

MATEUS MILANI

“DESENVOLVIMENTO DE MODELO ANIMAL DE
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA PEDIÁTRICA:
TESTE ELISA PARA MONITORAR PROGRESSÃO
DA LEUCEMIA”

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MATEUS MILANI

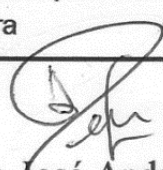
“Desenvolvimento de modelo animal de leucemia linfóide aguda pediátrica: teste ELISA para monitorar progressão da leucemia”

Este exemplar corresponde à
redação final da
DISSERTAÇÃO defendida
pelo candidato

MATEUS MILANI

e aprovada pela Comissão
Julgadora

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
Título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal e
Evolução.


Orientador: Dr. José Andres Yunes

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Milani, Mateus, 1985-
M589d Desenvolvimento de modelo animal de leucemia linfóide aguda pediátrica :
teste ELISA para monitorar a progressão da leucemia / Mateus Milani. –
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: José Andrés Yunes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Leucemia linfóide aguda - Diagnóstico. 2. Proteínas de choque térmico
HSP90. 3. Ensaio de imunoadsorção enzimática. 4. Modelos animais. I. Yunes,
José Andrés. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Acute lymphoblastic leukemia animal model development : leukemia
progression monitoring by ELISA

Palavras-chave em inglês:

Acute lymphoblastic leukemia - Diagnosis

HSP90 heat-shock proteins

Enzyme-linked immunosorbent assay

Animal models

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

José Andrés Yunes [Orientador]

João Ernesto de Carvalho

Mônica Barbosa de Melo

Data de defesa: 12-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 12 de fevereiro de 2014

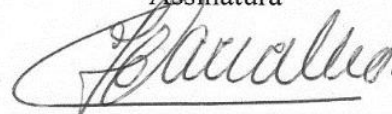
BANCA EXAMINADORA

Dr. José Andres Yunes (orientador)



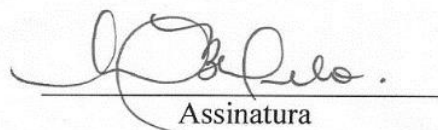
Assinatura

Dr. João Ernesto de Carvalho



Assinatura

Dra. Mônica Barbosa de Melo



Assinatura

Prof. Dr, Fabio Papes

Assinatura

Dr, Pedro Otavio De Campos Lima

Assinatura

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common type of childhood cancer . The transplantation of human primary ALL cells in immunodeficient mice has been of much importance for understanding the disease's pathophysiology and testing new drugs. Unlike animal models of solid tumors whose volume is easily measured on the animal surface, the ALL infiltrates organs that are inaccessible to external antigens, hence the need to define more suitable methods for monitoring the disease's progression. Results presented here indicate that proteins secreted by the ALL can serve as quantitative markers of leukemic burden and are easily measured by ELISA of blood plasma samples. Among three tested proteins (B2M, IGFBP2 and Hsp90), Hsp90 ELISA analysis showed higher sensitivity than the analysis of leukemic cells on animal blood by flow cytometry of anti- huCD45 labeled cells. The levels of Hsp90 in human blood plasma were shown to be positively correlated with the percentage of leukemic cells in the bone marrow and liver and to a lesser extent with the levels in the spleen and peripheral blood (PB) over time, both in B-lineage ALL as in ALL-T. The Hsp90 ELISA allows the leukemia's engraftment detection in transplanted animals up to two weeks prior to detection by the traditional method of peripheral blood analysis by flow cytometry. Unlike observed for IGFBP2, treatment of leukemic animals with Dexamethasone or PI3K inhibitors did not interfere in Hsp90 levels, which remained proportional to the percentage of huCD45+ leukemic cells in the peripheral blood. Taken together, the results demonstrate that the analysis of animal plasma by Hsp90 ELISA is a better method than those currently used for early diagnosis and monitoring of human ALL on minimal residual disease levels, when the percentage of ALL cells is less than 5 % of the total bone marrow cells.

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é o câncer mais comum na infância. O transplante de células primárias de LLA humana em camundongos imunossuprimidos tem sido de suma importância para o entendimento da fisiopatologia da doença e para o teste de novos fármacos. Ao contrário de modelos animais de tumores sólidos, cujo volume é facilmente medido na superfície dos animais, a LLA infiltra órgãos inacessíveis ao exterior, daí a necessidade de definir métodos adequados para o monitoramento da progressão da doença. Resultados aqui apresentados indicam que proteínas secretadas pela LLA podem servir como marcadores quantitativos da carga leucêmica, facilmente aferidos por ELISA de amostras de plasma sanguíneo. Dentre três proteínas testadas (B2M, IGFBP2 e Hsp90), o ELISA de Hsp90 apresentou sensibilidade superior à análise da porcentagem de células leucêmicas no sangue dos animais, por citometria de fluxo de células marcadas com anti-huCD45. Os níveis de Hsp90 humano no plasma sanguíneo mostraram-se positivamente correlacionados com o percentual de células leucêmicas na medula óssea e fígado e em menor grau com os níveis do baço e sangue periférico (SP) ao longo do tempo, tanto nas LLA de linhagem B quanto nas LLA-T. O ELISA de Hsp90 permite detectar a instauração da leucemia nos animais transplantados, até duas semanas antes da detecção pelo método tradicional de análise de sangue periférico por citometria de fluxo. Ao contrário do observado para IGFBP2, o tratamento dos animais leucêmicos com Dexametasona ou um inibidor da PI3K não interferiu nos níveis de Hsp90, que se mantiveram proporcionais à porcentagem de células leucêmicas huCD45⁺ no sangue periférico. No conjunto, os resultados demonstram que a análise do plasma dos animais por ELISA de Hsp90 é um método melhor do que os atualmente utilizados, para diagnóstico precoce e acompanhamento de LLA humana quando em níveis de doença residual mínima, ou seja, quando a porcentagem de células de LLA é inferior a 5% do total de células da medula óssea.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS.....	xv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xix
1. Introdução	2
1.1 Câncer.....	2
1.2 Leucemia linfóide aguda	3
1.3 Modelo animal	5
1.4 Diagnóstico e monitoramento da leucemia em modelo animal.....	8
1.5 Do paciente ao animal: a dinâmica das células leucêmicas.....	14
1.6 Motivação: marcador molecular solúvel para diagnóstico e monitoramento da LLA em camundongos NOD/SCID	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 A Hsp90 se destaca entre os marcadores selecionados por ter baixo background e apresentar boa correlação com o número de células leucêmicas do SP.....	32
4.2 Correlação entre níveis de Hsp90 e carga leucêmica no animal.....	36
4.3 Influência de quimioterapia nos níveis de Hsp90 e IGFBP2.....	47
4.4 Considerações sobre o método desenvolvido.	50
5. CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS.....	60

DEDICATÓRIA

Aos de alguma forma envolvidos com a Leucemia Linfóide Aguda,
que os pacientes encontrem força para lutar e que os profissionais se dediquem de coração nessa saga.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, José Andrés Yunes, pela oportunidade de realizar este estudo e por me fazer ver que ciência se faz na simplicidade, na curiosidade e na busca de novos conhecimentos com a mente aberta para o que se encontra pelo caminho.

À minha família, João, Fátima, Diogo, Danilo Milani, Soledade e Lourival Mendes e Beatriz de Faria Carniel pelo suporte incondicional e por acreditar no meu trabalho.

À equipe do CIPOI, Vanair, Gilberto, Nei, Almir, Flávio e Alexandre pelo suporte durante meu trabalho.

À Marcia e à Carol por terem me ajudado e apoiado em muitos momentos desse mestrado.

Ao Angelo Brunelli Albertoni Laranjeira, que foi praticamente um segundo orientador e me auxiliou inúmeras vezes durante meus experimentos, por ter me ensinado tudo o que eu sei da prática para a realização desse estudo e por me mostrar que dedicação é essencial para o desenvolvimento de uma boa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Unicamp pelo suporte.

Ao Centro Infantil Boldrini, à equipe do Laboratório de Biologia Molecular e à Dra. Sílvia Brandalise pelo apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro no início do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo imprescindível financiamento ao trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Uso de modelo animal em estudos fisiológicos, patológicos e terapêuticos. ..	5
Figura 2 BLI in vivo de um camundongo com células da linhagem Ba/F3-Luc/Wt. ...	10
Figura 3 RMI do tronco de um camundongo 4 semanas após inoculação de células. ..	11
Figura 4 Esquema da via intracelular downstream à interação CXCR4/SDF-1	15
Figura 5 Migração das células tronco hematopoiéticas para MO	16
Figura 6. Plano de trabalho para prospecção de possíveis marcadores para acompanhamento e diagnóstico de LLA em modelo animal	24
Figura 7. Plano de trabalho para correlacionar os níveis de Hsp90 plasmática e massa tumoral no animal	26
Figura 8. Correlação dos níveis dos marcadores e porcentagem de células huCD45+. ..	34
Figura 9. <i>Cut-off</i> para diagnóstico de LLA por ELISA de Hsp90.....	37
Figura 10. Correlação dos níveis de Hsp90 e porcentagem de células huCD45+ em diferentes órgãos.....	39
Figura 11. Porcentagens de células huCD45+ do fígado e da medula nas duas primeiras coletas	42
Figura 12. Concentração de Hsp90 das diferentes LLAs ao decorrer das semanas após a inoculação.....	44
Figura 13. Correlação entre porcentagem de células huCD45+ da MO, fígado e baço com a do SP.....	45
Figura 14. Interferência de quimioterapia nos níveis de Hsp90 e IGFBP2.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	<i>Protein kinase B</i>
B2M	<i>Beta-2-microglobulin</i>
BLI	Imagem por Bioluminescência
CD45	<i>Cluster of Differentiation 45</i>
CXCL12	<i>C-X-C motif chemokine 12</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor 4</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FITC	Isotiacianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward-scattered light</i>
GC	Glucocorticóide
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
Hsp90	<i>Heat shock protein 90kDa</i>
huCD45	Molécula de superfície celular CD45 humana
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule 1</i>
IGFBP2	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 2</i>
IL	Interleucina
IU	Unidades Internacionais
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLA-B	Leucemia Linfóide Aguda proveniente de célula precursora de linhagem linfóide B
LLA-T	Leucemia Linfóide Aguda proveniente de célula precursora de linhagem linfóide T

LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
Luc	Luciferina
MO	Medula Óssea
muCD45	Molécula de superfície celular CD45 murina
NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Ficoeritrina
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
Prkdc	<i>Protein kinase DNA activated catalytic polypeptide</i>
RMI	Ressonância magnética por imagem
SAv-HRP	<i>Streptavidin-Horseradish peroxidase</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SFB	Soro fetal bovino
SP	Sangue periférico
SSC	<i>Side-scattered light</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
Wt	Genótipo selvagem

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma doença que se desenvolve no âmbito da complexidade celular dos organismos. Todas as células que se dividem e multiplicam para manutenção da homeostase e do crescimento do organismo possuem intrincados mecanismos de regulação da divisão e proliferação. Estes mecanismos estão sujeitos a erros que podem alterar a homeostase do crescimento celular, causados por eventos fortuitos ou influências externas, como agentes químicos e físicos, que em última instância levam às alterações genéticas subjacentes e características de todo câncer (BISSELL; RADISKY, 2001; DAVIDOFF, 2010).

As alterações genéticas das células cancerosas vão sendo adquiridas durante a evolução da doença. De modo geral, estas alterações podem ser divididas pelos seus efeitos: (1) capacidade de manter a sinalização de proliferação celular, (2) suprimir inibidores de crescimento, (3) ativar invasão e metástase, (4) ativar replicação indefinida, (5) induzir a angiogênese e (6) resistir a morte celular (BISSELL; RADISKY, 2001; DAVIDOFF, 2010). Dentre estas alterações genéticas podemos destacar: mutações, inserções virais, alteração do conteúdo de DNA, ativação de proto-oncogenes, modificações cromossômicas, alterações epigenéticas, modificação na expressão de micro-RNAs, entre outras (HANAHA; WEINBERG, 2011).

A medida que o conhecimento aumenta, fica mais distante a perspectiva de encontrar um fator que unifique todos os cânceres. Deste modo, diversas abordagens de estudo dos pontos fracos da doença estão sendo desenvolvidas nas mais variadas linhas de pesquisa, desde marcadores para melhor detecção do câncer, até tratamentos personalizados (COUSTAN-SMITH et al., 2011; PUI et al., 2012).

1.2 Leucemia linfóide aguda

As leucemias podem ser classificadas com base em dois aspectos clínico-patológicos: (1) quanto ao tempo de expansão da doença, em termos da velocidade do aumento no número de células sanguíneas imaturas, pelo qual são denominadas leucemias agudas ou crônicas. As leucemias agudas são caracterizadas por um rápido aumento no número de células leucêmicas e requerem um tratamento rápido, é a forma mais comum de leucemia em crianças. As leucemias que apresentam evolução mais lenta, podendo levar de meses até anos para se desenvolver, são denominadas leucemia crônicas, e são mais comuns em indivíduos adultos. E (2) quanto ao tipo da célula progenitora que gera a doença: leucemia linfóide, na qual os precursores linfóides, que gerarão os linfócitos T e B, apresentam modificações que provocarão a doença e leucemia mielóide, quando essas modificações ocorrem na linhagem mielóide dos leucócitos, que dará origem aos granulócitos (basófilo, neutrófilo e eosinófilo).

Assim, baseando-se em uma divisão abrangente da doença, classifica-se a leucemia em quatro tipos principais: leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia linfóide crônica (LLC), leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia mielóide crônica (LMC) (MISAGHIAN et al., 2009).

A LLA é uma neoplasia hematológica, um tipo de câncer das células sanguíneas do sistema imunológico ou de suas progenitoras na medula óssea (MO). Essa doença é caracterizada por uma disfunção no controle proliferativo dos tipos celulares precursores das células linfóides, o que leva a uma expansão clonal descontrolada e desordenada, e a um acúmulo exacerbado de células precursoras na MO. A superpopulação anormal desses precursores na MO – chamados linfoblastos - dificulta a promoção de uma hematopoiese normal e estas células acabam invadindo outros sítios extramedulares (COBALEDA; SÁNCHEZ-GARCÍA, 2009).

A LLA é o tipo mais comum de câncer em crianças correspondendo a aproximadamente 25% dos casos de câncer que ocorrem antes dos 15 anos de idade (PUI; CAMPANA; EVANS, 2010), podendo ser classificada pelo tipo de célula precursora linfóide da qual a doença deriva. Caso seja uma precursora de célula T é chamada de LLA-T, correspondendo a 15% dos casos de LLA. Caso derive de uma precursora de célula B, é chamada de LLA-B e tem ocorrência de 85% dos casos da doença (FOWLER et al., 2005; GRAUX, 2011; SINNETT; LABUDA; KRAJINOVIC, 2006).

A alta taxa de cura da LLA se deve aos resultados de sucessivos estudos clínicos multicêntricos que avaliam de maneira comparativa diferentes esquemas terapêuticos, como também a melhora da terapia de suporte. Entretanto, cerca de 25% dos pacientes possuem leucemias resistentes aos tratamentos atuais e sofrem recaída da doença (PUI; RELING; EVANS, 2002; PUI et al., 2011) As causas da LLA ainda não são totalmente conhecidas, mas estima-se que estejam relacionadas a genes que controlam a homeostase das células progenitoras linfóides e com a regulação da divisão celular (PUI; RELING; EVANS, 2002). A identificação de marcadores moleculares da LLA auxiliou tanto o entendimento do

mecanismo de iniciação da doença e sua evolução, como o aperfeiçoamento do diagnóstico e prognóstico dos pacientes (COUSTAN-SMITH et al., 2011; FOWLER et al., 2005).

1.3 Modelo animal

O melhor entendimento do câncer e a busca por novas perspectivas de cura inicia-se com testes em modelos mais simples de se compreender. Um número menor de variáveis e a possibilidade da realização de experimentação rápida, acessível e que permita uma grande variedade de testes, é mais adequado para a abordagem do fenômeno estudado. Neste aspecto, a cultura de células é muito versátil e um modelo ideal para estudos iniciais. O próximo passo para o entendimento de determinado fenômeno relacionado ao câncer seria a avaliação *in vivo* com uso de animais como modelo. Neste âmbito, o camundongo se destaca como o modelo mais utilizado, por sua versatilidade, facilidade de reprodução e modificação genética e por possuir o organismo relativamente similar ao do ser humano (Fig. 1) (RONGVAUX et al., 2013).

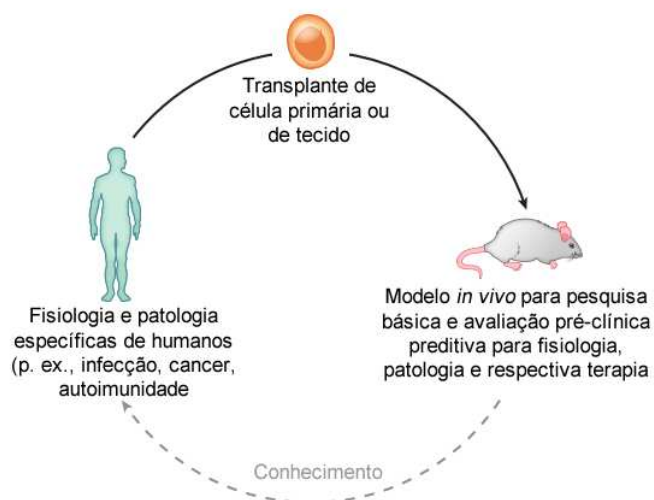


Figura 1. Uso de modelo animal em estudos fisiológicos, patológicos e terapêuticos. A utilização do modelo animal facilita e acelera a geração de conhecimento para aperfeiçoamentos médicos (Adaptado de RONGVAUX et al., 2013).

Grande parte da sociedade e da comunidade científica aceita o uso em pesquisa de pequenos animais, como vermes, e invertebrados em geral. A utilização de animais maiores, como primatas, é frequentemente discutido e está cada vez mais caindo em desuso, dada a evolução de outros modelos que reproduzem fielmente o que se passa no organismo humano. Neste contexto, pequenos mamíferos como camundongos servem como um excelente sistema de estudo para a pesquisa biomédica (RONGVAUX et al., 2013).

A grande maioria dos animais utilizados em pesquisas com leucemia são camundongos derivados da linhagem SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) como o SCID/SCID, o NOD/SCID (*Non-obese diabetic SCID*) e o NSG (NOD/SCID que carrega uma mutação na cadeia gama do receptor de IL-2; também conhecido como *NOD/Shi-scid/IL-2R γ ^{null}*). Estes animais apresentam mutação recessiva em um gene localizado no cromossomo 16, que codifica a *Prkdc* (*protein kinase DNA activated catalytic polypeptide*) uma enzima de reparo do DNA que atua na recombinação V(D)J. Os camundongos SCID não possuem a capacidade de maturação das células do sistema imune, e assim produzem linfócitos T e B de forma prejudicada, uma característica essencial para que a leucemia se instaure no animal sem a rejeição do sistema imune (MEYER; DEBATIN, 2011).

Entretanto, os camundongos da linhagem SCID/SCID apresentam atividade normal de células NK, que podem interferir na instauração de leucemias menos agressivas em modelo animal (LAPIDOT; KOLLET, 2002) e também tem a capacidade de restaurar - com o passar do tempo - por vias diferenciais da linfopoiese, a produção de linfócitos T e B (BOSMA; CUSTER; BOSMA, 1983).

Outro camundongo comumente utilizado é o RAG-1 e RAG-2, os quais não possuem as proteínas Rag-1 e 2 (SCHATZ; OETTINGER; BALTIMORE, 1989), responsáveis por

um importante passo da recombinação V(D)J, e assim não conseguem gerar linfócitos T ou B maduros, ou seja um sistema imune adaptativo funcional (MOMBAERTS et al., 1992). Os camundongos RAG-1 e 2 que provêm do fundo não-NOD, apresentam alta atividade de células NK e tem o sistema complemento normal (MOMBAERTS et al., 1992), características de uma linhagem não tão ideal para estudos de instauração e progressão da leucemia. Os RAG-1 e 2 de fundo NOD são vantajosos por não terem células NK e nem apresentarem perigo de restauração na função dos linfócitos T e B como ocorre no SCID/SCID. Entretanto, são animais que apresentam linfomas de células pré-B em alta frequência ao envelhecerem (SHULTZ et al., 2000).

Os camundongos NSG constituem um bom modelo para estudo de doenças linfóides, e a mutação no receptor de IL-2 o caracteriza como um animal com maior facilidade para instauração da leucemia. No entanto, cuidados adicionais para sua manutenção e reprodução são requeridos. Este modelo é atualmente o mais permissivo à instauração de células leucêmicas por não ter linfócitos T, B, células NK e possuir o sistema complemento deficiente assim como o quadro geral da resposta imune ser debilitado.

O camundongo NOD/SCID, por sua vez, é um modelo muito viável para estudos hemato-oncológicos por possuir baixa atividade de células NK, devido ao seu fundo NOD, não apresentar atividade de linfócitos T e B e nem a reconstituição desses compartimentos, além de ser um modelo bem caracterizado, ser altamente permissivo aos linfoblastos de LLA e ter imunidade residual (MEYER; DEBATIN, 2011; SHULTZ et al., 1995).

O uso de animais no estudo das leucemias representa uma ponte de transição para a compreensão da doença no ser humano. O aprimoramento do modelo animal é fundamental

para aumento de conhecimento e muito importante para realização de testes pré-clínicos de novas drogas ou alvos terapêuticos.

1.4 Diagnóstico e monitoramento da leucemia em modelo animal

Diferentemente de tumores sólidos, que formam massas passíveis de aferições volumétricas externas ou visualmente avaliáveis (TOMAYKO; REYNOLDS, 1989) as leucemias tem a característica de ser um tumor de células circulantes ou instauradas nos vasos e matriz extracelular de diversos órgãos. Por isso, o acompanhamento de sua progressão requer mais cuidados e o estabelecimento de um ponto inicial da doença no animal não é elementar.

Deste modo, existem diversos métodos para diagnóstico e avaliação da progressão da leucemia, os quais apresentam vantagens e desvantagens que devem ser levados em conta no momento de se estabelecer um protocolo de estudo.

As técnicas atualmente disponíveis para a análise da leucemia em modelo murino baseiam-se em duas grandes subdivisões: (1) uso de ferramentas de imagem para identificar visualmente a leucemia, esta abordagem visa aferir internamente a localização da maior concentração do tumor e semi-quantificar o número de células leucêmicas e (2) uso de marcadores moleculares, como moléculas de superfície celular, transcritos, ou moléculas liberadas pelas células leucêmicas.

Dentro das técnicas que utilizam ferramentas visuais para monitorar e detectar a leucemia, podem ser destacados o uso de imagem por bioluminescência (BLI) e a imagem por ressonância magnética (RMI).

A técnica de obtenção de imagens bioluminescentes do animal é uma técnica moderna de monitoramento da resposta do animal a tratamentos com quimioterápicos e é baseada na utilização de células cancerosas transfectadas com o gene da luciferina, de modo que o efeito do tratamento pode ser acompanhado *in vivo* pela aferição de bioluminescência. Esta metodologia tem a vantagem de não ser invasiva e permitir acompanhar um mesmo animal ao longo de todo o tempo experimental (MOELLERING et al., 2009). Uma alternativa ao uso do gene da luciferina é transduzir as células tumorais com gene que expresse molécula fluorescente (p. ex. GFP), e deste modo analisar a formação de massas tumorais, bem como o acúmulo ou migração dessas células ao longo do tempo pela aferição de fluorescência (Fig. 2) (DICKSON et al., 2007; MOELLERING et al., 2009).

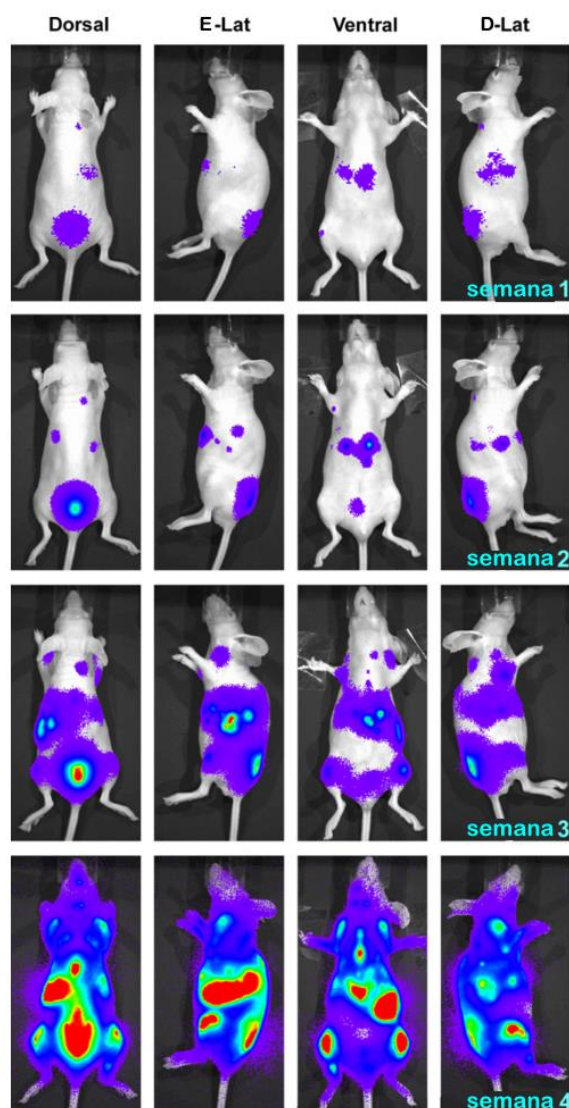


Figura 2. BLI in vivo de um camundongo com células da linhagem Ba/F3-Luc/Wt. O sinal visualizado nas primeiras semanas não é suficiente para considerar o animal como doente. Pode-se observar a proliferação das células pelo organismo do camundongo ao passar do tempo, inoculadas em diversas regiões (Adaptado de INOUE; IZAWA; TOJO, 2007)

Entretanto, a principal limitação deste método é a necessidade do uso de equipamentos caros para a captura e análises de imagem dos animais. Além disso, a transdução de células com o gene da luciferina ou GFP pode levar a alterações metabólicas indesejadas e demanda cultivo prévio das células *in vitro*. Como as células primárias de LLA tem tendência acentuada a entrar em apoptose *in vitro*, o processo de transfecção requerer a utilização inicial de um grande número de células, o que nem sempre é possível.

O uso de ressonância magnética para obtenção de imagens internas do animal e análise da leucemia é outra abordagem baseada em imagens. Neste caso, são feitas tomografias que fornecem detalhes morfológicos e permitem a visualização dos órgãos internos do animal, possíveis lesões e alterações de tamanho. Como animais leucêmicos geralmente desenvolvem esplenomegalia e hepatomegalia, esta técnica é capaz de auxiliar na observação desses fenômenos (Fig. 3) (INOUE; IZAWA; TOJO, 2007). A RMI depende de uma substância de contraste para obtenção da imagem e análise dos dados, e depende de água para obtenção das imagens. Considerando que a MO é um órgão com baixos volumes de água e é o compartimento onde se dá o início da doença, estágios iniciais de leucemias são dificilmente detectáveis por esse método. Além disso, há dependência de um aparelho de ressonância magnética com uma câmera apropriada (INOUE; IZAWA; TOJO, 2007).



Figura 3. RMI do tronco de um camundongo 4 semanas após inoculação de células. As setas pretas indicam alguns nódulos presentes no fígado e a branca mostra a esplenomegalia (Alterado de INOUE; IZAWA; TOJO, 2007).

As técnicas que utilizam marcadores moleculares pertencem ao grupo mais corrente para diagnóstico e acompanhamento da leucemia em humanos. Dentre elas os marcadores de superfície são amplamente utilizados, uma vez que são estudados há tempos e muito se sabe sobre eles.

Diversos trabalhos recentes vem buscando aumentar o leque de moléculas de superfície que podem ser utilizados para distinguir populações celulares e assim possibilitar maior confiabilidade no diagnóstico da doença (COUSTAN-SMITH et al., 2011; MIRKOWSKA et al., 2013). O padrão ouro utilizado nessa abordagem é a citometria de fluxo. Trata-se de um método simples e rápido de se realizar, baseado na marcação de moléculas da superfície celular com anticorpos, que reconhecem essas moléculas com grande especificidade. Os anticorpos são conjugados com fluorocromos que emitem certo espectro luminoso quando excitados por um laser específico. O citômetro, consegue excitar e reconhecer o sinal emitido pelo fluorocromo e assim quantificar cada sinal como uma célula que teve sua molécula alvo marcada e reconhecida. No caso dos estudos com leucemia humana em modelo animal, a citometria é feita a partir da fração de células mononucleares do sangue periférico (SP) do camundongo, marcadas com um anticorpo anti-humano (por exemplo, anti-huCD45), uma vez que a célula primária ou linhagem inoculada no animal tem origem humana (LIEM et al., 2004).

Monitorar a progressão da LLA nos animais, pela contagem de células huCD45+ no SP dos mesmos (LIEM et al., 2004) tem o inconveniente de que o número de células leucêmicas circulantes nem sempre corresponde a uma estimativa adequada da “carga” de leucemia no animal, pois as células de LLA (embora em menor grau no caso das LLA de fenótipo T) tem tendência a infiltrar e permanecer retidos na MO, baço e fígado.

Os métodos baseados em marcadores moleculares apoiam-se em moléculas secretadas pela leucemia, proteínas geralmente superexpressadas pelas LLAs que podem ser detectadas por técnicas semiquantitativas ou quantitativas como ELISA, *western blotting* ou PCR e análises genômicas no caso de alterações genéticas e cromossomais utilizadas como marcadores (KÜHNL; GRIMWADE, 2012; SAGLIO et al., 2002; ZELEN; GREAVES;

ENVER, 2004). Esses métodos são exemplos de um novo tipo de abordagem que está cada vez mais sendo utilizado para diagnósticos rápidos e precisos, uma vez que não dependem de aparelhos muito sofisticados e baseiam-se em técnicas relativamente simples. Devemos ressaltar que estes métodos baseados em marcadores moleculares são muito comuns para o diagnóstico de LLA em humanos, entretanto em murinos esta aproximação ainda não é muito usual.

A metodologia mais comumente utilizada até hoje para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos dos animais com LLA humana, é a citometria do sangue periférico, os níveis de infiltração de blastos leucêmicos em baço, fígado e MO somente são aferidos após o sacrifício dos animais. Estas análises, apesar de informativas, não são sensíveis a pequenas diferenças entre os grupos tratamento e controle, principalmente nos tempos em que a doença não está em franca evolução, uma limitação metodológica que não invalida os resultados obtidos, mas aponta para a necessidade de implementação de um modelo mais sensível de monitoramento dos tratamentos e de progressão da leucemia. A técnica aqui proposta será importante para antecipar o diagnóstico especialmente em órgãos não acessíveis sem o sacrifício dos animais.

A avaliação de novos fármacos contra a leucemia é de extrema importância para encontrar um novo tratamento para as 20 a 30% das crianças com LLA que sofrem recaída da doença. As células de LLA da recaída fazem parte da mesma população de células encontrada ao diagnóstico (ZUNA et al., 2004), porém apresentam maior resistência aos quimioterápicos (PIETERS et al., 1990). Por isso, as crianças que recaem da doença dificilmente são curadas com a repetição dos mesmos quimioterápicos usados antes da recaída, apresentando sobrevida global estimada em 40%.

Além disso, parece-nos necessário desenvolver um método mais sensível de confirmação da ‘pega’ do transplante da LLA nos camundongos, permitindo início dos tratamentos nas fases iniciais da leucemia, em estágio correspondente aos níveis de Doença Residual Mínima das crianças (níveis iguais ou inferiores a 1 célula leucêmica para cada 1.000 células normais da MO), que é provavelmente a situação em que as novas drogas poderão ser usadas (COUSTAN-SMITH et al., 2011; KÜHNL; GRIMWADE, 2012; PUI et al., 2012).

1.5 Do paciente ao animal: a dinâmica das células leucêmicas

A dinâmica da leucemia humana em modelo animal baseia-se em três momentos centrais da “história da célula” leucêmica no animal: a instauração (*engraftment* ou “pega”), a proliferação e a recirculação das células.

O *engraftment* ou “pega” da leucemia, é o processo de instauração da doença após a inoculação de células neoplásicas no animal. Este processo tem início com a migração das células para a MO, pela sinalização de quimiocinas, principalmente entre SDF-1 (ou CXCL12) e seu receptor CXCR4. A interação entre essas duas moléculas induz uma cascata de sinais intracelulares, aumento de cálcio intracelular e transcrição de diversos genes, ativando a proliferação e sobrevivência celular (via PI3K/Akt) e a quimiotaxia (TEICHER; FRICKER, 2010) (Fig. 4).

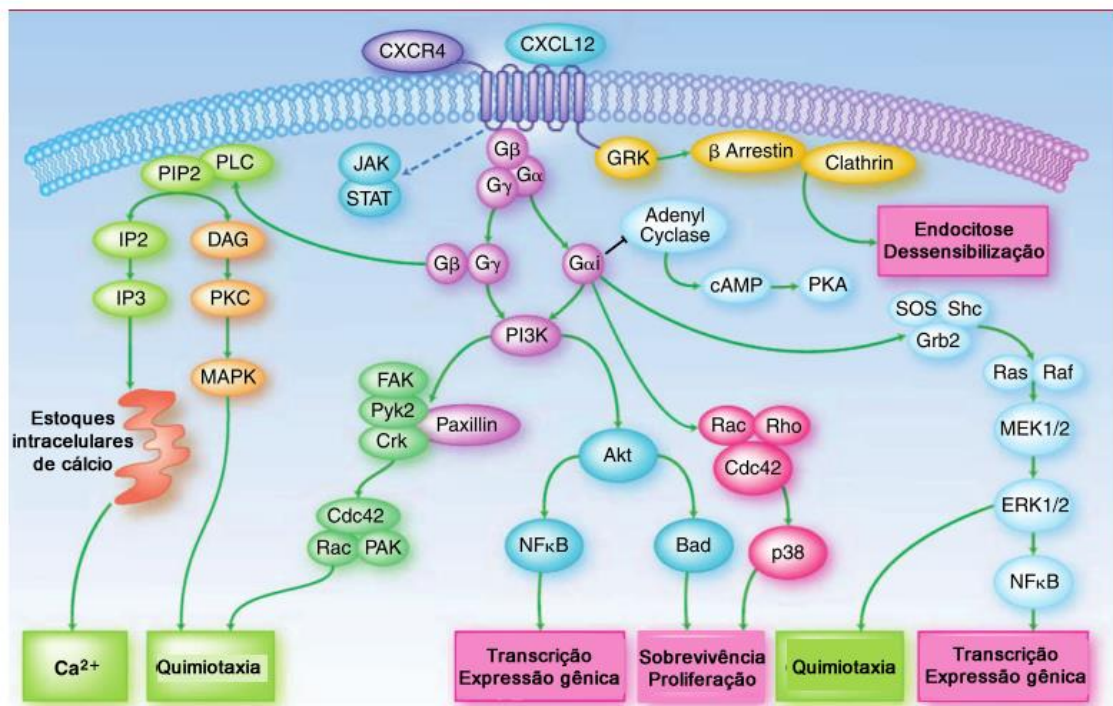


Figura 4. Esquema da via intracelular *downstream* à interação CXCR4/SDF-1 (Adaptado de TEICHER; FRICKER, 2010).

A SDF-1 é uma quimiocina homeostática que controla funções de tráfego de células hematopoiéticas e a arquitetura de tecidos linfóides. É produzida pelas células estromais da MO (p.ex. osteoblastos), e também por células de tecidos muscular, coração, rim, cérebro e pulmão, sendo liberadas na corrente sanguínea (TEICHER; FRICKER, 2010).

A CXCR4 é o receptor ao qual a SDF-1 se liga e pode ser encontrado em células endoteliais, tecidos danificados ou doentes, células hematopoiéticas (incluindo a LLA) e em outros tecidos como rins, cérebro, pulmão e fígado (CRAZZOLARA et al., 2001; KUCIA et al., 2004; TAVOR, 2004). Quando inoculados nos animais, os blastos leucêmicos CXCR4-expressantes entram em contato com seu ligante, SDF-1, em maiores concentrações no sistema vascular da MO, iniciando o processo de quimiotaxia e migração para o nicho intramedular (assim como para outros órgãos que produzem SDF-1), onde passam a proliferar e/ou sobreviver (Fig. 4).

Por analogia com o que se sabe sobre migração de células tronco linfóides normais (Fig. 5), pensa-se que as células de LLA interagem com as células endoteliais da MO e rolam no endotélio da MO, por intermédio das ligações de E-selectinas (moléculas de adesão endoteliais) e P-selectinas (moléculas de adesão de plaquetas). Então, interações entre moléculas de adesão do microambiente medular como ICAM-1 e VCAM-1 com suas correspondentes nas células de LLA, a LFA-1 e VLA-4, ativam a célula migrante e afrouxam a membrana basal da MO, permitindo o extravasamento das células de LLA para o nicho medular (PELED et al., 2000).

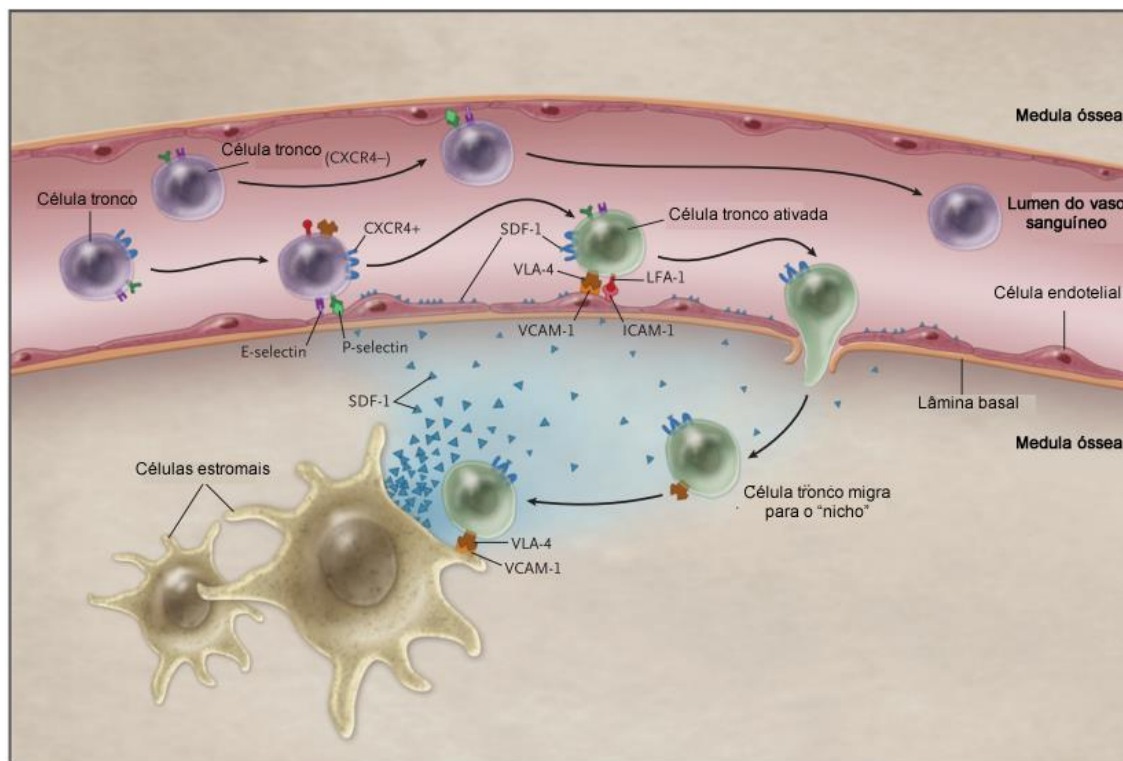


Figura 5. Migração das células tronco hematopoiéticas para MO (Adaptado de HAROUSSEAU; MOREAU, 2009).

Além disso, há evidências que CD45, a molécula comumente utilizada para o diagnóstico da leucemia em modelo animal e expressa por grande parte dos linfócitos, tem um importante papel no processo de instauração da doença em camundongos

imunodeficientes, por estar ligado com a regulação da hematopoiese, diferenciação de linfócitos B e T, motilidade, adesão e desenvolvimento de células sanguíneas imaturas (SHIVTIEL et al., 2011).

A interação CXCR4-SDF-1, além de participar também na ativação e extravasamento da célula leucêmica para o microambiente medular, desencadeia uma cascata de reações, principalmente via PI3K/Akt, culminando na proliferação celular (Fig. 4).

Após a expansão das células, o próprio ambiente medular inicia um autocontrole para liberação dessas células. Este fenômeno ocorre mediante a liberação de G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating factor*), uma glicoproteína encontrada na MO responsável pela produção e liberação de granulócitos e células tronco para a circulação. Existem indícios que não só G-CSF é responsável pelo processo de liberação dessas células para a circulação, moléculas como GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), interleucina (IL)-7, IL-12, IL-3, SCF (*stem cell factor*) entre outras também estão relacionadas com esse fenômeno (LAPIDOT; PETIT, 2002), indicando ser um complexo processo com diversos fatores envolvidos.

A mobilização intermediada por G-CSF é dada pelo efeito supressor que esta glicoproteína causa no eixo CXCR4-SDF-1, diminuindo a produção de mRNA de SDF-1 na MO, que está relacionada com aumento do grau de mobilização celular. A G-CSF também está relacionada com a expressão diminuída de CXCR4 em células tronco hematopoiéticas (PETIT et al., 2002). Além disso, o aumento dos níveis de G-CSF provoca profunda supressão de osteoblastos maduros, causando morte por apoptose em grande parte dessas células na MO. A linhagem dos osteoblastos é sabidamente responsável por ser uma importante fonte de SDF-1 na MO (GREENBAUM; LINK, 2011). Assim, G-CSF, além de ter como alvo outras células do microambiente medular, causa morte dos osteoblastos que é

um dos responsáveis pela produção das proteínas do eixo CXCR4/SDF-1 e portanto rege grande parte da mobilização das células leucêmicas da MO para a circulação.

Uma vez na circulação, as células leucêmicas colonizam outros órgãos como fígado, baço, rim, cérebro e linfonodos. Em diversos casos esse efeito pode ser visualizado no animal em forma de hepatomegalia e esplenomegalia.

Como os órgãos linfóides secundários também produzem SDF-1 (KUCIA et al., 2004; TEICHER; FRICKER, 2010), e as células inoculadas no animal podem ser atraídas para estes locais concomitantemente à MO, os efeitos da LLA em modelo animal são quase imediatos para esses órgãos, principalmente para o fígado, cujas taxas de infiltração são similares às da MO.

1.6 Motivação: marcador molecular solúvel para diagnóstico e monitoramento da LLA em camundongos NOD/SCID

Diante da necessidade de detectar da forma mais antecipada possível a instauração da leucemia nos animais transplantados, bem como acompanhar de maneira quantitativa as fases de proliferação e a recirculação das células de LLA nesses animais, este trabalho de tese teve como força motriz investigar quais proteínas secretadas e liberadas pela LLA na corrente sanguínea, cujos níveis, se correlacionados com a carga tumoral medular e demais órgãos infiltrados, poderiam servir como marcador indireto da doença e tivessem o potencial de preencher a janela de diagnóstico deixada pelas técnicas atualmente utilizadas.

O uso de um marcador molecular secretado pelas células leucêmicas é vantajoso pela facilidade de detecção da LLA por métodos já estabelecidos e simples de se realizar e reproduzir, sem depender de equipamentos caros e muito específicos por exemplo, por

ELISA, que é um método fácil, rápido, simples e de alta reprodutibilidade, diferentemente de métodos que baseiam-se em análises qualitativas não muito precisas e dependem da obtenção de imagens e de aparelhos sofisticados para sua realização.

Deste modo, a partir da prospecção inicial de três possíveis marcadores, a chaperona Hsp90 se mostrou uma ótima candidata para nossos propósitos e fomos motivados a melhorar o modelo animal para o estudo de LLA humana, visando monitorar a progressão da doença, e possibilitar o diagnóstico precoce de uma maneira mais rápida e mais sensível do que os utilizados correntemente.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo desta tese foi desenvolver um método de monitorização da instauração e progressão da LLA humana xenotransplanada em camundongos. Assim traçamos os seguintes objetivos:

2.1 Prospectar proteínas secretadas pelas células de LLA, para as quais houvesse disponibilidade de ensaio ELISA comercial.

2.2 Transplantar camundongos com LLA humana, quantificando (ELISA) ao longo do tempo o nível das proteínas potencialmente marcadoras da LLA no sangue periférico e a percentagem de células huCD45+ (células de LLA) por citometria de fluxo em amostras pareadas de SP ou de MO, fígado e baço dos mesmos animais.

2.3 Correlacionar níveis das proteínas potencialmente marcadoras da LLA no sangue periférico e massa tumoral (percentagem de células huCD45+) em sangue, MO, baço e fígado.

2.3.1 Determinar níveis mínimos de massa tumoral detectáveis pelo ELISA das potenciais proteínas marcadoras.

2.4 Averiguar se o tratamento de animais leucêmicos com quimioterapia (Dexametasona e inibidor de PI3K) interfere desproporcionalmente (em relação à massa tumoral) nos níveis solúveis das potenciais proteínas marcadoras.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Células de LLA

Células mononucleadas criopreservadas e obtidas por separação por gradiente de Ficoll, colhidas de pacientes recém diagnosticados com LLA, foram utilizadas nos experimentos. Neste estudo, foram utilizadas amostras com mais de 85% de blastos leucêmicos, analisados por contagem de células e por características morfológicas. Todas as células de pacientes foram utilizadas com consentimento dos pais ou de responsáveis como apropriado e aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, protocolo número 1105/2008– vide seção de anexos. As linhagens de células RS4;11 e TALL foram mantidas em cultura em meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB), 20 IU/mL de penicilina e 20 ug/mL streptomicina, a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado 12-24h antes de todos os experimentos.

3.2 Desenho experimental

3.2.1 Experimento 1–

Este experimento (Fig. 6) serviu para avaliar duas questões ao mesmo tempo: (1) qual dos três marcadores apresentaria melhor correlação entre os níveis proteicos e a carga leucêmica; (2) interferência do tratamento quimioterápico na expressão dessas proteínas secretadas. A questão 1 foi respondida pela análise do grupo controle (animais não tratados) em comparação com animais sem leucemia, bem como pela análise da progressão da leucemia em cada animal.

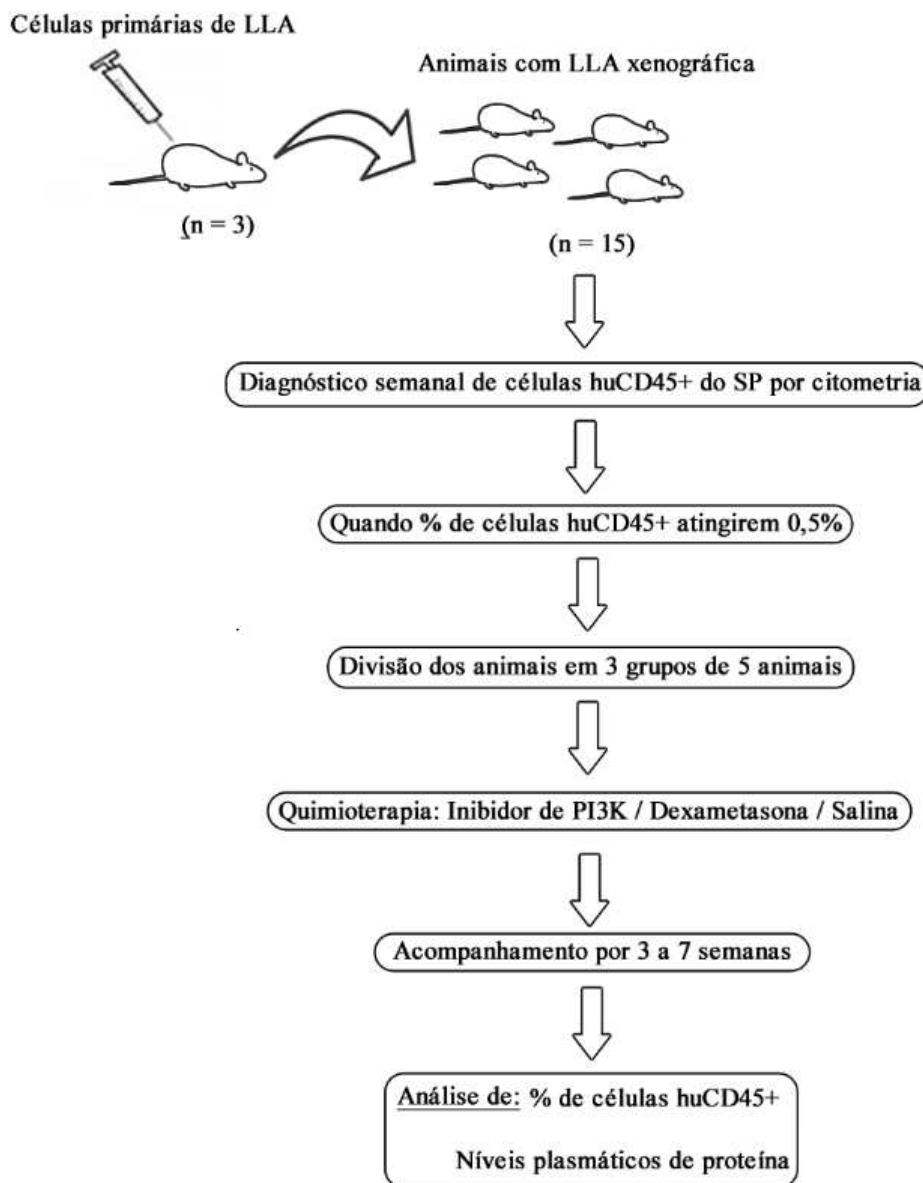


Figura 6. Plano de trabalho para prospecção de possíveis marcadores para acompanhamento e diagnóstico de LLA em modelo animal. Células primárias de LLA foram injetadas via veia caudal em um grupo inicial de 3 camundongos NOD/SCID. Quando atingiram altas porcentagens de células huCD45+, os animais foram sacrificados e as células de LLA xenográficas foram reinoculadas em 15 animais. Diagnósticos semanais por citometria de células huCD45+ do SP foram realizados até as porcentagens atingirem 0,5%. Quando a mediana do número de animais atingiram valores $\geq 0,5\%$ de células huCD45+ no SP, os animais foram aleatoriamente divididos entre os grupos de tratamento com Dexametasona ou AS605240 (inibidor específico de PI3K). O diagnóstico semanal foi continuado por 3 a 7 semanas. Foram analisados porcentagem de células huCD45+ no SP e níveis plasmáticos de B2M, Hsp90 e IGFBP2 por ELISA.

3.2.2 Experimento 2

Este experimento (Fig. 7) serviu para avaliar qual a carga leucêmica nos diferentes órgãos quando o nível de Hsp90 (a melhor das 3 proteínas marcadoras inicialmente testadas) ultrapassava o nível basal encontrado em sangue de 3 animais sem leucemia. Com isto, foi possível determinar se com o uso do ELISA seria possível antecipação da definição do sucesso do transplante em comparação com o padrão comum de avaliação de porcentagem de células humanas CD45+ por citometria ($>0,5\%$). Além disso, foi possível estabelecer quais os níveis mínimos detectáveis da leucemia no animal. Finalmente, permitiu determinar quais os órgãos inicialmente acometidos pela LLA.

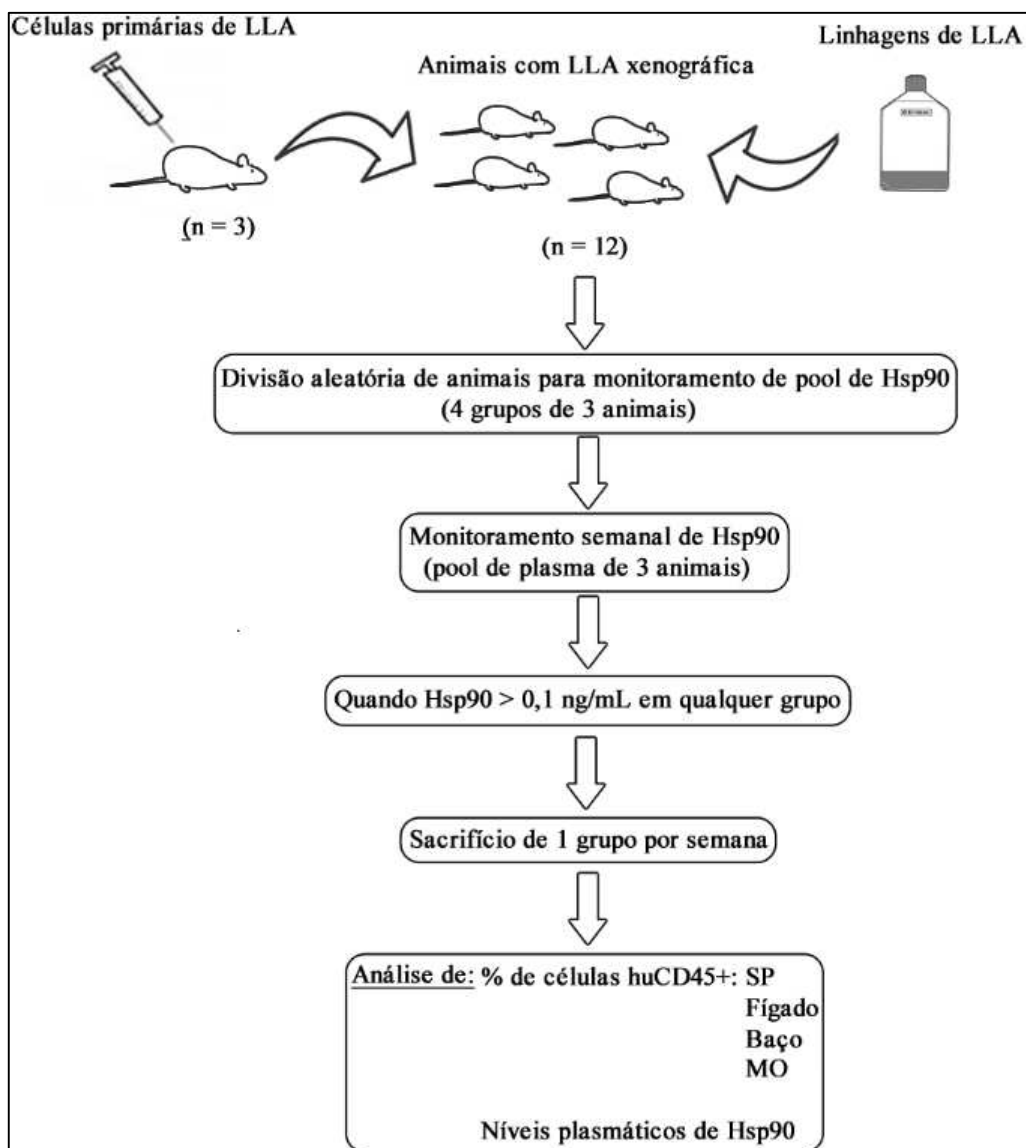


Figura 7. Plano de trabalho para correlacionar os níveis de Hsp90 plasmática e massa tumoral no animal. Células primárias de LLA foram injetadas em um grupo inicial de 3 camundongos NOD/SCID via veia caudal. Quando atingiram altas porcentagens de células huCD45+, os animais foram sacrificados e as células de LLA xenográficas foram reinoculadas em 12 animais. Células de linhagens de leucemia B ou T foram expandidas in vitro e injetadas em 12 animais da mesma maneira. Os animais com LLA xenográficas foram aleatoriamente divididos em 4 grupos de 3 animais para o monitoramento semanal de ELISA de Hsp90 plasmático. Ao atingirem níveis de Hsp90 acima de 0,1 ng/mL em qualquer grupo, o grupo com maior nível plasmático de Hsp90 foi sacrificado. Nas semanas seguintes, o grupo com o maior nível de Hsp90 era sacrificado. Foram analisados porcentagem de células huCD45+ no SP, fígado, baço e MO por citometria de fluxo e os níveis plasmáticos de Hsp90, por ELISA

3.3 Modelo animal – Camundongo NOD/SCID

Todos os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso Animal (CEUA), protocolo número 2365-1 – vide seção de anexos, do Instituto de Biologia da Unicamp. As células primárias de pacientes com LLA foram descongeladas, lavadas com RPMI-10% de SFB e 1×10^7 células foram injetadas via veia caudal, com auxílio de contenção mecânica, em camundongos NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Os camundongos que tiveram a instauração da leucemia com sucesso, confirmada por citometria de fluxo de células huCD45+ em sangue periférico, foram eutanasiados em uma câmara de Isoflurano (Isoforine, Cristália, São Paulo, Brasil) para obtenção de grandes quantidades das células leucêmicas xenográficas, as quais foram obtidas do baço, fígado e MO. Imediatamente após o sacrifício, 1×10^7 células foram injetadas em um número maior de camundongos para os experimentos. A leucemia neste segundo grupo de animais foi monitorada semanalmente a partir da coleta de 50 uL de sangue coletado via plexo retro-orbital, que foi submetido a separação de células mononucleares por gradiente de Ficoll. A fração mononucleada foi marcada com anticorpos anti-CD45 humano conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Pharmingen, San Diego, CA) e anti-CD45 murino (BD Pharmingen, San Diego, CA e EXBIO, Praha, Czech Republic) conjugado com ficoeritrina (PE) e fixada em paraformaldeído 0,5%. Para análise da infiltração da leucemia nos órgãos dos camundongos NOD/SCID, os animais foram sacrificados em uma câmara de isoflurano e a MO, fígado e baço foram coletados. As células da MO foram obtidas pela lavagem com PBS da MO dos fêmures. O fígado e baço foram mecanicamente homogeneizados e ressuspensos em PBS para posterior análise por citometria de fluxo, assim como realizado para o SP. Todas as células dos órgãos foram

submetidas à separação por gradiente de Ficoll para obtenção da fração de células mononucleadas e fixadas com paraformaldeído 0,5% previamente à marcação com os anticorpos. A análise por citometria foi realizada com a depleção de cada amostra, o total de eventos colhidos foi subdividido por um *gate* correspondente aos linfócitos, baseado nos parâmetros de volume celular (FSC) e na complexidade da célula (SSC). Esta fração de linfócitos foi avaliada quanto à presença de huCD45 e muCD45, por marcação com os anticorpos descritos. Para cada amostra foi calculada a porcentagem de linfócitos humanos no total de linfócitos (humanos e murinos), (LIEM et al., 2004; LOCK et al., 2002).

3.4 Teste imunoenzimático para detecção dos marcadores.

Amostras de plasma foram obtidas após centrifugação do sangue coletado do plexo retro-orbital dos camundongos e analisadas com o uso do kit comercial para ELISA de Hsp90a (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) – sensibilidade de 0,05 ng/mL -, do kit comercial para ELISA de IGFBP2 (R&D Systems DuoSet®, Minneapolis, MN) - sensibilidade de 50 pg/mL - e do kit comercial para ELISA de B2M (R&D Systems Quantikine® IVD®, Minneapolis, MN) – sensibilidade de 0,2 ug/mL.

O método de ELISA sanduíche consiste basicamente das seguintes etapas: ligação do anticorpo de captura nas placas, bloqueio, incubação das amostras de plasma ou diluições da curva padrão (fornecida pelo kit), incubação da solução de detecção (anticorpo de detecção acrescido de SAV-HRP), incubação da solução do substrato TMB (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) e da solução de parada de reação (HCl 2M). A cada passo faz-se lavagens. Os experimentos foram realizados a partir das instruções do fabricante. A leitura

foi realizada a 450 nm. Foram utilizados 100 uL de plasma por poço em todos os experimentos.

3.5 Efeito da quimioterapia nos níveis proteicos

Para a avaliação do efeito da quimioterapia nos níveis das proteínas marcadoras diferentes grupos de tratamento foram utilizados: (1) grupo controle – animais sem leucemia -; (2) grupo tratado com salina; (3) grupo tratado com 5 mg/kg de Dexametasona (Decadron Injetável, Biosintética Farmacêutica – Aché, São Paulo, SP), administrada intraperitonealmente uma vez ao dia, 5 dias por semana, e (4) grupo tratado com 20 mg/kg de AS605240, diluído em solução salina, administrado intraperitonealmente duas vezes ao dia, 5 dias por semana. O sal de potássio solúvel em água do AS605240 foi sintetizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, de acordo com a patente WO 2004007491. Sua identidade e pureza foram confirmados por espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. Os grupos controle e dos animais tratados com salina receberam uma solução de cloreto de sódio 0,9% intraperitonealmente. O número de células humanas CD45+ nas células mononucleadas do sangue foi medido regularmente, como descrito acima. O tratamento com as drogas foi iniciado quando a mediana de todos os animais inoculados com células humanas CD45+ atingiu $\geq 0,5\%$ no SP, momento em que os animais foram divididos aleatoriamente entre os diferentes grupos: (1) sem tratamento, (2) tratados com dexametasona e (3) tratados com inibidor de PI3K.

3.6 Análise estatística

A análise de relação entre a concentração de proteína (ELISA) e as porcentagens de blastos no sangue ou órgãos (citometria de fluxo) foi feita por regressão linear, utilizando o software GraphPad Prism 5. Foram utilizadas médias das triplicatas biológicas (3 animais) para cada variável avaliada. Os dados de concentração de proteína e porcentagem de blastos foram transformados para $\log_{10}$ para se comportarem como uma distribuição normal e testados quanto à normalidade pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk no *software* IBM SPSS Statistics 20.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A Hsp90 se destaca entre os marcadores selecionados por ter baixo background e apresentar boa correlação com o número de células leucêmicas do SP.

Inicialmente, foi realizada a prospecção de marcadores biológicos secretados pelas células de LLA, que servissem de marcadores moleculares da “carga” leucêmica nos animais. Correlacionamos a concentração desses marcadores, segundo quantificação obtida por ELISA, com a porcentagem de células humanas no SP dos animais (Fig. 6), e avaliamos como estes marcadores se comportavam frente a diferentes tratamentos com quimioterápicos (Fig. 8).

Os três marcadores foram selecionados com base em resultados prévios do grupo e em revisão de literatura específica, sendo eles as proteínas Hsp90, IGFBP2 e B2M.

A IGFBP2 (*insulin-like growth fator binding protein 2*) é uma proteína que regula o crescimento e diferenciação celular (BARRIOS et al., 2000) e é secretada em altos níveis pela LLA pediátrica e medeia efeitos mitogênicos em células normais e tumorais (MOHNIKE et al., 1998).

A B2M (Beta-2-Microglobulina) é uma subunidade do complexo HLA classe I. Em linfomas e leucemias agudas, seus níveis foram encontrados mais elevados do que em indivíduos saudáveis (BIENÍ; BALCERSKA; CIESIELSKI, 2004).

A Hsp90 (*heat shock protein 90 KDa*), é uma proteína chaperona altamente conservada que desempenha papel fundamental na transdução de sinal, no dobramento de proteínas recém-sintetizadas ou desnaturadas após stress, e na degradação de proteínas irreversivelmente danificadas; tendo suas principais clientes, proteínas mutadas, quiméricas

e proteínas oncogênicas (SONG et al., 2010). Humanos parecem ter cinco genes que codificam proteínas Hsp90: HSP90AA1, HSP90AA2 e HSP90AB1, que codificam Hsp90 citosólicas, HSP90B1 que codifica Hsp90 residente no retículo e TRAP1 que codifica uma Hsp90 mitocondrial. As HSP90AA (Hsp90 alfa) são indutíveis por estresse enquanto a HSP90AB1 (Hsp90 beta) é expressa constitutivamente. A Hsp90 é uma das principais moléculas do complexo de proteínas onde é encontrado o receptor de glucocorticóides (GCs) no estado inativo (na ausência de GCs), sendo que os GCs são moléculas utilizadas no tratamento de indução da LLA pediátrica (LAUTEN et al., 2003).

A Hsp90 é uma das proteínas celulares mais abundantes, correspondendo a aproximadamente 1% das proteínas totais na célula (WANG et al., 2009). A Hsp90 está em alta expressão em diversos tipos de cânceres como câncer de bexiga, de mama (LEBRET et al., 2007; WHITESELL; LINDQUIST, 2005), e LLA (LAUTEN et al., 2003; YUFU; NISHIMURA; NAWATA, 1992). Além disso, as Hsp90 *alpha* têm expressão muito mais alta e constitutiva nas leucemias agudas quando comparada a controles normais (TISSING et al., 2005; XIAO et al., 1996; YUFU; NISHIMURA; NAWATA, 1992) e é uma proteína secretada constitutivamente por células tumorais (CHENG et al., 2008). A alta expressão e o fato de ser uma proteína secretada faz da Hsp90 um excelente candidato a marcador molecular solúvel para diagnóstico de LLA no sangue dos animais transplantados.

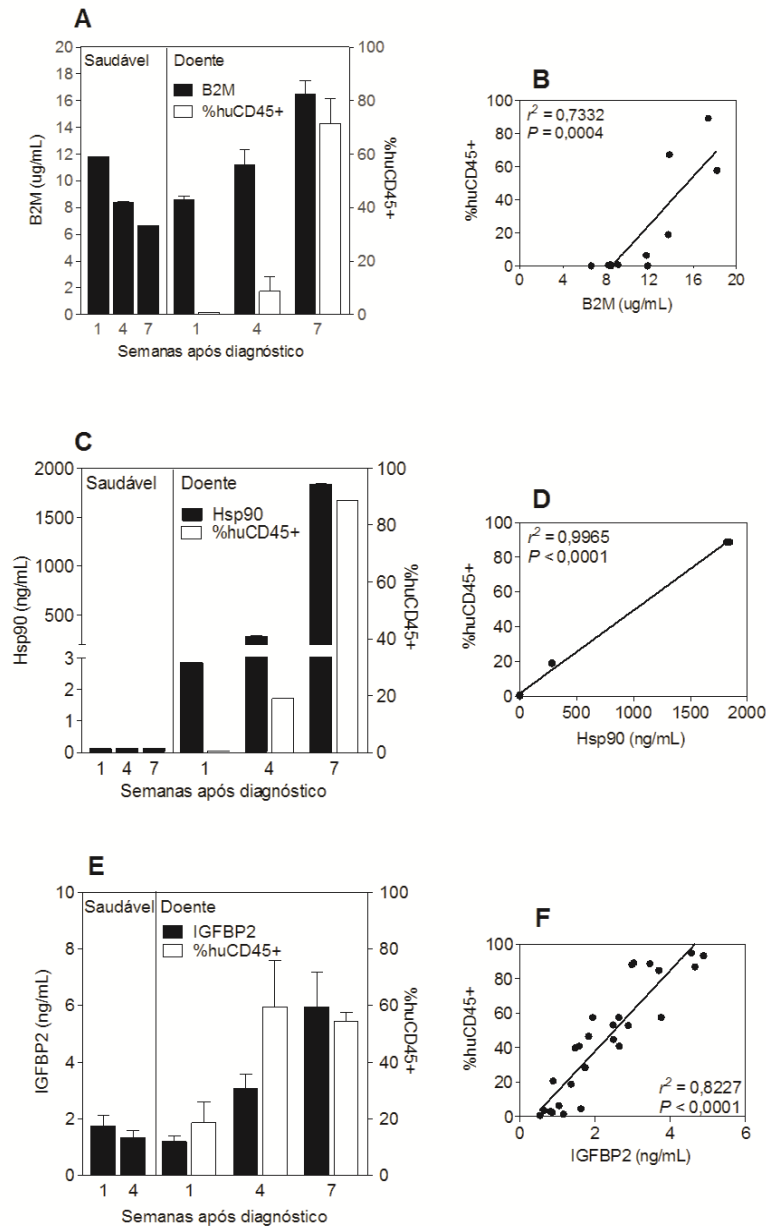


Figura 8. Correlação dos níveis dos marcadores e porcentagem de células huCD45+. (Esquerda: A, C, E) Médias e erro padrão dos níveis de B2M, Hsp90 e IGFBP2 (barras pretas) e média e erro padrão das porcentagens de células huCD45+ no SP correspondentes (barras brancas) para animais saudáveis e leucêmicos em 3 pontos de coleta após diagnóstico de leucemia por citometria. (Direita: B, D, F) Correlação entre níveis de proteína e porcentagem de células huCD45+ e coeficiente de regressão linear correspondente. O grande número de amostras para IGFBP2 deve-se à elevada quantidade de testes disponíveis no kit utilizado. Em (D), diversos pontos estão sobrepostos, nesta análise foram utilizados um total de 9 pontos diferentes. Hsp90 (C e D) mostraram as melhores correlações e quase nenhum background nos animais saudáveis.

Assim como na literatura, foi observado que os níveis plasmáticos de B2M acompanham a progressão da leucemia, apresentando boa associação com a porcentagem de células huCD45+, segundo estimado por cálculo de regressão (Fig. 8B) (BIEN; BALCERSKA; CIESIELSKI, 2004). Entretanto, os níveis de B2M nos animais saudáveis são muito altos, com valores similares aos de animais doentes (Fig. 8A), uma característica indesejável para um bom marcador. Provavelmente o ELISA para B2M humana tem reação cruzada com a B2M de camundongo. Devido ao alto background nos animais saudáveis, descartamos a dosagem de B2M foi descartada para continuidade dos experimentos.

Os níveis plasmáticos de Hsp90 humana apresentaram grande diferença na comparação de animais sadios e transplantados com LLA (Fig. 8C). Além disso verificou-se uma excelente regressão ($r^2=0,9965$) entre níveis plasmáticos de Hsp90 e porcentagem de células huCD45+ para os 9 pontos analisados, expostos em sobreposição (Fig. 8C e D).

A IGFBP2 mostrou background também muito elevado, que encobriria níveis de LLA no sangue na ordem de 20% (Fig. 8E), situação em que a medula, fígado e baço já estão completamente tomados pela LLA (ver Fig. 10). Apesar disso, a associação entre os níveis plasmáticos de IGFBP2 e a porcentagem de células huCD45+ foi boa, porém menor que a obtida para Hsp90 ($r^2=0,8227$).

Nesta primeira análise, verificou-se que a correlação entre porcentagem de linfócitos huCD45+ e concentração de Hsp90 segue uma tendência com maior linearidade do que as observadas para IGFBP2 e B2M, mostrando-se altamente significativa. O background é mínimo e confere especificidade na detecção da proteína, validando o uso de Hsp90 para monitoramento da LLA nos animais (Fig. 8C e D).

Certamente a Hsp90 como candidato a marcador foi de extrema importância para este trabalho, por haver uma grande diferença entre os níveis proteicos dos camundongos saudáveis e doentes no início da doença. Deste modo, os estudos foram aprofundados na Hsp90, avaliando seu potencial como marcador de LLA em modelo animal.

4.2 Correlação entre níveis de Hsp90 e carga leucêmica no animal

O diagnóstico padrão de leucemia em camundongos é feito por contagem de células leucêmicas no sangue (LOCK et al., 2002). A porcentagem de células leucêmicas no sangue, entretanto, pode não espelhar adequadamente a porcentagem de infiltração de órgãos, principalmente nos momentos iniciais pós-transplante xenográfico. Ao contrário das células leucêmicas, retidas nos diferentes órgãos, os níveis de Hsp90 no sangue poderiam espelhar adequadamente a carga leucêmica nos animais, além de permitir detecção precoce da instauração. Para averiguar estas possibilidades, analisamos os níveis plasmáticos de Hsp90 e analisamos comparativamente com a porcentagem de células huCD45+ no sangue, MO, fígado e baço, conforme delineado na figura 7.

Inicialmente, foi necessário estabelecer o nível mínimo de Hsp90 para o animal ser considerado doente pelo diagnóstico por ELISA. Para isso, foram utilizadas amostras de plasma de animais saudáveis e com LLA, verificando as concentrações de Hsp90 e as correspondentes porcentagens de células de LLA no SP por citometria (Fig. 9).

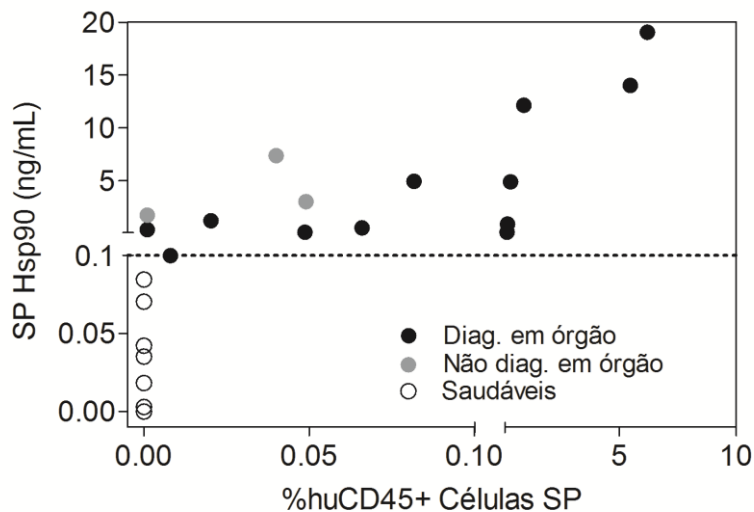


Figura 9. Cut-off para diagnóstico de LLA por ELISA de Hsp90. Concentrações de Hsp90 quantificadas por ELISA e porcentagem de células huCD45+ no SP, quantificadas por citometria, de animais saudáveis e com distintas LLAs. O eixo Y está dividido em ramos com diferentes escalas. Cada evento representa valores de média de 3 animais. Círculos pretos são os animais doentes cuja leucemia foi diagnosticada em algum órgão, círculos cinza são os animais doentes cuja leucemia não foi diagnosticada em nenhum órgão e os brancos são os animais saudáveis. Estabelecemos o limiar para 0,1 ng/mL de Hsp90, representado pela reta pontilhada horizontal.

Conforme a figura 9, os níveis de Hsp90 dos animais saudáveis variam entre aproximadamente 0,001 e 0,08 ng/mL e os animais com LLA apresentam níveis mínimos de Hsp90 em 0,1 ng/mL. Assim, levando em conta o limite de detecção do kit de 0,05 ng/mL e a concentração máxima de Hsp90 aferida para animais saudáveis (~0,08 ng/mL), optamos por estabelecer o *cut-off* em 0,1 ng/mL. Em três casos (Fig. 9 - pontos cinza), animais foram diagnosticados como leucêmicos por ELISA de Hsp90 e não tiveram porcentagens de huCD45+ maiores que 0,5% em nenhum órgão, entretanto seus níveis de Hsp90 foram muito acima do que os de animais saudáveis, configurando casos positivos de LLA. Estes três eventos provavelmente correspondem a uma leucemia que produz Hsp90 em uma taxa acima

da média, permitindo sua detecção por ELISA precocemente ao diagnóstico em qualquer órgão por citometria (Fig. 9 e 10).

Uma vez estabelecido o nível mínimo de Hsp90 para animal doente, foi realizada a comparação entre os níveis de Hsp90 plasmáticos e a porcentagem de células huCD45+ nos diferentes órgãos (Fig. 10).

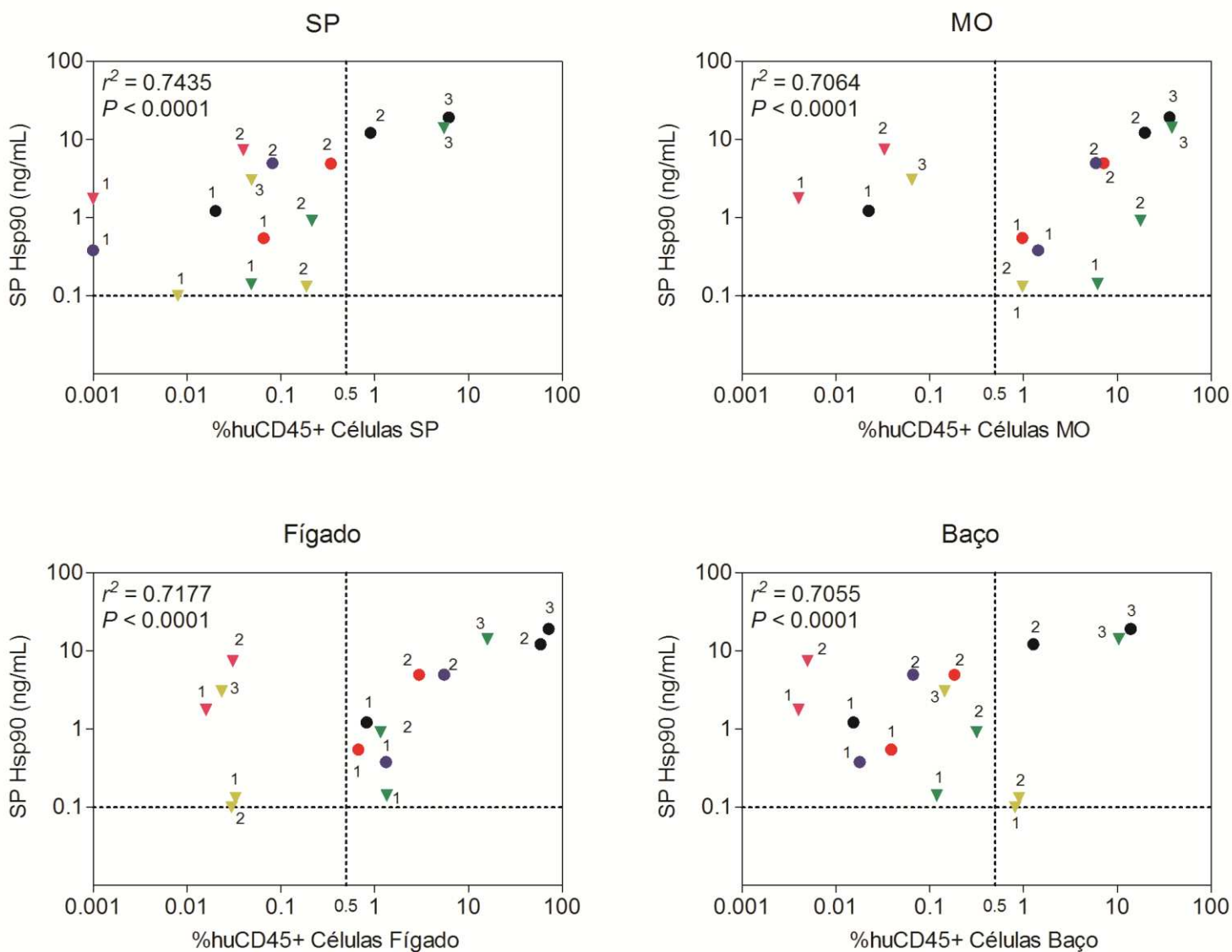


Figura 10. Correlação dos níveis de Hsp90 e porcentagem de células huCD45+ em diferentes órgãos. Comparação entre níveis plasmáticos de Hsp90 quantificados por ELISA e a porcentagem de células huCD45+ em cada órgão, quantificados por citometria. Grupos de 3 animais foram sacrificados sequencialmente uma vez atingida 0,1 ng/mL de Hsp90 em qualquer um dos “pools” de plasma dos animais transplantados. Dados em escala de log₁₀. O cut-off utilizado para a citometria é de 0,5% (reta pontilhada vertical). Cada evento representa valores de média de 3 animais. As diferentes leucemias utilizadas estão representadas por cores e os números correspondem aos diferentes momentos de coleta, feitos com intervalos de uma semana. Triângulos são leucemias T, círculos leucemias B.

Como mostra a figura 10 (painel SP), o ELISA de Hsp90 permitiu antecipar em no mínimo 1 semana o diagnóstico da ‘pega’ para a maioria das leucemias (4 das 5 LLA com pelo menos 2 coletas feitas). O diagnóstico por citometria não seria capaz de detectar a LLA, uma vez que todos os pontos da maioria das coletas 1 e 2 situam-se aquém do limiar detectável por citometria (0,5%).

Os valores de Hsp90 relacionam-se linearmente com a carga leucêmica da MO, sendo ela o órgão de origem e expansão das células de LLA (COBALEDA; SÁNCHEZ-GARCÍA, 2009). No caso do xenotransplante, entretanto, a LLA é injetada na veia caudal e encontra-se em uma situação “artificial”, já em circulação, de modo que órgãos como baço e fígado, tanto quanto a MO, acabam sendo infiltrados e servem de nicho para a expansão da LLA, caso as condições de microambiente sejam adequadas. Nossos resultados indicam que tanto a MO quanto fígado apresentam a maior infiltração de LLA, indicando serem estes os locais preferenciais de expansão da doença. Em dois casos de LLA xenotransplantados, a porcentagem de LLA infiltrada nesses órgãos foi inferior a 0,1%, caracterizando uma situação de doença residual mínima. Na maioria dos casos, a porcentagem de infiltração desses órgãos primários no momento em que os níveis de Hsp90 ultrapassaram o valor de corte foi de 1%, o que em termos de avaliação citológica convencional corresponde a um valor abaixo dos 5% considerados como critério de remissão. Este resultado indica que a quantificação da Hsp90 como marcador pode ser utilizado como critério para teste de novas drogas a serem usadas em situação de remissão medular, ou seja, ao final da terapia de indução que usualmente dura 1 mês nos atuais protocolos de tratamento.

O acréscimo dos níveis de Hsp90 acompanhando o número de blastos na MO, fígado e baço evidencia a produção da proteína pelos blastos medulares (CHENG et al., 2008), assim

como o potencial da Hsp90 como marcador e indicador da progressão leucêmica. Apenas para uma das leucemias utilizadas pode-se observar que todos os pontos de Hsp90 ficaram abaixo do *cut-off* da citometria da MO. Provavelmente essas células produzem muito Hsp90 quando comparadas com as outras LLA, o que permite detecção por ELISA a partir de um número menor de blastos (Fig. 10, triângulos rosa).

Ao comparar os resultados do fígado e da MO quanto aos eventos que estão abaixo do limiar de detecção pela citometria (<0,5% de células huCD45+), observa-se que a maioria desse eventos são de LLAs-T. A baixa carga leucêmica nesses órgãos em relação às LLAs-T e a detecção antecipada dessas LLAs por ELISA de Hsp90, evidencia um grande potencial preditivo para o diagnóstico de leucemias T (Fig. 10, Fígado e MO, triângulos amarelos e rosa).

Com base nesses resultados pode-se afirmar que a Hsp90 tem um grande potencial como marcador da instauração e progressão da LLA nos animais, representando de forma fidedigna a carga leucêmica dos camundongos.

A grande similaridade entre a distribuição dos eventos da MO e do fígado e o maior coeficiente de regressão visto para este órgão, remete à importância do fígado para o desenvolvimento hematopoiético no recém-nascido. Nos 10 meses iniciais de vida, este órgão é o maior responsável pela produção de células sanguíneas, assim como a capacidade de repopulação de células tronco hematopoiéticas do fígado de camundongos neonatos é maior do que a da própria MO (HARRISON; ASTLE, 1997). Além disso, em dados não publicados de nosso grupo, observa-se números similares de infiltração leucêmica inicial no fígado e na MO.

Para avaliar este fato, comparamos as porcentagens de células huCD45+ do fígado e da medula para as LLAs nos dois primeiros pontos de coleta (Fig. 11), dependendo se a LLA em questão atingiu o limiar de 0,1 ng/mL de Hsp90 (Fig. 7).

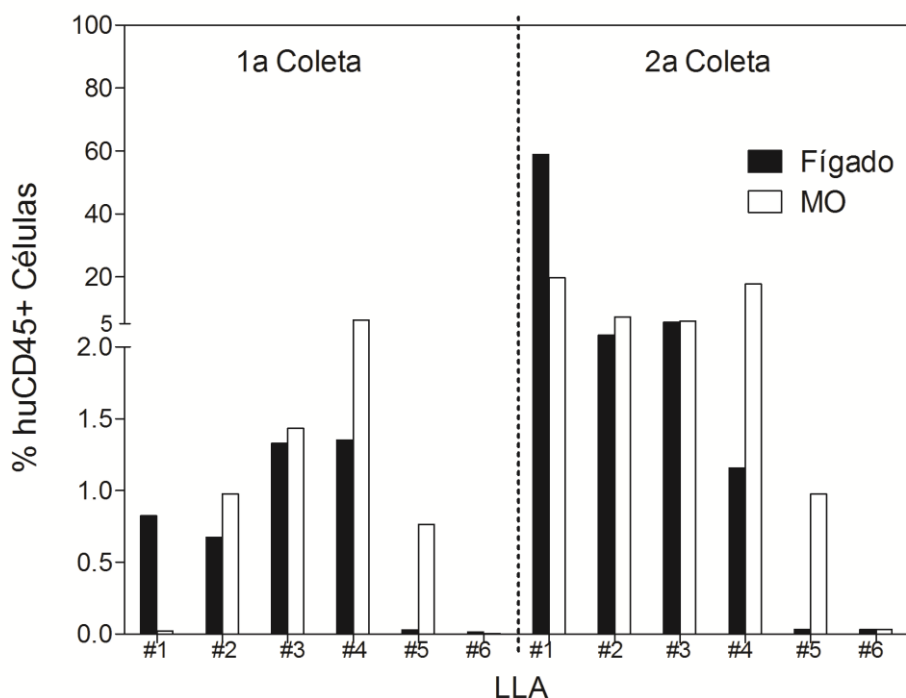


Figura 11. Porcentagens de células huCD45+ do fígado e da medula nas duas primeiras coletas. Comparação par-a-par das porcentagens de células leucêmicas do fígado e da medula nas duas primeiras coletas, de acordo com a semana que o limiar de Hsp90 foi atingido para todas as LLAs. Cada par de barras - brancas e pretas - correspondem a uma LLA, nomeadas pelos números no eixo x. O eixo Y está dividido em ramos com diferentes escalas. Cada barra representa valores de média de 3 animais. Barras pretas representam os valores para o fígado e as brancas, para a medula.

A comparação pareada das porcentagens de células huCD45+ do fígado e da medula mostra que, em geral, a maioria das LLAs mostram porcentagens de células na medula levemente maiores do que no fígado nesses pontos iniciais da doença, embora muito próximas. Entretanto, para a LLA#1 as porcentagens do fígado são muito superiores do que as da medula, provavelmente devido a uma característica própria dessa leucemia que tende a

migrar para o fígado anteriormente à medula. Contrariamente, para a LLA#5, observa-se porcentagens mais altas para a medula do que para o fígado (Fig. 11).

Estes resultados reiteram o importante papel do fígado na LLA, atraindo os blastos leucêmicos concomitantemente com a medula se destacando como um órgão primário de desenvolvimento da doença neste modelo de estudo. Em outros estudos de progressão leucêmica em modelo animal, observa-se que a medula é o primeiro órgão de instauração da LLA, podendo ser colonizada até 2 semanas previamente ao fígado (LOCK et al., 2002), entretanto os animais utilizados nestes trabalhos sofreram irradiação pré-inoculação, o que pode ter provocado modificações substanciais em seus organismos e ter liberado totalmente a medula para o povoamento pelas células inoculadas.

Sobretudo, estes resultados suportam os encontrados na comparação dos níveis de Hsp90 plasmáticos com a porcentagem de células leucêmicas nestes dois órgãos, evidenciando a boa correlação observada em ambos os casos (Fig. 10).

Para avaliar o comportamento dos níveis de Hsp90 na progressão das LLAs analisamos a variação das concentrações de Hsp90 nos três pontos de coleta (Fig. 12).

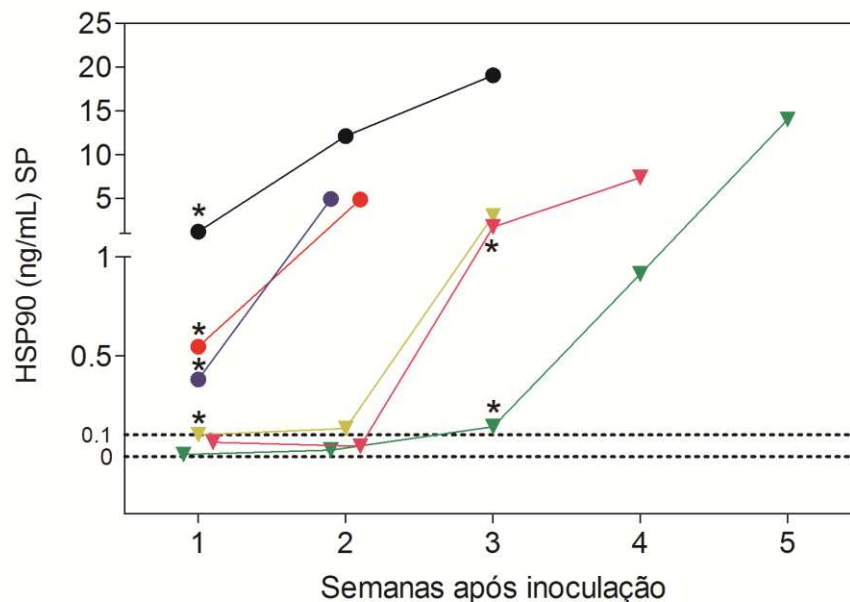


Figura 12. Concentração de Hsp90 das diferentes LLAs no decorrer das semanas após a inoculação. Evolução dos níveis plasmáticos de Hsp90 quantificados por ELISA ao decorrer das semanas de coleta após a inoculação da leucemia. Cada evento representa valores de média de 3 animais. As diferentes leucemias utilizadas estão representadas por cores. Triângulos são leucemias T, círculos leucemias B. Asteriscos representam a semana de início do sacrifício dos animais para cada leucemia. O eixo Y está dividido em ramos com diferentes escalas. Alguns grupos não tiveram animais suficientes para continuação até a terceira semana após início do sacrifício.

As concentrações plasmáticas de Hsp90 claramente aumentam ao longo do desenvolvimento da doença. As médias dos níveis proteicos para todas as LLAs estudadas mostram que o incremento das concentrações de Hsp90 segue uma forte tendência de crescimento com o passar do tempo. Considerando cada leucemia individualmente, um padrão similar também é observado. Este comportamento verificado para a variação na concentração de Hsp90 durante as semanas, fortalece sua característica como marcador indireto de LLA em modelo animal (Fig. 12).

Curiosamente, as LLAs-B foram diagnosticadas por ELISA de Hsp90 já na primeira semana após a inoculação, enquanto para as LLAs-T apenas 1 delas apresentou concentração

de Hsp90 acima do *cut-off* na primeira semana após inoculação, sendo que as outras duas foram diagnosticadas apenas na terceira semana (Fig. 12).

Para verificar a se a carga leucêmica de cada órgão tem relação com a porcentagem de células leucêmicas circulantes no sangue, comparamos a porcentagem de células leucêmicas par-a-par entre cada órgão e o sangue (Fig. 13).

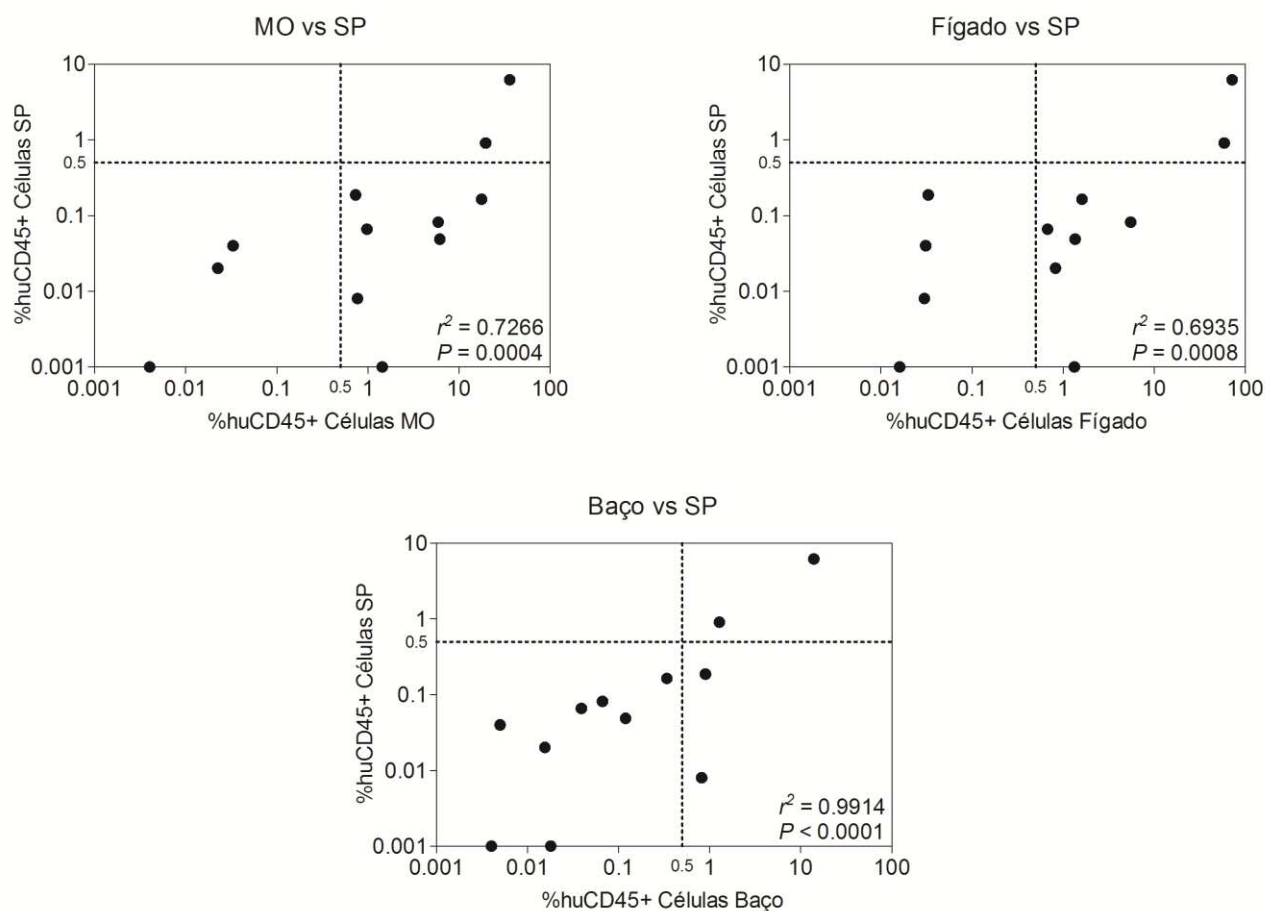


Figura 13. Correlação entre porcentagem de células huCD45+ da MO, fígado e baço com a do SP. Comparação da correlação entre a porcentagem de células huCD45+ do SP e a porcentagem de células huCD45+ dos outros órgãos, quantificados por citometria. Dados em escala de log₁₀. O *cut-off* utilizado na citometria é de 0,5% (retas pontilhadas) extrapolando-se o adotado para o SP, para cada órgão. Cada evento representa valores de média dos 3 animais nos parâmetros avaliados.

Primeiramente, observa-se que a grande maioria dos animais com “pega” já estabelecida na MO ou fígado estão com porcentagem de blastos abaixo do *cut-off* no sangue, não sendo passíveis de detecção pelo diagnóstico usual por citometria do SP, mais uma vez evidenciando o fato de que o ELISA para Hsp90 permite antecipar a detecção da “pega”. Para a MO e fígado, a maioria dos eventos está além do limiar para cada órgão, indicando que a leucemia já seria detectável se a aferição da carga tumoral fosse feita nestes órgãos, o que não é possível com o animal vivo ou em protocolos restritos de tratamento que dependem de análise de sobrevivência (Fig. 13).

Como mencionado na introdução, o processo de entrada em circulação das células de LLA é um fenômeno regulado, que embora dependa do grau de infiltração do órgão primário de desenvolvimento da leucemia, também responde a quimiocinas e seus receptores. A análise da relação entre os níveis de blastos em circulação no sangue e a porcentagem de infiltração nos diferentes órgãos, chama a atenção à alta associação entre o percentual de blastos no sangue e a infiltração no baço (Fig. 13). A estreita relação entre o percentual de infiltração no baço e de blastos no sangue, quando na verdade a maior carga leucêmica está no fígado e MO, sugere que o percentual de blastos no sangue não é um bom marcador da leucemia. Ainda mais se pensarmos na avaliação de resposta à quimioterapia, tendo em mente que a distribuição e metabolização das drogas pode ser variável de órgão para órgão.

4.3 Influência de quimioterapia nos níveis de Hsp90 e IGFBP2.

Grande parte dos protocolos de estudo de leucemia em modelo animal envolve testes utilizando quimioterápicos. Como um bom marcador de leucemia deve ser confiável em todos os aspectos, inclusive em protocolos de tratamentos com quimioterapia, avaliamos se os níveis de Hsp90 sofrem interferência da quimioterapia conforme delineado na figura 6 e comparamos com os apresentados pela IGFBP2 (Fig. 14).

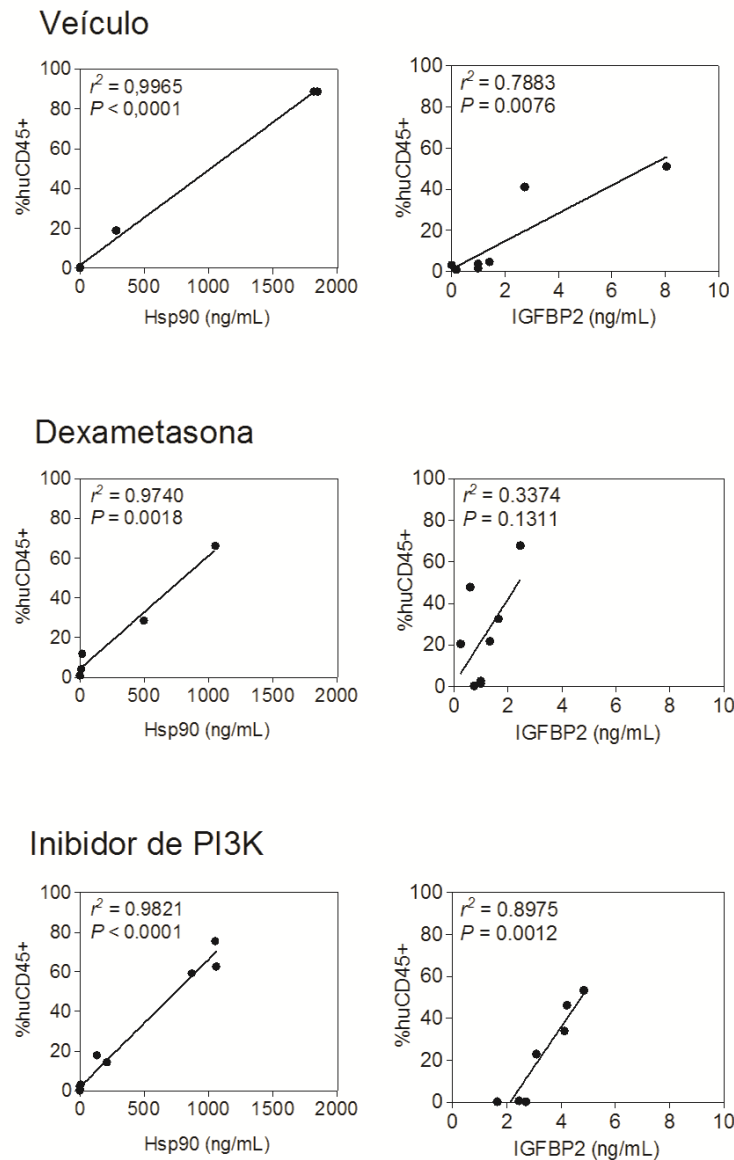


Figura 14. Interferência de quimioterapia nos níveis de Hsp90 e IGFBP2. Correlação entre níveis de Hsp90 e IGFBP2 e porcentagem de células huCD45+ do SP de animais tratados com veículo (cloreto de sódio 0,9%), Dexametasona e AS605240 (inibidor de PI3K). Níveis de Hsp90 não sofreram interferência dos quimioterápicos, mostrando boas correlações para todos os tratamentos. Em geral os coeficientes de IGFBP2 foram menores do que os para Hsp90, especialmente para o tratamento com Dexametasona.

Tanto a Hsp90 quanto a IGFBP2 apresentaram boa correlação com a porcentagem de células huCD45+ do sangue em animais não tratados ou tratados com inibidor de PI3K. Em ambos os casos, entretanto, a Hsp90 mostrou melhor regressão linear do que IGFBP2 (Fig. 8 e 14).

Considerando o tratamento com Dexametasona, corticóide comumente utilizado no tratamento de LLA, Hsp90 apresentou coeficientes próximos ao dos vistos para animais que receberam apenas solução salina. Este resultado indica que, apesar da Dexametasona ter como alvo uma proteína do complexo Hsp90 (INABA; PUI, 2010), o corticóide não afeta a produção de Hsp90 diretamente e que a secreção desta chaperona não sofre flutuações pela droga. Ao contrário, os níveis de IGFBP2 foram desproporcionalmente afetados pelo tratamento com Dexametasona e em menor escala pelo inibidor de PI3K. Sabe-se que células de linfoma muito dependentes da via das IGF, a qual a IGFBP2 pertence, são sensíveis à Dexametasona (OGAWA et al., 2000). E também, assim como mostrado em estudos anteriores, a Dexametasona provoca aumento da produção de IGFBP2 ao passar do tempo (CHENG et al., 1998), alterando os níveis dessa proteína, corroborando nossos resultados (Fig. 14).

A visível interferência do corticóide nos níveis de IGFBP2 indicam que esta proteína não é um bom marcador para o modelo animal da LLA, ao contrário da Hsp90, que parece inalterado pelos tratamentos aqui testados.

O inibidor de PI3K modifica a secreção de IGFBP2, como evidenciado ao se comparar o efeito do inibidor e do veículo nos níveis dessa proteína (Fig. 14). Esta alteração pode estar ligada ao aumento da expressão de IGFBP2 quando a PI3K não está sendo inibida. Em

estudos prévios, a perda de função de PTEN, fosfatase que inibe PI3K na célula, está associada à superexpressão de IGFBP2 (POLLAK; SCHERNHAMMER; HANKINSON, 2004), assim esta via pode estar comprometida com o uso do inibidor específico de PI3K, alterando diretamente os níveis de IGFBP2.

Considerando que os níveis de Hsp90 representam bem a carga leucêmica dos animais e antecipam o diagnóstico usual por citometria (Fig. 10), juntamente com a robustez quanto a possíveis flutuações devido ao tratamento por quimioterápicos (Fig. 14), apresentamos aqui esta proteína como um marcador confiável da carga leucêmica em modelo animal.

4.4 Considerações sobre o método desenvolvido.

Com base nos experimentos realizados, podemos afirmar que o ELISA de Hsp90 plasmático é uma alternativa mais rápida, sensível e robusta para diagnóstico e acompanhamento de LLA em modelo animal, gerando resultados mais confiáveis que os métodos comumente utilizados.

O método aqui estabelecido pode ser aplicado em estudos que utilizam camundongos como modelo animal de LLA e buscam um método de diagnóstico precoce que seja capaz de detectar a doença nos estágios iniciais, podendo ser de grande utilidade para pesquisas com drogas aplicadas em fases de baixa carga leucêmica.

Neste estudo, nos interessamos em avaliar o potencial da Hsp90 como marcador do número de células leucêmicas. Futuramente, entretanto, será interessante estudar a função dessa proteína na leucemogênese, pois a Hsp90 tem sido estudada como um potencial alvo para drogas contra o câncer (GROVER et al., 2011). Alguns sítios estratégicos da proteína, como o de ancoragem de ATP na Hsp90 tem sido estudados por vários grupos como alvo inibitório (RICHARDSON et al., 2011). Além disso, a Hsp90 α possui uma ação extracelular, aparentemente envolvida com metástase tumoral via interações com a MMP-2 (metaloproteinase de matriz-2). Anticorpos contra Hsp90 inibem claramente a metástase tumoral, o seu crescimento e sua angiogênese (SONG et al., 2010).

Ademais, o potencial desse método deve ser verificado quanto ao acompanhamento e diagnóstico de pacientes com LLA humana, juntamente com os métodos da rotina clínica, levando em consideração o background dos níveis normais de Hsp90 de indivíduos saudáveis.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Considerando os objetivos propostos e os resultados obtidos, concluímos que:

- 5.1 Dentre os três marcadores testados, somente a Hsp90 se mostrou viável para diagnóstico e acompanhamento da LLA em modelo animal, por apresentar baixo background, ótimas correlações com a carga leucêmica nos animais e não sofrer interferência da quimioterapia.
- 5.2 O percentual de blastos leucêmicos no sangue correlaciona-se melhor com o percentual de infiltração de blastos no baço e não tanto com infiltração em medula óssea e fígado.
 - 5.2.1 A medula óssea e fígado são os órgãos primários de expansão da leucemia xenotransplantada em animais NOD/SCID.
- 5.3 Os níveis plasmáticos de Hsp90 correlacionam-se bem e semelhantemente com a carga leucêmica para medula óssea, fígado, baço e sangue periférico
 - 5.3.1 O nível plasmático de Hsp90 permite diagnóstico antecipado de pelo menos 1 semana da “pega” da leucemia em comparação com o realizado por citometria de células CD45+ do sangue.
 - 5.3.2 O nível plasmático de Hsp90 permite detectar a presença de pelo menos 1% de células leucêmicas na medula óssea e/ou fígado dos animais transplantados, e em alguns casos níveis abaixo de 0,1%.
- 5.4 Os níveis de Hsp90 não sofrem interferência do tratamento com o quimioterápico Dexametasona ou o inibidor de PI3K AS605240, os quais afetam significativamente o metabolismo das células de LLA.

Portanto, podemos dizer que o ELISA de Hsp90 plasmático é um método robusto, rápido e sensível para o diagnóstico e acompanhamento da LLA xenográfica em modelo animal.

REFERÊNCIAS

- BARRIOS, V. et al. Insulin-like growth factor-binding protein-2 levels in pediatric patients with growth hormone deficiency, eating disorders and acute lymphoblastic leukemia. **Hormone research**, v. 53, n. 5, p. 221–7, jan. 2000.
- BIENÍ, E.; BALCERSKA, A.; CIESIELSKI, D. Does beta-2 microglobulin measurement play role in diagnostics of childhood malignancies. **Wiadomości lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)**, v. 57, n. 1-2, p. 8–11, jan. 2004.
- BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. **Nature reviews. Cancer**, v. 1, n. 1, p. 46–54, out. 2001.
- BOSMA, G. C.; CUSTER, R. P.; BOSMA, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. **Nature**, v. 301, n. 5900, p. 527–530, 10 fev. 1983.
- CHENG, C.-F. et al. Transforming growth factor alpha (TGFalpha)-stimulated secretion of HSP90alpha: using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGFbeta-rich environment during wound healing. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 10, p. 3344–58, maio 2008.
- CHENG, S. L. et al. Regulation of insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in human bone marrow stromal cells by dexamethasone. **Journal of cellular biochemistry**, v. 71, n. 3, p. 449–58, 1 dez. 1998.
- COBALEDA, C.; SÁNCHEZ-GARCÍA, I. B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 31, n. 6, p. 600–9, jun. 2009.
- COUSTAN-SMITH, E. et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 117, n. 23, p. 6267–76, 9 jun. 2011.
- CRAZZOLARA, R. et al. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **British journal of haematology**, v. 115, n. 3, p. 545–53, dez. 2001.
- DAVIDOFF, A. M. Pediatric oncology. **Seminars in pediatric surgery**, v. 19, n. 3, p. 225–33, ago. 2010.
- DICKSON, P. V et al. In vivo bioluminescence imaging for early detection and monitoring of disease progression in a murine model of neuroblastoma B. p. 1172–1179, 2007.
- FOWLER, B. A. et al. Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, n. 2, p. 237–245, 2005.
- GRAUX, C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): Clinical and therapeutic relevance. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 44, n. 2, p. 183–189, 2011.

- GREENBAUM, A. M.; LINK, D. C. Mechanisms of G-CSF-mediated hematopoietic stem and progenitor mobilization. **Leukemia**, v. 25, p. 211–217, 2011.
- GROVER, A. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Blocking the chaperone kinome pathway : Mechanistic insights into a novel dual inhibition approach for supra-additive suppression of malignant tumors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 404, n. 1, p. 498–503, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HAROUSSEAU, J.-L.; MOREAU, P. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 25, p. 2645–54, 18 jun. 2009.
- HARRISON, D. E.; ASTLE, C. M. Short- and long-term multilineage repopulating hematopoietic stem cells in late fetal and newborn mice: models for human umbilical cord blood. **Blood**, v. 90, n. 1, p. 174–81, 1 jul. 1997.
- INABA, H.; PUI, C.-H. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. **The lancet oncology**, v. 11, n. 11, p. 1096–106, nov. 2010.
- INOUE, Y.; IZAWA, K.; TOJO, A. Monitoring of disease progression by bioluminescence imaging and magnetic resonance imaging in an animal model of hematologic malignancy. v. 35, p. 407–415, 2007.
- MOHNIKE, K.; WEX, H.; VORWERK, P.; KLUBA, U.; AUMANN, V.; MITTLER, U. High Serum IGFBP-2 in Acute Lymphoblastic Leukemia may be an Indication for Increased Risk of Relapse. **Haematology and Blood Transfusion**, v. 39, p. 375–378, 1998.
- KUCIA, M. et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. **Journal of molecular histology**, v. 35, n. 3, p. 233–45, mar. 2004.
- KÜHNL, A.; GRIMWADE, D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. **International journal of hematology**, p. 153–163, 13 jul. 2012.
- LAPIDOT, T.; KOLLET, O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. **Leukemia**, v. 16, n. 10, p. 1992–2003, 25 out. 2002.
- LAPIDOT, T.; PETIT, I. Current understanding of stem cell mobilization : The roles of chemokines , proteolytic enzymes , adhesion molecules , cytokines , and stromal cells. **Experimental hematology**, v. 30, p. 973–981, 2002.
- LAUTEN, M. et al. Expression of heat-shock protein 90 in glucocorticoid-sensitive and -resistant childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Leukemia**, v. 17, n. 8, p. 1551–6, ago. 2003.

- LEBRET, T. et al. HSP90 Expression : A New Predictive Factor for BCG Response in Stage Ta-T1 Grade 3 Bladder Tumours. **European Urology**, v. 51, p. 161–167, 2007.
- LIEM, N. L. M. et al. Characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia xenograft models for the preclinical evaluation of new therapies. **Blood**, v. 103, n. 10, p. 3905–14, maio 2004.
- LOCK, R. B. et al. The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse. **Blood**, v. 99, n. 11, p. 4100–4108, maio 2002.
- MEYER, L. H.; DEBATIN, K.-M. Diversity of human leukemia xenograft mouse models: implications for disease biology. **Cancer research**, v. 71, n. 23, p. 7141–4, 1 dez. 2011.
- MIRKOWSKA, P. et al. Leukemia surfaceome analysis reveals new disease-associated features. **Blood**, 6 maio 2013.
- MISAGHIAN, N. et al. Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. **Leukemia**, v. 23, n. 1, p. 25–42, jan. 2009.
- MOELLERING, R. E. et al. Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. **Nature**, v. 462, n. 7270, p. 182–188, 2009.
- MOMBAERTS, P. et al. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. **Cell**, v. 68, n. 5, p. 869–877, 1992.
- OGAWA, M. et al. Cytokines Prevent Dexamethasone-induced Apoptosis via the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways in a New Multiple Myeloma Cell Line Cytokines Prevent Dexamethasone-induced Apoptosis via the Activation of. **Cancer Research**, n. 60, p. 4262–4269, 2000.
- PELED, A et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 3289–96, 1 jun. 2000.
- PETIT, I. et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. **Nature immunology**, v. 3, n. 7, p. 687–94, jul. 2002.
- PIETERS, R. et al. In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. **Blood**, v. 76, n. 11, p. 2327–36, 1 dez. 1990.
- POLLAK, M. N.; SCHERNHAMMER, E. S.; HANKINSON, S. E. Insulin-like growth factors and neoplasia. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 7, p. 505–18, jul. 2004.
- PUI, C.; CAMPANA, D.; EVANS, W. E. Reviews Childhood acute lymphoblastic leukaemia – current status and future perspectives. **Lancet**, v. 2, p. 597–607, 2010.

- PUI, C.; RELING, M. V; EVANS, W. E. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Rev clin exp hametol**, v. 6.2, 2002.
- PUI, C.-H. et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **Journal of clinical oncology**, v. 29, n. 5, p. 551–65, 10 fev. 2011.
- PUI, C.-H. et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? **Blood**, v. 120, n. 6, p. 1165–74, 9 ago. 2012.
- RICHARDSON, P. G. et al. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers. **British Journal of Haematology**, v. 90, p. 1–13, 2011.
- RONGVAUX, A. et al. Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. **Annual review of immunology**, n. 31, p. 635–74, jan. 2013.
- SAGLIO, G. et al. A 76-kb duplicon maps close to the BCR gene on chromosome 22 and the ABL gene on chromosome 9: possible involvement in the genesis of the Philadelphia chromosome translocation. **PNAS**, v. 99, n. 15, p. 9882–7, 23 jul. 2002.
- SCHATZ, D. G.; OETTINGER, M. A; BALTIMORE, D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. **Cell**, v. 59, n. 6, p. 1035–48, 22 dez. 1989.
- SHIVTIEL, S. et al. CD45 regulates homing and engraftment of immature normal and leukemic human cells in transplanted immunodeficient mice. **Experimental hematology**, v. 39, n. 12, p. 1161–1170.e1, dez. 2011.
- SHULTZ, L. D. et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. **Journal of immunology**, v. 154, n. 1, p. 180–91, 1 jan. 1995.
- SHULTZ, L. D. et al. NOD/LtSz-Rag1null mice: an immunodeficient and radioresistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells. **Journal of immunology**, v. 164, n. 5, p. 2496–507, 1 mar. 2000.
- SINNETT, D.; LABUDA, D.; KRAJINOVIC, M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers--the childhood leukemia experience. **Familial cancer**, v. 5, n. 1, p. 35–47, jan. 2006.
- SONG, X. et al. The Regulatory Mechanism of Extracellular Hsp90 α on Matrix Metalloproteinase-2 Processing and Tumor Angiogenesis * □. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 51, p. 40039 – 40049, 2010.
- TAVOR, S. CXCR4 Regulates Migration and Development of Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells in Transplanted NOD/SCID Mice. **Cancer Research**, v. 64, n. 8, p. 2817–2824, 15 abr. 2004.
- TEICHER, B. A; FRICKER, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 11, p. 2927–31, 1 jun. 2010.

TISSING, W. J. E. et al. mRNA expression levels of (co)chaperone molecules of the glucocorticoid receptor are not involved in glucocorticoid resistance in pediatric ALL. **Leukemia**, v. 19, n. 5, p. 727–33, maio 2005.

TOMAYKO, M. M.; REYNOLDS, C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. **Cancer Chemotherapy and Phamacology**, n. 24, p. 148–154, 1989.

WANG, X. et al. The regulatory mechanism of Hsp90alpha secretion and its function in tumor malignancy. **PNAS**, v. 106, n. 50, p. 21288–93, 15 dez. 2009.

WHITESELL, L.; LINDQUIST, S. L. HSP90 and the chaperoning of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 10, p. 761–72, out. 2005.

XIAO, K. et al. Study of heat shock protein HSP90 alpha, HSP70, HSP27 mRNA expression in human acute leukemia cells. **Journal of Tongji Medical University**, v. 16, n. 4, p. 212–6, jan. 1996.

YUFU, Y.; NISHIMURA, J.; NAWATA, H. High constitutive expression of heat shock protein 90α in human acute leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 16, n. 6, p. 597–605, 1992.

ZELENT, A.; GREAVES, M.; ENVER, T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Oncogene**, v. 23, n. 24, p. 4275–83, 24 maio 2004.

ZUNA, J. et al. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 16, p. 5355–60, 15 ago. 2004.

ANEXOS

Anexo 1. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp



UNICAMP

CEUA/Unicamp

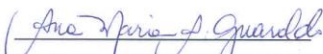
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Desenvolvimento de modelo animal de leucemia linfóide aguda pediátrica: teste ELISA para monitorar progressão da leucemia" (protocolo nº 2365-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Andrés Yunes / Mateus Milani, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 14 de março de 2011.

Campinas, 14 de março de 2011.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guinaldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/Unicamp



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 12/02/09.
(Grupo II)

PARECER CEP: Nº 1105/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0014.0.144.146-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA E PI3K NA RESISTÊNCIA A DROGAS DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA PEDIÁTRICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Andrés Yunes.

INSTITUIÇÃO: Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/12/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 12/02/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

1- Quantificar aminoácidos no meio de cultura de células de estroma da medula óssea tratadas com IGFBP7 + ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2); 2- Avaliar efeito de IGFBP7+ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2) na sobrevivência de células primárias de LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA) frente à asparaginase, quando em cultura de curta duração, sem estroma; 3- Avaliar efeito de IGFBP7+ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2) na expressão de mRNA de ASNS, glutamina sintetase (GS) e de transportadores de aminoácidos nas células de LLA e do estroma; 4- Tratar células de LLA com diferentes doses de EBIO e verificar viabilidade celular frente a diferentes doses de daunorubicina, quantificando a incorporação intracelular da droga através de citometria de fluxo; 5- Desvendar o mecanismo de fluxo intracelular ligado ao KCNN4, usando substratos e inibidores específicos para os diferentes transportadores; 6- Analisar distribuição intracelular da daunorubicina em células de LLA tratadas ou não com EBIO, por microscopia de fluorescência e co-marcação de lisossomos com Lysotracker blue, do Golgi com NBD-C6-Ceramide e do retículo endoplasmático com DiOC6; 7- avaliar uso do clotrimazol (ou TRAM-34) na sensibilização das células de LLA aos agentes quimioterápicos, in vitro e in vivo (em camundongos); 8- Quantificar níveis de mRNA de GPR56 em amostras de 150 pacientes com LLA e buscar associações com características biológico-clínicas dos pacientes; 9- Confirmar a expressão da proteína GPR56 na superfície das células de LLA, por imunocitoquímica; 10- Sequenciar os exons 3,5,8 e 9 de GPR56 em 30 amostras de DNA ou cDNA de blastos de pacientes e de linhagens de LLA. Serão analisados 3 grupos de pacientes: (i) com doença extramedular ao diagnóstico, (ii) com baixa expressão de GPR56 (<0,05 moléculas de GPR56/ABL), (iii) grupo de pacientes com expressão de GPR56 na mediana; 11- silenciar o GPR56 por iRNA em uma linhagem de LLA e analisar resistência das células a asparaginase quando em cultura com ou sem estroma de medula óssea.

III - SUMÁRIO

O autor relata que 20% a 30% das crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) sofrem recaídas da doença e apresentam maior resistência aos quimioterápicos. Métodos modernos de

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/Unicamp (continuação).



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

análise de expressão gênica possibilitam a identificação de genes relacionados ao processo de resistência à drogas. Segundo referências apresentadas pelo autor, as células da recaída são altamente proliferativas e mesmo assim mais resistente à quimioterapia, esse processo pode estar relacionado com a maior expressão de genes de reparo do DNA e de anti-apoptose, que compensariam os efeitos da quimioterapia. A interação de blastos leucêmicos com as células estromais da medula óssea (obs: o estroma é o tecido conjuntivo de sustentação de um órgão) aumenta a resistência da LLA à leucemia.

Dois sub-projetos fazem parte do projeto maior. No primeiro a proposta é estudar a função dos genes IGFBP7, KCNN4 e GPR56 na resistência à drogas para o tratamento de LLA, no contexto da interação leucemia-estroma. Para realização desses sub-projeto serão incluídas amostras de sangue/medula óssea de crianças portadoras de leucemia linfóide aguda, sem tratamento prévio, atendidas integralmente no Centro Infantil Boldrini, a pesquisa será feita com o restante do material colhido para diagnóstico e não acarretará em nenhum procedimento ao paciente. É prevista a utilização de 150 amostras retrospectivas. São descritos os procedimentos para obtenção de amostras com, pelo menos, 85% de blastos leucêmicos, basicamente centrifugação diferencial e filtração. As amostras são preservadas em nitrogênio líquido. O controle será feito com amostras provenientes de doadores normais e de pacientes com resultado negativo após exame. O DNA de indivíduos normais será obtido de cartões de triagem neonatal (CIPOI-UNICAMP). Os testes laboratoriais serão realizados com amostras não identificadas e descartadas após seu uso. Segundo o autor a pesquisa com o DNA de tecido estocado não precisa de autorização, desde que seja mantido o anonimato do depositante. O teste de viabilidade e apoptose celular será realizado em cultura em placa, sendo adicionados os produtos de estudo (IGFBP7, insulina, IGF-1, IGF-2, EBIO, clotrimazol, AS605240, daunorubicina, vincristina, asparaginase, corticóide) e avaliação final será colorimétrica.

A quantificação da expressão gênica será por extração total de RNA e síntese de DNA e os mesmos primers utilizados para o PCR também serão usados no sequenciamento.

No segundo sub-projeto existe a proposta de sequenciar o cDNA de IL-7R, e o domínio JH2 de Jak1 e Jak3, dos blastos leucêmicos de 50 casos de LLA-T (linhagem linfocitária - T). Os dados de polimorfismos do IL-7R serão comparados com frequências publicadas da população caucasiana. Além disso, pretende-se analisar a frequência dos mesmos polimorfismos em amostras de 40 indivíduos saudáveis da nossa população. Caso seja encontrada alguma mutação no IL-7R ou Jak, o cDNA mutante será clonado, assim como o receptor IL-2R, e ambos serão transfectados em células HEK293 e uma série de testes será realizada.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/Unicamp (continuação).



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

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 I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de janeiro de 2009.

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

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br