FAK a migração e adesão de células leucêmicas em pacientes com LMC. Na progressão da doença, as células leucêmicas infiltram o fígado, rim e baço, em consequência da alterada adesão de células leucêmicas ao estroma da medula óssea [74]. Além disso, a FAK tem também sido apontada como proteína anti-apoptótica [83]. Assim, o papel funcional de VASP em regular a atividade da FAK pode estar envolvido com a adesão e a apoptose de células BCR-ABL positivas. Nossos resultados demonstram que VASP interage com FAK, mas que VASP não se associa com Zyxin em células K562. A ausência de interação entre VASP e Zyxin em células K562 foi descrita recentemente por

Maruoka e colaboradores [55], eles demonstraram que VASP é fosforilada no sítio 39 de tirosina pelo BCR-ABL e que esta fosforilação resulta na ausência de interação entre o domínio EVH1 da VASP e a região rica em prolina da Zyxin.

Para descrever a participação da VASP e Zyxin na diferenciação hematopoiética, estudamos a expressão de VASP e Zyxin em modelos de linhagens celulares. Em pacientes com LMC, o processo de diferenciação hematopoiética é afetado na crise blástica [84]. O aumento da expressão e atividade de VASP e Zyxin durante a diferenciação megacariocítica sugere uma importante função dessas proteínas durante esta diferenciação. Utilizando o marcador CD61, demonstramos que a depleção de VASP reduz a diferenciação celular. Foi descrito na literatura que camundongos nocautes para a VASP apresentam hiperplasia de megacariócitos na medula óssea [85], mesmo tipo de alteração encontrada em pacientes com LMC [86]. De acordo com nossos resultados, um recente estudo descreveu que a diferenciação de megacariócitos é acompanhada de aumento nos níveis de AMPc, PKA, VASP e p-VASP ser157 e 239 [87]. Esses resultados, juntamente com os nossos, indicam a participação de p-VASP ser157 na maturação de megacariócitos e que a ausência de p-VASP ser157 em pacientes com LMC pode afetar a diferenciação de megacariócitos na LMC.

Nossos resultados indicam um possível envolvimento de p-VASP ser157 na patogênese da LMC e no tratamento com ITK. A falta de p-VASP ser157 em células da medula óssea de pacientes com LMC pode ser consequência de uma desregulação da via de sinalização de PKA nestes pacientes. Nossos resultados estão de acordo com a ideia de que p-VASP ser157 não se associa a ABL e localiza-se nas junções aderentes, enquanto a VASP não fosforilada em ser157 associa-se ao BCR-ABL e pode contribuir para a alterada adesão das células leucêmicas a células do estroma, contribuindo para a migração e invasão

dessas células. Além disso, VASP regula a apoptose e a diferenciação megacariocítica, indicando papel importante da VASP na hematopoiese leucêmica.

CONCLUSÕES

O conjunto de resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

1. VASP e Zyxin são expressas nas linhagens leucêmicas, sendo que Zyxin é mais expressa nas linhagens mieloides que linfoides
2. VASP está diferencialmente ativa em pacientes LMC, afetando, provavelmente, a diferenciação e a adesão destas células. A diferença na expressão de p-VASP ser157 nos pacientes em diferentes estágios da LMC indica a participação desta proteína na patologia da doença.
3. VASP e Zyxin participam da via BCR-ABL modulando proteínas relacionadas com apoptose.
4. VASP interage com FAK e afeta sua atividade.
5. VASP afeta a atividade de STAT3, estando, provavelmente, envolvida na sobrevivência das células leucêmicas.
6. VASP e Zyxin estão envolvidas na diferenciação de células hematopoiéticas, principalmente na diferenciação megacariocítica.

REFERÊNCIAS

1. Chhabra, E.S. and H.N. Higgs, *The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1110-21.
2. Gascard, P. and N. Mohandas, *New insights into functions of erythroid proteins in nonerythroid cells*. Curr Opin Hematol, 2000. **7**(2): p. 123-9.
3. Reinhard, M., T. Jarchau, and U. Walter, *Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(4): p. 243-9.
4. Bear, J.E. and F.B. Gertler, *Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 12): p. 1947-53.
5. Ball, L.J., et al., *EVH1 domains: structure, function and interactions*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 45-52.
6. Bachmann, C., et al., *The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23549-57.
7. Renfranz, P.J. and M.C. Beckerle, *Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(1): p. 88-103.
8. Critchley, D.R., et al., *Integrin-mediated cell adhesion: the cytoskeletal connection*. Biochem Soc Symp, 1999. **65**: p. 79-99.
9. Harper, M.T. and A.W. Poole, *Isoform-specific functions of protein kinase C: the platelet paradigm*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 5): p. 1005-8.
10. Blume, C., et al., *AMP-activated protein kinase impairs endothelial actin cytoskeleton assembly by phosphorylating vasodilator-stimulated phosphoprotein*. J Biol Chem, 2007. **282**(7): p. 4601-12.
11. Harbeck, B., et al., *Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 30817-25.
12. Beckerle, M.C., *Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion*. Bioessays, 1997. **19**(11): p. 949-57.
13. Hansen, M.D. and M.C. Beckerle, *Opposing roles of zyxin/LPP ACTA repeats and the LIM domain region in cell-cell adhesion*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 16178-88.
14. Ermolina, L.V., N. Martynova, and A.G. Zaraiskii, *[The cytoskeletal protein zyxin--a universal regulator of cell adhesion and gene expression]*. Bioorg Khim, 2010. **36**(1): p. 29-37.
15. Drees, B., et al., *Characterization of the interaction between zyxin and members of the Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein family of proteins*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22503-11.
16. Grange, J., et al., *Zyxin-VASP interactions alter actin regulatory activity in zyxin-VASP complexes*. Cell Mol Biol Lett, 2013. **18**(1): p. 1-10.
17. Moody, J.D., et al., *A zyxin head-tail interaction regulates zyxin-VASP complex formation*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **378**(3): p. 625-8.
18. Sperry, R.B., et al., *Zyxin controls migration in epithelial-mesenchymal transition by mediating actin-membrane linkages at cell-cell junctions*. J Cell Physiol, 2010. **222**(3): p. 612-24.
19. Hoffman, L.M., et al., *Genetic ablation of zyxin causes Mena/VASP mislocalization, increased motility, and deficits in actin remodeling*. J Cell Biol, 2006. **172**(5): p. 771-82.
20. Call, G.S., et al., *Zyxin phosphorylation at serine 142 modulates the zyxin head-tail interaction to alter cell-cell adhesion*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **404**(3): p. 780-4.
21. Yoshigi, M., et al., *Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement*. J Cell Biol, 2005. **171**(2): p. 209-15.

22. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
23. Wang, W., et al., *Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(3): p. 138-45.
24. Wang, W., et al., *Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(23): p. 8585-94.
25. Yamaguchi, H. and J. Condeelis, *Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(5): p. 642-52.
26. Kurschat, P. and C. Mauch, *Mechanisms of metastasis*. Clin Exp Dermatol, 2000. **25**(6): p. 482-9.
27. Rao, J. and N. Li, *Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development*. Curr Cancer Drug Targets, 2004. **4**(4): p. 345-54.
28. Dertsiz, L., et al., *Differential expression of VASP in normal lung tissue and lung adenocarcinomas*. Thorax, 2005. **60**(7): p. 576-81.
29. Han, G., et al., *Positive regulation of migration and invasion by vasodilator-stimulated phosphoprotein via Rac1 pathway in human breast cancer cells*. Oncol Rep, 2008. **20**(4): p. 929-39.
30. Tao, Y., et al., *Phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein is localized on mitotic spindles of the gastric cancer cell line SGC-7901*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(46): p. 7478-81.
31. Sanchez-Carbayo, M., et al., *Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes*. Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 6973-80.
32. Sy, S.M., et al., *Novel identification of zyxin upregulations in the motile phenotype of hepatocellular carcinoma*. Mod Pathol, 2006. **19**(8): p. 1108-16.
33. van der Gaag, E.J., et al., *Role of zyxin in differential cell spreading and proliferation of melanoma cells and melanocytes*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(2): p. 246-54.
34. Wang, Y., et al., *Gene selection from microarray data for cancer classification--a machine learning approach*. Comput Biol Chem, 2005. **29**(1): p. 37-46.
35. Hehlmann, R., A. Hochhaus, and M. Baccarani, *Chronic myeloid leukaemia*. Lancet, 2007. **370**(9584): p. 342-50.
36. Faderl, S., et al., *Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy*. Ann Intern Med, 1999. **131**(3): p. 207-19.
37. Ferrari, S. and G. Thomas, *S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1994. **29**(6): p. 385-413.
38. Shet, A.S., B.N. Jahagirdar, and C.M. Verfaillie, *Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression*. Leukemia, 2002. **16**(8): p. 1402-11.
39. Nadav, L. and B.Z. Katz, *The molecular effects of oncogenesis on cell-extracellular matrix adhesion (review)*. Int J Oncol, 2001. **19**(2): p. 237-46.
40. Marley, S.B. and M.Y. Gordon, *Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven*. Clin Sci (Lond), 2005. **109**(1): p. 13-25.
41. O'Hare, T., et al., *Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia*. Clin Cancer Res. **17**(2): p. 212-21.
42. Sokal, J.E., et al., *Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia*. Blood, 1984. **63**(4): p. 789-99.
43. MLLF, C., *Análise citogenética e FISH no monitoramento da LMC em tratamento com inibidores da tirosino quinase*. Rev Bras Hematol Hemoter. , 2008: p. 30(Supl 1):13-9.
44. Baccarani, M., et al., *Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet*. J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 6041-51.

45. Silver, R.T., et al., *An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology*. Blood, 1999. **94**(5): p. 1517-36.
46. Pytel, D., et al., *Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy*. Anticancer Agents Med Chem, 2009. **9**(1): p. 66-76.
47. Alfano, F.D., *A stochastic model of oncogene expression and the relevance of this model to cancer therapy*. Theor Biol Med Model, 2006. **3**: p. 5.
48. Jacquet, A., et al., *Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage*. FASEB J, 2003. **17**(14): p. 2160-2.
49. Druker, B.J., et al., *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1031-7.
50. Baker, S.J. and E.P. Reddy, *Targeted inhibition of kinases in cancer therapy*. Mt Sinai J Med, 2010. **77**(6): p. 573-86.
51. La Rosee, P. and M.W. Deininger, *Resistance to imatinib: mutations and beyond*. Semin Hematol, 2010. **47**(4): p. 335-43.
52. Seke Etet, P.F., L. Vecchio, and A.H. Nwabo Kamdje, *Signaling pathways in chronic myeloid leukemia and leukemic stem cell maintenance: key role of stromal microenvironment*. Cell Signal, 2012. **24**(9): p. 1883-8.
53. Stevens, T.L., et al., *Using Bcr-Abl to examine mechanisms by which abl kinase regulates morphogenesis in Drosophila*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(1): p. 378-93.
54. Goss, V.L., et al., *A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4888-97.
55. Maruoka, M., et al., *Abl-1-bridged tyrosine phosphorylation of VASP by Abelson kinase impairs association of VASP to focal adhesions and regulates leukaemic cell adhesion*. Biochem J, 2012. **441**(3): p. 889-99.
56. Benz, P.M., et al., *Differential VASP phosphorylation controls remodeling of the actin cytoskeleton*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 21): p. 3954-65.
57. Howe, A.K., *Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1692**(2-3): p. 159-74.
58. Howe, A.K., B.P. Hogan, and R.L. Juliano, *Regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and interaction with Abl by protein kinase A and cell adhesion*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38121-6.
59. Lambrechts, A., et al., *cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36143-51.
60. Nair, R.R., J.H. Tolentino, and L.A. Hazlehurst, *Role of STAT3 in Transformation and Drug Resistance in CML*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 30.
61. Song, L., et al., *Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells*. Oncogene, 2003. **22**(27): p. 4150-65.
62. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
63. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio, *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. Blood, 1975. **45**(3): p. 321-34.
64. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.

65. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
66. Machado-Neto, J.A., et al., *Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(8): p. 1404-11.
67. Machado-Neto, J.A., et al., *Downregulation of IRS2 in myelodysplastic syndrome: a possible role in impaired hematopoietic cell differentiation*. Leuk Res. **36**(7): p. 931-5.
68. Horstrup, K., et al., *Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition*. Eur J Biochem, 1994. **225**(1): p. 21-7.
69. Albajar, M., et al., *MYC in chronic myeloid leukemia: induction of aberrant DNA synthesis and association with poor response to imatinib*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(5): p. 564-76.
70. Gilda, J.E. and A.V. Gomes, *Stain Free Total Protein Staining is a Superior Loading Control to beta-Actin for Western Blots*. Anal Biochem, 2013.
71. Romero-Calvo, I., et al., *Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots*. Anal Biochem, 2010. **401**(2): p. 318-20.
72. Jordan, M.A. and L. Wilson, *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 253-65.
73. Hernandez, S.E., et al., *How do Abl family kinases regulate cell shape and movement?* Trends Cell Biol, 2004. **14**(1): p. 36-44.
74. Fierro, F.A., et al., *BCR/ABL expression of myeloid progenitors increases beta1-integrin mediated adhesion to stromal cells*. J Mol Biol, 2008. **377**(4): p. 1082-93.
75. Pluk, H., K. Dorey, and G. Superti-Furga, *Autoinhibition of c-Abl*. Cell, 2002. **108**(2): p. 247-59.
76. Grevengoed, E.E., et al., *Balancing different types of actin polymerization at distinct sites: roles for Abelson kinase and Enabled*. J Cell Biol, 2003. **163**(6): p. 1267-79.
77. Weissinger, E.M., et al., *Activation of protein kinase A (PKA) by 8-Cl-cAMP as a novel approach for antileukaemic therapy*. Br J Cancer, 2004. **91**(1): p. 186-92.
78. Ko, F.C., et al., *PKA-induced dimerization of the RhoGAP DLC1 promotes its inhibition of tumorigenesis and metastasis*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1618.
79. Crone, J., et al., *Zyxin is a critical regulator of the apoptotic HIPK2-p53 signaling axis*. Cancer Res, 2011. **71**(6): p. 2350-9.
80. Hervy, M., et al., *The LIM Protein Zyxin Binds CARP-1 and Promotes Apoptosis*. Genes Cancer, 2010. **1**(5): p. 506-515.
81. Cuevas, P., et al., *Dobesilate inhibits the activation of signal transducer and activator of transcription 3, and the expression of cyclin D1 and bcl-XL in glioma cells*. Neurol Res, 2006. **28**(2): p. 127-30.
82. Gritsko, T., et al., *Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(1): p. 11-9.
83. Sonoda, Y., et al., *Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK). Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16309-15.
84. Ernst, T. and A. Hochhaus, *Chronic myeloid leukemia: clinical impact of BCR-ABL1 mutations and other lesions associated with disease progression*. Semin Oncol, 2012. **39**(1): p. 58-66.

85. Hauser, W., et al., *Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8120-5.
86. Cortes, J. and H. Kantarjian, *Advanced-phase chronic myeloid leukemia*. Semin Hematol, 2003. **40**(1): p. 79-86.
87. Begonja, A.J., et al., *Differential roles of cAMP and cGMP in megakaryocyte maturation and platelet biogenesis*. Exp Hematol, 2013. **41**(1): p. 91-101 e4.

ANEXO I

 **FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-8925
🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 24/05/05.
(Grupo I)

PARECER PROJETO: Nº 124/2005

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL E CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE NOVOS GENES ALVO E NOVAS TERAPÊUTICAS NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS E EM LINHAGENS LEUCÊMICAS"
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Terezinha Olalla Saad
INSTITUIÇÃO: Centro de Hematologia e Hemoterapia - UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/05/2005
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/05/06

II - OBJETIVOS

O projeto visa a investigação funcional de novos genes alvo e novas terapêuticas nas mielodisplasias. Em vista de não haver modelos de células ou animais com mielodisplasias, para cumprimento de alguns objetivos serão utilizados linhagens leucêmicas. Analisar a regulação da expressão dos genes ARHGAP10, MASK em linhagens leucêmicas submetidas a diferentes agentes terapêuticos cultivadas em suspensão. Analisar a expressão diferencial dos genes ARHGAP10 e MASK em células de pacientes com SMDs cultivadas em suspensão e um ambiente de células estromais submetidas a diferentes terapias anti-tumorais. Huperexpressar MASK e ARHGAP10 em células hematopoéticas e verificar o perfil de expressão gênica por microarray. Induzir Ros e verificar a expressão de MASK, ARHGAP10, formita, APAF e FLIP. Verificar a expressão das isoformas de APAF e FLIP em células de medula óssea de pacientes com mielodisplasias e correlacionar com subgrupo e IPSS. Verificar a expressão de formita em células linfóides de pacientes com SMD e correlacionar com padrão de celularidade da medula óssea, grau de anemia, subgrupo de SMD e IPSS. Verificar a expressão de WT1 e PRAME e correlacionar com subgrupo de SMD e IPSS. Verificar o crescimento de colônias a partir de células precursoras de medula óssea de pacientes com SMD, em culturas de longa duração, submetidas a tratamento com diferentes drogas. Verificar a expressão de citocinas e moléculas de adesão em células aderente da cultura de longa duração. Verificar o perfil de expressão gênica de células CD34 + de pacientes co SMD, utilizando conjunto de genes conhecidos e transcritos humanos novos, imobilizados em lâminas de microarrays. Verificar a capacidade da célula dendrítica de SMD, derivada de célula mononuclear, induzir imunogenicidade quando transformada com mRNA de WT1. Investigar mutações nos genes PTPN11, AML-1, FLT3 e GATA-1 e verificara se estas mutações se relacionam com subgrupo de SMD, IPSS, progressão para leucemia.

- 1 -

III - SUMÁRIO

Para esse estudo participação, no mínimo, 34 pacientes, 23 mulheres, 11 homens, com idade entre 18 e 89 anos; sendo que pacientes novos admitidos no serviço serão convidados a participar. Serão incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica, acompanhados no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp por pelo menos 6 meses. o diagnóstico será feito com base em critérios clínicos e morfológicos, utilizados no serviço há pelo menos 15 anos, com exclusão de causas como carências vitamínicas, doenças inflamatórias, infecciosas, hepáticas, renais, endócrinas e outras neoplasias. Os pacientes e controles que aceitarem voluntariamente em participar do estudo serão submetidos a coleta de 5ml de medula óssea para extração de mRNA; citometria de fluxo para análise de PRAME, formina em leucócitos e células dendríticas; cultivo de células estromais (apenas em pacientes com idade acima de 65 anos); tratamento *in vitro* de células em suspensão com agentes terapêuticos (apenas pacientes com idade acima de 65 anos); tratamento *in vitro* com agentes terapêuticos em ambiente de células estromais (apenas pacientes com idade acima de 65 anos); extração de DNA para investigação das mutações.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

É um projeto bem elaborado, condizente com as normas do CEP e do CONEP. Apresenta bibliografia atualizada; o orçamento tem como fonte financiadora a FAPESP, no valor de R\$ 250.000,00. Após modificações o TCLE ficou adequado.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.)

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro

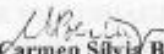
centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2 e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2005.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO II

Resumo Projeto Temático - processo nº 05/51681-1

Título: "Investigação funcional e caracterização do envolvimento de novos genes alvo e novas terapêuticas nas síndromes mielodisplásicas e em linhagens leucêmicas"

As síndromes mielodisplásicas (SDMs) constituem um grupo heterogêneo de desordens hematopoiéticas, que exibem hematopoiese ineficaz. Pouco se sabe a respeito da patogênese das SMDs e dos processos que medeiam a sua freqüente transformação em leucemias. Nos últimos anos tem se tomado evidente que alterações na composição e/ou função do microambiente celular podem ser implicadas na progressão de diversas desordens hematológicas, particularmente em SMDs. Novas terapias têm sido propostas a partir das características biológicas deste tipo de tumor, porém os eventos moleculares responsáveis pela manutenção ou propagação da população clonal anômala permanecem ainda desconhecidos, sendo que muitas vezes os agentes terapêuticos utilizados não são alvo-específico. Sendo assim, a caracterização de alvos moleculares importantes para os processos de diferenciação e progressão tumoral mielóide poderá fornecer informações que podem contribuir para a geração de novas drogas com maior e melhor especificidade de ação. A partir do Projeto Genoma Humano, diversos genes novos têm sido identificados, muitos deles apresentando grande potencial para alvos terapêuticos. A proposta deste projeto é a caracterização da regulação da expressão de novos genes, especificamente: ARHGAP21, MASK e Formina, assim como de outras proteínas, nas mielodisplasias, frente a diferentes tratamentos, visando investigar mecanismos moleculares deste tipo de tumor e o desenvolvimento de novas estratégias para terapia anti-tumoral. Em vista de não haver modelos de células ou animais com mielodisplasia, para cumprimento de alguns objetivos utilizaremos linhagens leucêmicas como modelos. Além disso mutações serão pesquisadas em genes que podem se associar com evolução para leucemia como PTPN11, FLT3, AML-1, GATA-1 .

PALAVRAS- CHAVES: mielodisplasia, MASK, ARHGAP 21, Formina, estroma , APAF-1

ANEXO III -Artigo

Absence of phospho-VASP ser157 in chronic myeloid leukemia patients and VASP involvement in BCR-ABL pathway

Bernusso VA¹, Machado-Neto JA¹, Pericole FV¹, Vieira KP¹, Duarte ASS¹, Traina F¹, Hansen MD², Olalla Saad ST¹, Barcellos KSA¹.

¹Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas/Hemocentro-Unicamp, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Campinas, 13083-878, São Paulo, Brazil

² Department of Physiology and Developmental Biology, Brigham Young University, Provo, Utah 84602

Corresponding Author:

Karin S. A. Barcellos. PhD

Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas

Rua Carlos Chagas, 480, CEP 13083-878

Campinas, SP, Brazil

Phone: 55-19-35218734; Fax: 55-19-3289-1089

E-mail: kabarcellos@gmail.com

Keywords: VASP, Zyxin, CML, BCR-ABL.

Abstract

Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is an actin regulatory protein that controls cellular adhesion and motility. PKA phosphorylates VASP at serine 157 regulating VASP cellular functions. VASP interacts with ABL and is a substrate of BCR-ABL oncoprotein. The presence BCR-ABL protein drives oncogenesis in patients with chronic myeloid leukemia (CML) due to a constitutive activation of tyrosine kinase activity. The function of phospho-VASP ser157 in CML and the role of VASP in BCR-ABL pathway remain unknown. We described here an absence of phospho-VASP ser157 in CML bone marrow cells, in contrast to healthy donors. Imatinib responsive patients restore phospho-VASP ser157 expression and the resistant patients do not present this activated protein. In K562 cells we observed that VASP

modulates anti-apoptotic proteins BCL-2 and BCL-XL. VASP depletion in K562 cells decreases FAKy925 activity. Levels of VASP and phospho-VASP ser157 increases during megakaryocyte differentiation and VASP inhibition affects this differentiation. We identify here a possible involvement of phospho-VASP ser157 in CML pathogenesis, the lack of phospho-VASP ser157 in CML cells may promote VASP/BCR-ABL interaction which could affect cellular adhesion of leukemic cells. Since VASP regulates anti-apoptotic proteins and megakaryocyte formation; the lack of phospho-VASP ser157 in CML patients may be implicated with the aberrant megakaryocyte differentiation found in CML. VASP ser157 activity appears as a new target in CML pathogenesis and therapeutic monitoring tool.