

WELBERT DE OLIVEIRA PEREIRA

**PAPEL DO GENE DA
SÍNDROME DE WISKOTT ALDRICH (WASP)
NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

WELBERT DE OLIVEIRA PEREIRA

**PAPEL DO GENE DA
SÍNDROME DE WISKOTT ALDRICH (WASP)
NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante-Mendes

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pereira, Welbert de Oliveira.

Papel do gene da síndrome de Wiskott Aldrich (WASP) na leucemia mielóide crônica (LMC) / Welbert de Oliveira Pereira. -- São Paulo, 2011.

Orientador: João Gustavo Pessini Amarante-Mendes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Biologia celular e molecular da célula tumoral.

Versão do título para o inglês: Role of Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) in the chronic myeloid leukemia (CML)

Descritores: 1. Neoplasias 2. Leucemia mielóide 3. Apoptose 4. Terapia 5. Marcador molecular 6. I. Amarante-Mendes, João Gustavo Pessini II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0175/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Welbert de Oliveira Pereira

Título da Tese: Papel do Gene da Síndrome de Wiskott Aldrich (WASP) na Leucemia
Mielóide Crônica

Orientador(a): João Gustavo Pessini Amarante-Mendes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado (a)

Reprovado (a)

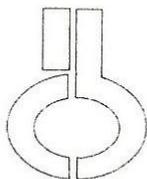
Examinador (a): Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Nome:.....
Instituição:.....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

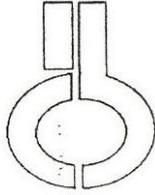
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **79** nas fls. **105** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **João Gustavo P. Amarante –Mendes**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Papel de WASP na leucemia Mielóide Crônica*" do qual participam o(s) alunos **Welbert de Oliveira Pereira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **15.07.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 18 de julho de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.77330 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

PARECER 724 /CEP

São Paulo, 21 de junho de 2006.

Prezado Senhor,

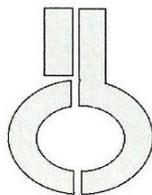
A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB em sua 66ª reunião realizada em 19.06.06, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Regulação da expressão gênica diferencial de hsh2d, was, trif, sh2d2a e ash21 em células Bcr-Abl positivas e conseqüências biológicas dessa regulação na LMC*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, a qual sugere que no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, evitasse em colocar a descrição explícita da doença, que poderá acarretar trauma psico ao paciente e dados científicos e epidemiológico que poderá aumentar o sofrimento.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.
WELBERT DE OLIVEIRA PEREIRA
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091 7733 - telefax: (55) (011) 3091 8405

Decl. CEP SH. 029.11

DECLARAÇÃO

Em adendo ao parecer 724/CEP, de 21.06.06, informo que o título do Projeto foi alterado para **"PAPEL DO GENE WASP NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA"** não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 13 de junho de 2011.

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Dedico este trabalho aos meus pais Afrânio e Marilucia, e aos meus irmãos Wátala (in memoriam) e Wesley. Vocês sempre foram e serão o começo de tudo.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, que me provê absolutamente tudo e mais um pouco do que necessitei até o dia de hoje. Minhas orações preguiçosas estão longe de agradecer todas as oportunidades que têm sido dadas a mim ao logo dessa vida. Meu obrigado aos amigos do outro plano, pelas sugestões, intuições e consolo.

Meus pais queridos. O Sr. Afrânio Alves Pereira, que buscou me preparar sempre para a vida, de um ponto de vista prático. Nossas brincadeiras de testar o conhecimento do outro sempre me estimularam e, certamente, moldaram em mim essa curiosidade e necessidade de descobrir explicações. Dona Marilucia de Oliveira Pereira, minha mãe querida. O que seria de mim sem seus exemplos de simplicidade. Eu ter nascido sob o leito de seus cuidados foi um presente, um privilégio.

Obrigado meu amado irmão Watila (*in memorian*), que sempre vestiu a camisa de irmão mais velho, zeloso e conselheiro, alimentando meus sonhos sem deixar que meus pés desgrudassem do chão.

Agradeço ao Wesley, meu irmão querido, cuja dedicação à profissão e amor à família me orgulham e me servem de exemplo.

Agradeço à Ariana e Claudia, pelo carinho e amizade, e aos meus sobrinhos Paula, Wallace e Samuel, que me dão alegria quando nos reencontramos e me estimulam a me tornar um bom tio, que possa lhes servir de exemplo.

Obrigado Tia Rose e Tio Valmir, que desde sempre me receberam em seu lar como um filho e ainda hoje abrem seus sorrisos para ouvir minhas novidades. Eu estarei sempre ao seu dispor para invertermos nossos papéis um dia.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos de Minas que contribuíram de alguma forma para a concretização deste manuscrito, desta etapa, desta jornada.

Obrigado a Professora Ana Paula e Daniela Fabrino da Federal de Juiz de Fora, que me iniciaram no caminho da pesquisa.

Obrigado ao Seu Walter e Dona Irene, que me receberam em sua casa e por muitas vezes me deram um norte para me orientar. Foram (e ainda são) minha família em São Paulo. Obrigado Gica, Luty e Al pelo companheirismo durante esses anos.

Aos amigos que me receberam com muito carinho no laboratório. Agradeço à Ana Elisa, Ricardo, Moki, Clau, Janine, Márcia, Daniel, Axel e Fabíola. Muito obrigado à Jackie, pela grande amiga que é. E agradeço aos colegas do laboratório que ainda me toleram: obrigado Julia, Lu Medina, Tiago, Flávia e Bárbara pelo convívio maravilhoso do dia a dia. Ao grande companheiro Rodolfo, obrigado pela oportunidade que você me concedeu. Maria Emília e Santiago, obrigado pela amizade que cultivamos.

Obrigado à Professora Karina pelo apoio e incentivos. Obrigado ao Professor Rizzo e Professor Niels, que mantiveram seus laboratórios sempre a disposição de minhas necessidades e seu tempo para meus questionamentos. Estou grato pelo apoio, idéias e conversas edificantes que tive com os professores, funcionários e colegas de jornada científica.

Muito obrigado à Dra. Nydia, Claudio, Ruth, Sonia e Carol, pelas oportunidades e pelo aprendizado profissional e pessoal que tenho tido com vocês.

Agradeço à Dra. Yolanda Calle, que abriu as portas de seu laboratório em Londres para nossas idéias. Ao grande amigo Lee Macpherson, com todo seu humor britânico, e à Maija, por mantermos nossa amizade mesmo à distância. A Nahid, Fazlina, Aytug, Darious, Katherine, Jakub, Hairethyn, Jiang e Karthyk, pela boa recepção e auxílio em Londres.

Obrigado minha querida Mary. Sem seu apoio e dedicação tudo seria mais pálido. Contigo aprendo todo dia. Aprenderia muito mais se não fosse um péssimo aluno! Por me encorajar a ir sempre mais longe, obrigado.

Agradeço ao meu Professor e amigo Gustavo. Aprendi muito com nosso convívio, que não se limitou ao âmbito da ciência. Obrigado por me receber em seu laboratório, por depositar em mim sua confiança, por ser, em muitos momentos, meu timoneiro de assuntos pessoais e profissionais. Seguirei aprendendo contigo, discordando

quando achar necessário, como de costume, mas sempre dando todo crédito aos seus ensinamentos, por ter grande apreço ao profissional e ser humano que você é.

Obrigado ao CNPq e CAPES pelas verbas destinadas ao laboratório, os quais auxiliaram-nos neste projeto.

Obrigado a FAPESP, um exemplo de fundação, que nos permite trabalhar com as melhores possibilidades, nos dando a oportunidade de utilizar o dinheiro público de uma forma gratificante.

“A vida necessita de um número razoável de pilares para ser completa. O trabalho garante as contas pagas. A família ampara e alegra. O lazer com os amigos entretém e desestressa. O amor e a paixão motivam e empolgam. E assim escapa-se das tristezas do dia a dia, pois quando um dos pilares estremece, os demais lhe sustentam os ânimos”.

WOP.

RESUMO

Pereira WO. Papel do gene da síndrome de Wiskott Aldrich (WASP) na leucemia mielóide crônica [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Bcr-Abl é a tirosina quinase (TK) responsável por causar a Leucemia Mielóide Crônica (LMC). Esta proteína suprime e super expressão de vários genes, produzindo uma forte resistência a apoptose e um bloqueio da maturação celular no compartimento hematopoiético. Imatinibe e os inibidores de TK de segunda geração produziram resultados fantásticos no tratamento LMC. No entanto, os últimos estudos de *follow-up* mostram que apenas 50% dos pacientes tratados com a segunda geração atingiram a remissão completa, o que significa que metade desses pacientes necessita de um algo melhor do que está disponível. *Wiskott Aldrich Syndrome Protein* (WASP) é um gene essencial para o bom desenvolvimento e função das células hematopoiéticas. Um artigo interessante descreveu WASP sendo capaz de se ligar e inibir a atividade TK de c-Abl. Ante esse contexto, decidimos investigar se WASP poderia ter algum papel ou relevância na LMC. Em primeiro lugar, descobrimos que Bcr-Abl suprime fortemente a expressão do WASP em diferentes linhagens celulares e também em pacientes nas fases acelerada e blástica (mas não em fase crônica). Demonstramos que Bcr-Abl induz, a metilação de sítios CpG no promotor de WASP, provocando o silenciamento deste gene. Além dos mecanismos moleculares, nossos resultados demonstram a relevância de supressão WASP na LMC. Depois de restaurar a expressão de WASP por vetores lentivirais, a linhagem K562 tornou-se mais sensíveis à apoptose induzida por Imatinib, sugerindo que a supressão WASP poderia contribuir para a resistência à droga. Usando um modelo *in vivo* de tumor sólido induzido por K562, nós observamos que, após re-expressarem WASP, as células leucêmicas foram incapazes de produzir tumores, em comparação com K562 selvagem. De volta ao estudo dos pacientes, nós observamos que aqueles exibiam níveis mais suprimidos de WASP apresentaram menor sobrevida global sob tratamento com Imatinibe. Por outro lado, os pacientes que expressaram maiores níveis de WASP tinham maior sobrevida global, sugerindo que a expressão de WASP pode ser importante para a boa resposta ao tratamento com imatinibe. Por fim, nós demonstramos por ensaios de co-immunoprecipitação que WASP interage fisicamente com Bcr-Abl e modula a atividade TK. Em conclusão, Bcr-Abl suprime a expressão WASP por um mecanismo epigenético, e esta regulação para parece ser importante para a evolução da LMC. A re-expressão de WASP modula a atividade da TK Bcr-Abl, tornar as células mais suscetíveis à apoptose e pode contribuir para a boa resposta ao Imatinib e maior sobrevida dos pacientes. Sugerimos que a recuperação da expressão WASP deve ser discutida como uma nova e adicional estratégia para a terapia da LMC.

Palavras-chave: Leucemia Mielóide Crônica. Síndrome de Wiskott Aldrich. Apoptose. Terapia.

ABSTRACT

Pereira WO. The role of Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) in the chronic myeloid leukemia [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Bcr-Abl is the tyrosine kinase (TK) responsible for causing Chronic Myeloid Leukemia (CML). This fusion protein up- and down-regulates several genes and pathways, producing a strong resistance to apoptosis and a blockage of cell maturation in the hematopoietic compartment. Imatinib and TK inhibitors of second generation produced fantastic outcomes in the CML treatment. However, the last follow-up studies provided that only 50% of the patients treated with second generation achieve complete remission, what means that one-half of these patients needs something better. Wiskott Aldrich Syndrome Protein (WASP) is an essential gene for the proper development and function of the hematopoietic cells. An interesting paper described WASP binding and inhibiting the TK activity of c-Abl. In the light of this background, we decided to investigate if WASP could have some role or relevance in the CML context. Firstly, we found that Bcr-Abl strongly down regulated the expression of WASP in different cell lines, and also in CML patients in accelerated and blastic phases (but not in chronic phase). We found out that Bcr-Abl induces, by a TK-independent way, the hyper methylation of CpG sites in the promoter of WASP, causing the silencing of this gene. In addition to the molecular mechanisms, we produced results showing the relevance of WASP suppression in CML. After restoring WASP expression by lenti virus vectors, CML cells became more sensitive to Imatinib-induced apoptosis, suggesting that WASP suppression could contribute to Imatinib resistance. Using an *in vivo* model of solid tumor induced by CML cells, we provided that CML cells expressing WASP were not able to produce tumors, comparing to wild type CML cell lines. Back to the CML patients, we found that patients exhibiting down regulation of WASP presented shorter overall survival under Imatinib regime, suggesting that they are not good responder to this drug. On the other hand, patients who expressed even discrete levels of WASP had longer overall survival, suggesting that WASP can be important to Imatinib treatment. Finally, we investigated how WASP could be counteracting the oncogenic effects of Bcr-Abl. Extraordinary, we showed by co-immune-precipitation assays that WASP physically interacts with Bcr-Abl and modulates the TK activity. In conclusion, Bcr-Abl suppresses WASP expression by an epigenetic mechanism, and this down regulation seems to be important to the evolution of CML. The re-expression of WASP modulates the TK activity of Bcr-Abl, make the CML cells more susceptible to apoptosis and can contribute to the good response to Imatinib and longer overall survival of the patients. We suggest that recovery of WASP expression should be discussed as a new and additional strategy for CML therapy.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia. Wiskott Aldrich syndrome. Therapy. Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ilustração da evolução da LMC a partir de um clone Bcr-Abl positivo.....	18
Figura 2- Origem e estrutura de Bcr-Abl.....	21
Figura 3- Via extrínseca de apoptose induzida por TRAIL.....	23
Figura 4- Via intrínseca de apoptose.....	24
Figura 5- Domínios, interações moleculares e ativação de WASP.....	28
Figura 6- A expressão de WASP é suprimida em pacientes LMC desde a fase acelerada da doença.	42
Figura 7- A expressão de WASP correlaciona negativamente com a de Bcr-Abl em pacientes LMC.	43
Figura 8- Linhagens celulares derivadas de LMC apresentam níveis diminuídos de expressão de WASP.....	44
Figura 9- Expressão estável de Bcr-Abl em duas linhagens originalmente negativas para esse gene induziu o silenciamento completo de WASP.....	45
Figura 10- Bcr-Abl quinase-deficiente é incapaz de silenciar WASP em Jurkat	46
Figura 11- Expressão protéica de WASP após tratamento com Imatinibe em diferentes linhagens Bcr-Abl positivas.....	47
Figura 12- Ilhas CpG localizadas no promotor proximal de WASP estão hiper-metiladas.....	49
Figura 13- Recuperação da expressão de WASP em K562 através de infecção por vetores lentivirais.	50
Figura 14- A expressão de WASP modula negativamente o crescimento celular:	51
Figura 15- As células K562 expressando WASP mostram desvantagem no crescimento celular em co-cultura com a linhagem leucêmica selvagem.....	52
Figura 16- A expressão de WASP não interfere com a taxa de proliferação de K562.....	53
Figura 17- As células K562 expressando WASP sofrem morte celular espontânea.	54
Figura 18- A expressão de WASP torna a linhagem leucêmica K562 mais susceptível à apoptose induzida por Camptotecina, Actinomicina D e radiação Ultra Violeta	55
Figura 19- A expressão de WASP torna a linhagem leucêmica K562 mais susceptível à apoptose induzida por Imatinibe (STI571).....	56
Figura 20- Expressão relativa de genes envolvidos no processo de apoptose após a expressão de WASP em K562	57

Figura 21- A expressão de WASP regula positivamente a expressão TRAIL e de seus receptores de morte DR4 e DR5 na linhagem leucêmica K562	58
Figura 22- Morte celular espontânea induzida pela expressão de WASP nas células leucêmicas é dependente da via de TRAIL.....	60
Figura 23- WASP é capaz de se ligar a Bcr-Abl, provocando uma mudança no padrão de fosforilação de proteínas da célula K562.....	62
Figura 24- A expressão de WASP modula negativamente a capacidade tumorigênica de células leucêmicas em modelo murino. A e B:.....	64
Figura 25- A expressão de WASP correlaciona com maior sobrevida global de pacientes LMC sob tratamento com Imatinibe.....	66
Figura 26- Níveis diminuídos de expressão de WASP podem ser encontrados em outros tipos de leucemias.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bcl-2 – *B cell Lymphoma 2*

CRIB/GBD - *Cdc 42 and Rac interactive binding/ GTP-bound domain*

GRB2 – Proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento

ITK – Inibidores de tirosina quinase

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinases*

NLS – região de sinalização nuclear

OCT1 – *Organic Cation Transporter 1*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PI3K – Fosfatidil-inositol-3 quinase

RCC – Remissão Citogenética Completa

SH3 – *Src homology 3*

STAT-5 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição 5

TNF-alfa – Fator de necrose tumoral alfa

TRAIL – *TNF- related apoptosis inducing ligand*

VCA - *verpoline cofilin homology domains/acidic region*

WASP – Proteína da Síndrome de Wiskott Aldrich (WAS)

WH1/EVH1 - *WASP homology 1/Ena Vasp Homology 1*

WIP - *WASP interact protein*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Leucemia Mielóide Crônica: aspectos gerais:	19
1.2 Bcr-Abl: estrutura molecular e vias de sinalização:.....	22
1.3 Regulação do Processo de Apoptose:	24
1.4 Inibidores de tirosina quinase no tratamento da LMC:.....	28
1.5 WASP: estrutura e funções:.....	30
2 OBJETIVO	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Pacientes:	35
3.2 Linhagens Celulares:	35
3.3 Animais:	36
3.4 Cultivo de células:.....	37
3.5 Coleta e isolamento de células mononucleares de sangue periférico:.....	37
3.6 Extração de RNA:	37
3.7 Síntese de cDNA:	38
3.8 PCR em tempo real:	38
3.9 SDS PAGE e <i>Western Blot</i> :	39
3.10 Avaliação do número absoluto de células em cultura celular:	39
3.11 Avaliação da frequência de populações celulares em co-cultura:.....	40
3.12 Avaliação da proliferação celular:.....	40
3.13 Tratamento das linhagens celulares com Mesilato de Imatinibe:	40
3.14 Tratamento das células com indutores de morte:	40
3.15 Bloqueio da via de TRAIL:	41
3.16 Infecção de linhagens de células humanas com partículas virais contendo DNA recombinantes do gene WASP:.....	41
3.17 Inoculação subcutânea de camundongos:	41
3.18 Determinação da apoptose por fragmentação de DNA:	42
3.19 Análise da metilação de DNA por tratamento com Bissulfito Sódico:.....	42
3.20 Análise estatística dos dados:.....	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Avaliação da expressão e regulação de WASP:.....	44
4.2 Recuperação da expressão de WASP:.....	51

4.3 Consequências biológicas do silenciamento de WASP na proliferação celular:	56
4.4 Consequências biológicas do silenciamento de WASP na resistência a apoptose:	59
4.5 WASP regula a maquinaria molecular de apoptose nas células leucêmicas:	62
4.6 WASP se liga a Bcr-Abl e modula sua atividade tirosina-quinase:	68
4.7 A expressão de WASP em células leucêmicas inibe sua capacidade tumorigênica em modelo <i>in vivo</i> :	71
4.8 O silenciamento de WASP correlaciona-se com pior sobrevida dos pacientes LMC:	74
4.9 Análise <i>in silico</i> da expressão de WASP em outras neoplasias hematológicas:.....	75
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÕES	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Mielóide Crônica: aspectos gerais:

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica causada pela presença do oncogene *BCR-ABL*. Esse gene surge após a translocação cromossômica t(9:22) (q34;q11), quando o gene *c-ABL* presente no cromossomo 9 se funde ao gene *BCR* no cromossomo 22, formando assim um cromossomo 22 encurtado chamado Cromossomo Philadelphia. Sua incidência é de 1,5 casos para cada 100.000 indivíduos no mundo por ano, e cerca de 90% dos pacientes são diagnosticados na fase inicial da doença [1]. No Brasil as Leucemias correspondem à nona modalidade mais freqüente de câncer em homens e mulheres, não havendo dados epidemiológicos para LMC especificamente (www.inca.gov.br).

Crítérios foram estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (os quais geralmente não são utilizados nos *Clinical Trials*) e pelo Centro de Estudos do Câncer *MD Anderson* para a classificação das três fases da doença. Na fase crônica da LMC os pacientes apresentam, em sua maioria, manifestações clínicas como esplenomegalia, fadiga, perda de peso e leucocitose com contagem normal de plaquetas. Durante a fase crônica, os clones Bcr-Abl-positivos estão em expansão na medula óssea e ainda guardam sua habilidade em diferenciar-se nas células maduras, não sendo observados blastos na periferia (Figura 1). Nesta fase, as células mielóides e algumas linfóides circulantes portam o oncogene BCR-ABL [1, 2]. Radich (2010) sugere ainda que a fase crônica deva ser compreendida em dois momentos, que ele denomina “fase crônica inicial” (que seria a descrita acima) e “fase crônica tardia”, quando há mutações no domínio SH1 da porção ABL, bem como quebras no DNA oriundas de anormalidades citogenéticas adquiridas pós-, ou sem tratamento, mas com manifestações clínicas ainda de fase crônica [3].

O curso normal da doença evolui, então, para uma fase acelerada, na qual se observa um aumento dos leucócitos circulantes (mais de 100 mil por microlitro) ou plaquetose (mais que 1 milhão por microlitro), esplenomegalia persistente, mais que 20% de basófilos na medula óssea ou sangue periférico, frequência maior ou igual a 30% de blastos

mais promielócitos na medula óssea, ou de 20% a 30% de apenas blastos na medula óssea. John Goldman entende que as anormalidades citogenéticas marcam a transição para a fase acelerada, na qual os clones leucêmicos respondem menos ao tratamento devido, especialmente, às mutações no sítio de ligação do ATP do domínio SH1 de Bcr-Abl [1]. Durante a fase acelerada os pacientes podem ou não responder ao tratamento, havendo uma remissão por meses ou anos ou uma evolução para a crise blástica (Figura 1).

Na crise blástica os clones leucêmicos perdem a capacidade de diferenciação (Figura 1), levando ao acúmulo de blastos na medula óssea e no sangue, sendo que os blastos podem corresponder a mais de 30% das células circulantes e o paciente é levado a óbito dentro de aproximadamente seis meses [4-7]. Embora a maioria dos pacientes desenvolva uma crise blástica mielóide, 25% dos casos apresentam blastos linfóides B ou T, indicando que o acometimento das células pela translocação ocorre em um nível da ontogenia das células-tronco hematopoiéticas antes do comprometimento com a diferenciação mielóide na medula óssea [8].

Raramente os pacientes em crise blástica alcançam remissão, e de maneira geral, recaem posteriormente, sendo o transplante de medula óssea a única intervenção comprovadamente efetiva para a LMC [9, 10]. Contudo, vale ressaltar que, em muitos casos, o transplante de medula óssea não atinge o sucesso esperado, fazendo com que o paciente desenvolva uma reação enxerto *versus* hospedeiro com graus bastante variáveis.

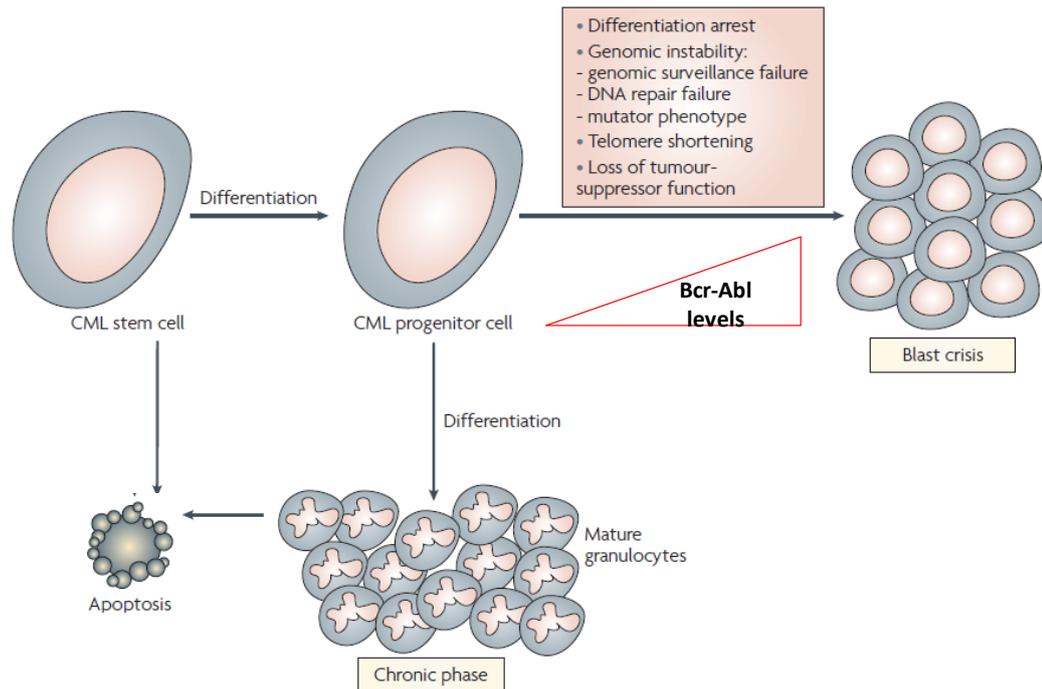


Figura 1: Ilustração da evolução da LMC a partir de um clone Bcr-Abl positivo. A LMC é uma doença mieloproliferativa clonal. Uma célula tronco hematopoiética sofre a translocação cromossômica t(9:22) e passa a expressar BCR-ABL (*CML stem cell*). Esta célula pode sofrer apoptose (por ação do ataque de células NK, por exemplo), ou se multiplicar, perpetuando o clone leucêmico na medula óssea. Durante a fase crônica, essas células-tronco Bcr-Abl-positivas irão se diferenciar e gerar as demais células mielóides do organismo. Nesta fase da doença, praticamente todos os granulócitos e monócitos circulantes possuem o oncogene. Leucocitose e neutrofilia são comuns nesta fase. Bcr-Abl promove a aquisição de anormalidades genéticas adicionais, marcando a transição para a fase acelerada da doença, havendo aumento dos níveis de expressão de Bcr-Abl nas células, perda da capacidade de diferenciação e acúmulo de células imaturas (blastos) na medula óssea. A instabilidade genômica é freqüente nesta fase, contribuindo para falhas no reparo do DNA e aquisição de mutações, encurtamento dos telômeros e perda de função dos supressores de tumores. Tais eventos provocam a evolução da LMC para a crise blástica, quando os clones imaturos ganham a medula e o sangue periférico, infiltram em outros órgãos, e se mostram absolutamente resistentes aos inibidores de tirosina quinase.

FONTE: Figura adaptada de Melo & Barnes, 2007.

1.2 Bcr-Abl: estrutura molecular e vias de sinalização:

Bcr-Abl é uma proteína citoplasmática que guarda as características estruturais das proteínas Bcr e c-Abl. A metade amino-terminal da porção c-Abl contém seguidamente domínios SH3 (*Src homology 3*), SH2 e o domínio com atividade tirosina quinase (SH1). Esses domínios podem assegurar uma estrutura auto-inibitória, na qual SH3 e SH2 participam da regulação da atividade quinase de SH1. No primeiro exon de c-Abl (na extremidade amino-terminal) há um grupo miristol, que se liga ao domínio de tirosina quinase, mantendo presos SH2 e SH3 [6]. Entretanto, Bcr-Abl não possui este grupo miristol, o qual é perdido na translocação cromossômica, e isso resulta em alta atividade quinase constitutiva, um fator chave no potencial oncogênico da proteína Bcr-Abl [11, 12]. Na região carboxi-terminal da porção Abl, a oncoproteína contém quatro sítios ricos em prolina para ligação para SH3, três sinais de localização nuclear, um sinal de exportação nuclear, um domínio de ligação no DNA e um domínio de ligação a actina [6]. Na porção Bcr, há um domínio com atividade serina e treonina quinase e domínios que se ligam à SH2, conferindo a Bcr-Abl participação em diversas vias de transdução de sinal [13]. Além desses, a molécula contém uma região helicoidal de oligomerização (*coiled-coil domain*), fundamental para a atividade transformante de Bcr-Abl, e sítios de interação para a proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento (GRB2) na tirosina 177 [6].

Depois que Bcr-Abl foi mapeado molecularmente, diversos estudos foram realizados no intuito de investigar quais domínios e regiões confeririam a esta proteína sua capacidade transformante e promotora de leucemia. Em trabalho realizado por Zhang e Ren em 1998, observou-se que camundongos que expressavam Bcr-Abl com uma mutação pontual no sítio de ligação do ATP em Abl (inativando assim sua atividade quinase), não desenvolveram leucemia [14]. Mais tarde, o grupo do Dr. Ren, investigando o domínio SH3 de Abl, verificaram que a expressão de Bcr-Abl truncada (sem SH3 e, conseqüentemente, com atividade tirosina quinase aumentada) foi incapaz de produzir um quadro de desordem proliferativa mielóide, tal como ocorre na LMC [15]. É relatado que a fosforilação da tirosina na posição 177 de Bcr da proteína quimérica permite a ligação com GRB2 e a formação de um complexo envolvendo SOS, GAB2 e GRB2, que adiciona um fosfato no domínio GDP-binding Domain (GDP) de Ras, ativando-o. Esta quinase ativada fosforila e ativa a via das MAPK (*mitogen activated protein kinases*), culminando na fosforilação de Bad e também na

ativação de fatores de transcrição para genes de sobrevivência [11, 16]. Foi observado que uma mutação neste ponto de auto-fosforilação em Bcr-Abl reduz a habilidade de causar desordem proliferativa mielóide [6].

Tem sido descrita a interação entre os vários domínios funcionais de Bcr-Abl e muitas proteínas envolvidas na sinalização celular, tais como o transdutor de sinal e ativador de transcrição-5 (STAT5), a subunidade p85 de fosfatidil-inositol-3 quinase (PI3K), ativadores de RAS GTPases, dentre outras [6].

Foi demonstrado que a fosforilação de STAT5B por Bcr-Abl ocasiona o aumento da expressão da molécula anti-apoptótica Bcl-XL [17, 18]. Entretanto foi demonstrado através do uso de oligonucleotídeos anti-senso para Bcl-XL que a atividade anti-apoptótica dessa molécula não é totalmente suprimida em células HL-60.Bcr-Abl, o que leva a hipótese da existência de outras vias envolvidas na resistência à apoptose conferida por Bcr-Abl [19].

Outra via de sinalização importante para a sobrevivência celular é a [via PI3K/Akt](#), a qual é ativada por Bcr-Abl através da fosforilação direta de PI3K [20]. Akt ativado por PI3K é capaz de fosforilar caspase-9 impedindo a formação do apoptossomo (estrutura formada por citocromo c, caspase 9, ATP e APAF-1, capaz de desencadear a apoptose pela ativação de caspase-3) [21]. A Akt participa na regulação da apoptose pela fosforilação de Bad, impedindo sua ação pró-apoptótica na mitocôndria, uma vez que esta molécula quando fosforilada é seqüestrada dessa organela pela chaperone 14-3-3 [22]. Akt atua também na ativação de IKK (I κ B kinase), o que culmina na degradação de I κ B e conseqüente translocação do NF κ B para o núcleo, resultando na transcrição de vários genes anti-apoptóticos [23].

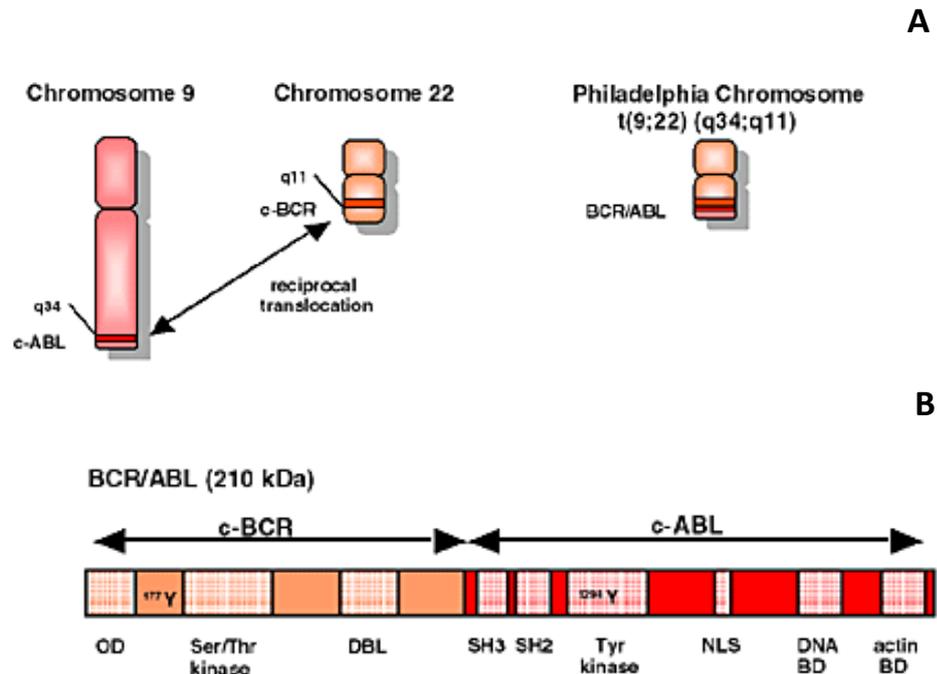


Figura 2: Origem e estrutura de Bcr-Abl. **A:** Ilustração da translocação t(9;22)(q34;q11), na qual o gene ABL se funde ao gene BCR, formando o novo gene BCR-ABL. O Cromossomo 22 torna-se encurtado após a translocação, sendo chamado de Filadelfia e sendo considerado marcador citogenético da LMC. **B:** Ilustração da estrutura molecular e domínios da proteína Bcr-Abl. A porção N-terminal corresponde ao BCR, na qual pode ser visualizada a tirosina 177, essencial para a auto-ativação da proteína, além do domínio Serina-Treonina quinase seguido do domínio DBL, cuja função ainda não é bem definida na oncoproteína. Na porção Abl encontram-se o domínio SH3 (que permite a ligação com domínios ricos em Prolina de outras proteínas), SH2 (que se liga a resíduos fosforilados de tirosina em outras proteínas), um domínio de ligação “L”. Após o domínio tirosina quinase há regiões ricas em prolina (não representadas) e uma região de sinalização nuclear (NLS), que definem sua importação e exportação do núcleo (essencial para o tráfego de c-Abl, mas após a translocação a sinalização para importação para o núcleo é perdida, fazendo com que Bcr-Abl seja uma proteína citoplasmática).

FONTE: Figura extraída do website medscape.com.

1.3 Regulação do Processo de Apoptose:

O processo de apoptose envolve uma complexa rede de sinalização celular que se inicia com um estímulo de morte e culmina com o empacotamento celular e remoção dos corpos apoptóticos. Todas as características morfológicas e bioquímicas da apoptose é dependente da ativação das caspases: uma família de zimógenos caracterizados por apresentarem um resíduo de cisteína em seu sítio ativo, o qual cliva substratos após um

resíduo de ácido aspártico [24]. No processo de apoptose, as caspases são divididas em iniciadoras (as primeiras a se ativarem) e executoras (as responsáveis por clivarem inúmeros substratos na célula e desencadear o processo de morte). Quando o processo é iniciado pelos receptores de morte presentes na membrana plasmática das células, chamamos de via extrínseca de indução de apoptose. A via extrínseca é ativada após a interação dos ligantes de morte, tais como *Tumor Necrosis Factor* (TNF)-alfa, Fas/CD95-Ligante (FasL/CD95L) e *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), com os seus receptores específicos, que são TNFR1, Fas e TRAIL-R1(DR4) e TRAIL-R2(DR5), respectivamente. Os receptores de morte são proteínas transmembrana que ancoram em sua porção intracitoplasmática moléculas adaptadoras, tais como FADD e TRADD. Estas, por sua vez, recrutam as caspases iniciadoras -8 e -10, formando um complexo protéico chamado DISC [25]. Uma vez ativadas, caspase-8 e caspase-10 clivam caspase-3, a principal caspase executora. Contudo, caspase-8 pode também clivar a proteína citoplasmática Bid, gerando tBid, que por sua vez é capaz de translocar para a mitocôndria e iniciar a via intrínseca de morte [26, 27] (Figura 3).

A via intrínseca pode ser ativada por Bid após ativação da extrínseca, ou é iniciada por uma gama de sinais intracelulares, chamados coletivamente de “sinais de estresse”, tais como dano ao DNA, desestruturação do citoesqueleto, perda de adesão celular, carência de fatores de crescimento, hipoxia, inibição de síntese protéica ou de ácidos nucléicos, estresse de retículo endoplasmático, entre outros. Todos induzem a liberação do citocromo c do espaço intermembranar da mitocôndria, levando a ativação do complexo protéico chamado apoptossomo, o qual é formado por caspase-9, APAF-1, ATP e citocromo c. Uma vez acionado, a caspase-9 torna-se ativada e cliva as caspases executoras -3, -6 e -7 [28].

A liberação do citocromo c corresponde ao gatilho da via intrínseca e depende da abertura de poros na membrana externa da mitocôndria. As proteínas da família Bcl-2 (*B cell Lymphoma-2*) regulam a permeabilidade desta membrana através da interação de membros pró- e anti-apoptóticos. Bax e Bak são dois membros pró-apoptóticos implicados na formação dos poros que permitem a liberação do citocromo c [29]. Estes poros se mantêm fechados devido à interação de membros anti-apoptóticos, tais como Bcl-2 e Bcl-XL, sendo este o cenário molecular de uma célula viva (Figura 4).

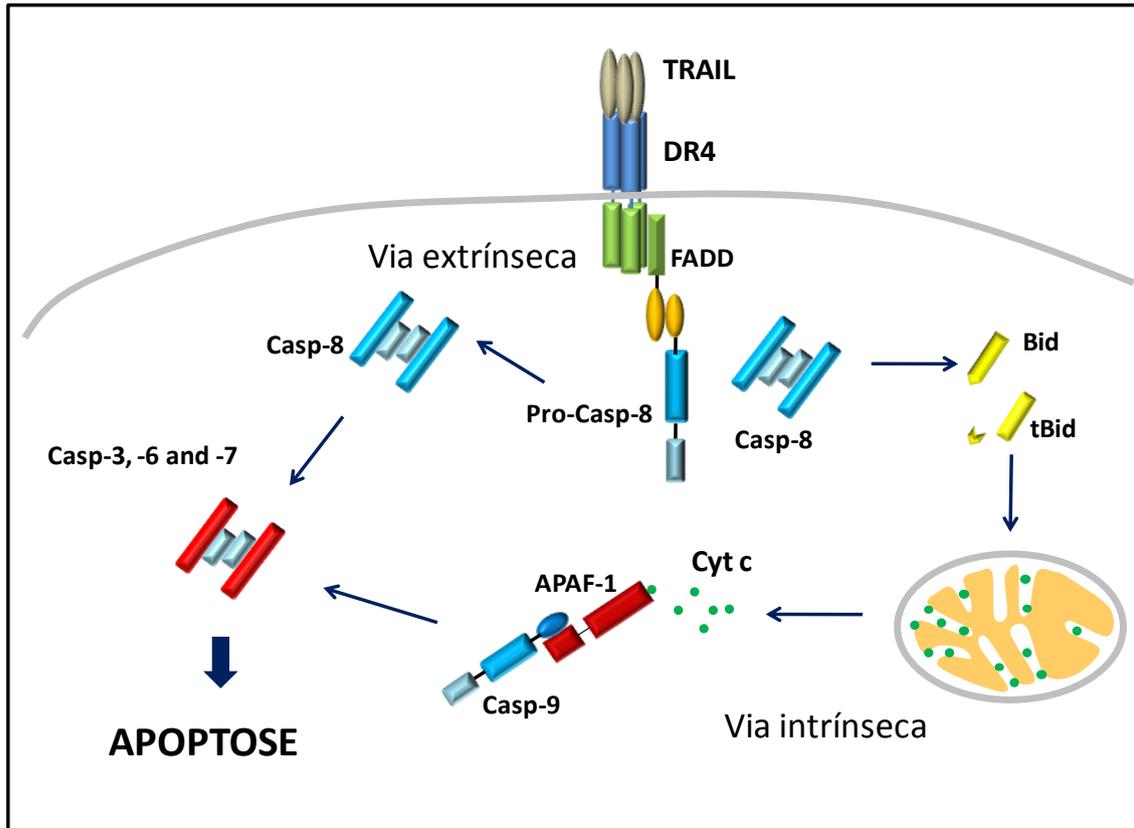


Figura 3: Via extrínseca de apoptose induzida por TRAIL. O ligante de morte TRAIL, na sua forma trimérica solúvel ou como proteína transmembrana, é capaz de se ligar aos receptores de morte DR4 ou DR5, iniciando a sinalização de apoptose pela via extrínseca. A molécula adaptadora FADD permite o recrutamento da caspase-8, que torna-se ativada. Os dímeros de caspase-8 são capazes de clivar Bid, gerando Bid truncado (tBid), que por sua vez transloca-se para a mitocôndria acionando a via intrínseca de morte. Esta resulta na liberação do citocromo c e ativação da caspase-9 via APAF-1 (Apoptossomo). Caspase-8 também cliva as caspases efetoras -3, -6 e -7, as quais tornam-se ativadas e podem agora clivar os vários substratos culminando no processo de apoptose.

FONTE: Figura extraída de Pereira & Amarante-Mendes, 2011.

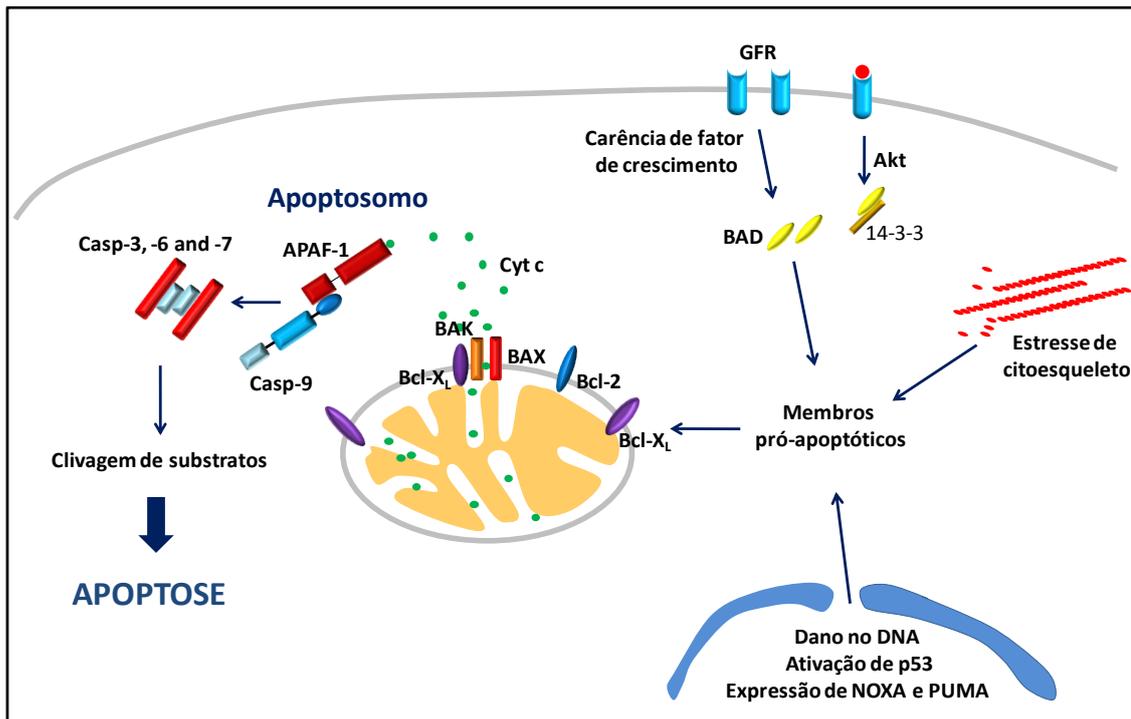


Figura 4: Via intrínseca de apoptose. A via intrínseca pode ser iniciada por diversos estímulos, tais como dano no DNA (que leva a ativação de p53 e a expressão de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, tais como NOXA e PUMA), estresse de citoesqueleto que também ativam membros pró-apoptóticos, ou carência de fatores de crescimento, que diminuem a ativação de Akt e permite a liberação da molécula Bad, antes sequestrada pela chaperona 14-3-3. Os membros pró-apoptóticos da família Bcl2 são capazes de translocar-se para a mitocôndria e se associar com as moléculas Bax e Bak (que formam os poros na membrana externa da organela), e com as moléculas anti-apoptóticas que estão mantendo esses poros fechados. Estas interações deslocam Bcl-XL e Bcl-2 e/ou ativam Bax e Bak promovendo a abertura dos poros e conseqüente liberação de citocromo c para o citosol. Ao se associar a APAF-1, o citocromo c permite a ativação do complexo protéico chamado apoptossomo, ativando a caspase-9 presente na estrutura. Esta cliva e ativa as caspases efetoras desencadeando o processo de apoptose. GFR: Growth Factor Receptor.

FONTE: Figura extraída de Pereira & Amarante-Mendes, 2011.

Dois modelos são propostos para explicar a abertura dos poros formados por Bax e Bak. O primeiro sugere que as moléculas anti-apoptóticas da família Bcl-2 estão constantemente se associando e inibindo Bax e Bak, até que membros pró-apoptóticos como Bid, NOXA e PUMA deslocam-nas liberando o poro. O segundo modelo propõe que há duas categorias de moléculas pró-apoptóticas e ambas são necessárias para desencadear a abertura dos poros da mitocôndria. Membros sensibilizadores inibiriam a ação das proteínas anti-apoptóticas, ao mesmo tempo que membros ativadores se ligariam diretamente a Bax e Bak, promovendo a liberação do citocromo c [30, 31].

1.4 Inibidores de tirosina quinase no tratamento da LMC:

Uma vez que a atividade tirosina quinase é essencial para a transformação celular induzida por Bcr-Abl, inibidores de tirosina quinase (ITK) foram desenvolvidos pelas indústrias farmacêuticas e correspondem hoje à principal alternativa no tratamento dos pacientes. O Mesilato de Imatinibe (Glivec® ou STI571) foi o primeiro ITK a ser desenvolvido e é hoje a principal opção de droga no tratamento da LMC. Ele atua competindo pelo sítio de ligação do ATP no domínio quinase de Bcr-Abl [32], impedindo que a oncoproteína fosforile seus substratos, promovendo a morte das células leucêmicas [33]. Um primeiro estudo de *follow up* de cinco anos demonstrou o sucesso do Imatinibe quando comparado com Interferon alfa, o tratamento antecessor [34]. Contudo, desde essa publicação ficou claro que um número razoável de pacientes não respondiam bem à droga. Recentemente, resultados de oito anos de acompanhamento de pacientes tratados com Imatinibe demonstraram que 83% dos pacientes atingem uma remissão citogenética completa (RCC). Contudo, 15% desses pacientes tiveram recaídas e 5% mostraram-se intolerantes à droga. Os outros 17% não alcançaram remissão em nenhum momento [35]. Os números acima confirmaram que cerca de 37% dos pacientes não obtém sucesso no tratamento com Imatinibe, e este fato tem levado os pesquisadores a esclarecerem as razões deste insucesso que acomete um grande número de pacientes.

Gorre e colaboradores, em 2001, associaram esta resistência clínica à ocorrência de mutações no domínio quinase de Abl, que impediriam a ligação do Imatinibe ao seu alvo [36]. Em outros casos, a recidiva estava ligada a uma amplificação progressiva do número de transcritos de *BCR-ABL* [37]. Outro mecanismo molecular de resistência ao Imatinibe é o padrão de expressão dos receptores responsáveis pela captação e exportação da droga nas células. Recentemente, Eechoute e colaboradores compilaram dados mostrando que OCT1 (*organic cation transporter 1*) e OATP1A2 (*organic anion transporting polypeptide 1A2*), os quais são responsáveis pelo transporte de Imatinibe para dentro das células, e ABCB1 e ABCG2 (*ATP-binding cassette transporters*), que exportam a droga, podem ser diferencialmente regulados por Bcr-Abl e interferem com a eficácia do tratamento [38].

Apesar de existirem diferentes causas moleculares de resistência ao Imatinibe, as mutações no gene *BCR-ABL* são consideradas as principais e mais freqüentes. Diante desta realidade, ITK de segunda geração foram desenvolvidos, sendo capazes de se ligar e inibir

Bcr-Abl, mesmo este apresentando variadas mutações. Nilotinibe e Dasatinibe, entretanto, ainda são incapazes de bloquear a atividade tirosina quinase de Bcr-Abl que apresenta a mutação T315I, que é a mais freqüentes nos pacientes.

O *European Leukemia Net* e o *National Comprehensive Câncer Network* recomendam o tratamento inicial de pacientes em fase crônica com 400mg/dia de Imatinibe. Aqueles indivíduos que não alcançarem uma remissão hematológica completa em 3 meses, qualquer resposta citogenética em 6 meses, ou uma resposta citogenética completa em 18 meses são considerados resistentes e devem iniciar tratamento com inibidores de segunda geração [3]. Atualmente há protocolos com aumentadas doses de Imatinibe no intuito de elevar sua eficácia antes da administração de Dasatinibe ou Nilotinibe. Apesar de doses de 600 e 800mg/dia, defato, produzirem melhores resultados hematológicos, a aderência ao tratamento cai drasticamente, quando comparada com os pacientes que mantiveram a dose de 400mg/dia [39].

Um retrato recente dos pacientes LMC, no que tange a resposta aos tratamentos disponíveis, revela que cerca de 25% dos indivíduos em fase crônica inicial não respondem ao Imatinibe ou apresentam resposta sub-ótima [3]. Nessa porcentagem estão incluídos os 5% de indivíduos que são intolerantes à droga e os 15% que atingem remissão citogenética e recaem posteriormente [40]. Radich revela ainda que 50% dos pacientes que são tratados com inibidores de segunda geração não alcançam remissão da doença, o que significa 12,5% do total de pacientes LMC.

Apesar da grande contribuição que os ITK trouxeram para a terapêutica da LMC no início do século XXI, diminuindo a taxa de mortalidade por esta doença em aproximadamente 60% [3], um número grande de pacientes se mostra carente de novas estratégias de tratamento, e o estudo de novos alvos moleculares, novas vias de sinalização, novas drogas, são essenciais para suprir tal necessidade.

1.5 WASP: estrutura e funções:

No contexto de organização do citoesqueleto, foi descrito o gene *Wiskott Aldrich Syndrome Protein* (WASP), o qual é expresso exclusivamente em células hematopoéticas, independente de seu estágio de diferenciação [41]. Localizado no cromossomo X humano, o gene *WASP* codifica uma proteína com mesmo nome de 65 kDa e 502 aminoácidos [42].

Em sua porção amino-terminal, WASP possui um domínio WH1/EVH1 (*WASP homology 1/Ena Vasp Homology 1*) e uma região básica de aminoácidos imediatamente seguida por um domínio central chamado CRIB/GBD (*Cdc 42 and Rac interactive binding/ GTP-bound domain*). Na porção carboxi-terminal há uma região rica em prolinas seguida de uma região com os domínios chamados VCA (*verpoline cofilin homology domains/acidic region*).

WASP possui uma conformação auto-inibitória promovida pela dobra de seu domínio VCA sobre o domínio GDB. Essa conformação pode ser estabilizada pela ligação de uma chaperona chamada WIP (*WASP interact protein*) ao domínio WH1. Essa ligação inibe WASP e o protege da degradação pelo proteassomo. Entretanto, essa conformação inibitória de WASP é desfeita quando algumas moléculas se ligam a ele e o ativam. A molécula Toca-1 desloca WIP do domínio WH1, ou por se ligar diretamente ao WIP ou por se ligar a WASP e induzir uma mudança conformacional em WH1. A região básica de WASP serve como sítio de ligação de PIP2 (Fosfatidil inositol (4,5) difosfato) e essa interação age sinergicamente com a ligação de CDC42 contendo GTP no domínio GBD. Essas interações em conjunto ativam WASP, permitindo que seu domínio VCA esteja disponível para a associação das proteínas Arp2/3, e essas por sua vez polimerizam os monômeros de actina formando filamentos que se estendem desde a face citoplasmática da membrana, ancorando os receptores na superfície da célula. A fosforilação na tirosina 291 de WASP também induz sua conformação ativa, embora ainda não se saiba se é suficiente para tal (Figura 5) [43].

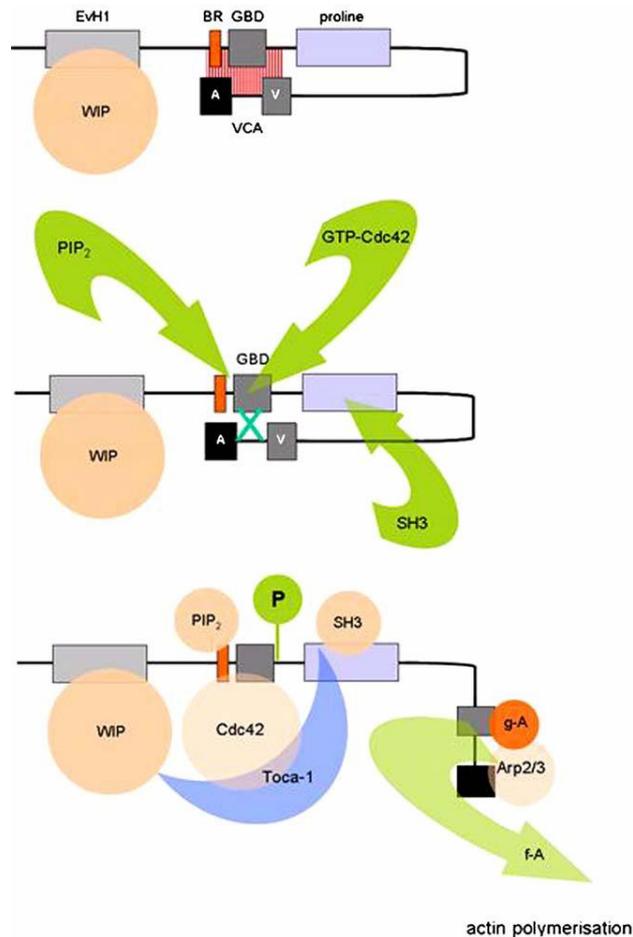


Figura 5: Domínios, interações moleculares e ativação de WASP. WH1/EVH1 (*WASP homology 1/Ena Vasp Homology 1*); CRIB/GBD (*Cdc 42 and Rac interactive binding/ GTP-bound domain*; *Proline-rich*: região rica em prolina; VCA (*verpoline cofilin homology domains/acidic region*).

FONTE: Figura extraída de Ochs e Trascher, 2006.

WASP é um elemento central na organização do citoesqueleto, orientando o recrutamento e a localização de proteínas estruturais e quinases durante a formação dos podossomos [44-46]. Os podossomos são pontos de adesão focal presentes na superfície de contato da célula constituídos por um conjunto de proteínas que interagem entre si, se ativam e se degradam, fazendo dos podossomos uma estrutura extremamente dinâmica e fundamental para a migração celular [44]. O podossomo é ainda essencial para a migração de células pelo interstício tecidual por ser responsável pela liberação de metaloproteases MMP-9 e MT1-MMP, responsáveis pela degradação da matriz extracelular [47].

Mutações que determinam a ausência de expressão ou o mau funcionamento de WASP causam a Síndrome de Wiskott Aldrich (WAS), uma imunodeficiência caracterizada clinicamente por trombocitopenia, eczema e infecções recorrentes [43].

Os pacientes WAS apresentam várias complicações em suas células hematopoiéticas, como problemas na fagocitose por macrófagos [48], dificuldade das células NK em matar suas células-alvo [49] e deficiência na geração de células T reguladores [50].

Muito pouco se sabe sobre a regulação da expressão de WASP. O grupo de Hagemann apresentou seu promotor com seus elementos responsivos [51, 52]. Nesse trabalho, o fator de transcrição C-EBP/A se mostrou essencial para transcrição de WASP na linhagem de LMC K562. No contexto da leucemia, foi demonstrado que Bcr-Abl suprime C-EBP/A pela ação da ribonucleoproteína hnRNP E2 [53]. Mais recentemente, Chang e colaboradores esclareceram que Bcr-Abl ativa a via MEK1/ERK1 e ERK2, que fosforila e ativa hnRNP E2, e essa por sua vez bloqueia a tradução do fator de transcrição [54].

A regulação pós-traducional de WASP ainda foi pouco explorada. Ao estudar a dinâmica dos podossomos durante a migração de células dendríticas, [55] observaram que WASP é clivado por calpaínas durante esse processo, havendo um rápido *turn over* de WASP. Ramesh *et al.* demonstraram que WASP trabalha em conjunto com outra molécula, *WASP Interact Protein* (WIP) [56]. Hoje sabemos que WIP é uma chaperona de WASP que o preserva da degradação pelo proteassomo ou por calpaínas [57, 58].

Somado ao seu importante papel no citoesqueleto, alguns trabalhos demonstram que WASP atua na sinalização intracelular, regulando negativamente algumas tirosina-quinases, tais como Nck, Lck e Fyn [59-61]. De maneira especial, o grupo do Dr. Sefton descreveu que a região entre os aminoácidos 83 a 93 de WASP é capaz de se ligar ao domínio SH1 de c-Abl, inibindo profundamente sua atividade tirosina-quinase [62].

A sua expressão desde os primeiros precursores hematopoiéticos na medula óssea [41] sugere que WASP desempenha um papel no desenvolvimento e a perfeita função das células hematopoiéticas, podendo atuar tanto organizando a dinâmica do citoesqueleto dessas células quanto participando da regulação de proteínas tirosina-quinases. Na Leucemia Mielóide Crônica são observadas graves alterações nesses fenômenos, mas os mecanismos pelos quais Bcr-Abl as promove não são totalmente conhecidos, bem como qualquer relato se WASP teria alguma participação nesse contexto.

Diante disso, uma primeira hipótese norteou a elaboração deste projeto: algum tipo de defeito na expressão ou função de WASP poderia estar relacionado com as alterações no compartimento hematopoiético características da LMC. Além disso, nós também levantamos a hipótese de que WASP poderia ser capaz de se ligar a Bcr-Abl, assim como foi descrito para c-Abl, o que, se comprovado, teria uma implicância extraordinária nos paradigmas de tratamento por inibição do Bcr-Abl. Amparado por estas idéias, nós iniciamos o presente estudo traçando o objetivo a seguir.

2 OBJETIVO

O objetivo geral do trabalho foi investigar se WASP, uma molécula sabidamente importante para as funções das células hematopoiéticas, exerce algum papel na Leucemia Mielóide Crônica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes:

As amostras dos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica nas diferentes fases da doença foram coletadas no Centro Oncológico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), e no Hospital Brigadeiro, todos localizados na cidade de São Paulo, Brasil. A seleção dos indivíduos controle, por outro lado, ocorreu no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

A inclusão dos pacientes com LMC, no presente estudo, obedeceu aos seguintes critérios: resultado positivo para cromossomo Philadelphia por citogenética e/ou presença do oncogene *BCR-ABL* detectado por biologia molecular em exames de diagnóstico feitos pelos laboratórios dos hospitais aos quais os pacientes foram admitidos. Os pacientes e os indivíduos saudáveis que possuíam quaisquer outras doenças de base no momento da coleta que não fosse a LMC, no caso dos pacientes, foram excluídos deste estudo.

As 52 amostras incluem 11 pacientes na fase crônica, 10 na fase acelerada, 11 pacientes na fase blástica e 10 em remissão da doença. Estes pacientes obtiveram resposta citogenética completa após tratamento com Mesilato de Imatinibe. Como indivíduos controle, utilizamos amostras de 10 doadores saudáveis.

3.2 Linhagens Celulares:

Neste trabalho foram utilizadas linhagens celulares derivadas de pacientes com LMC, Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), entre outras listadas abaixo. Além disso, algumas linhagens BCR-ABL negativas foram infectadas com plasmídeo retroviral contendo esse gene e passando, portanto, a expressar o BCR-ABL selvagem ou mutado, de acordo com a construção de BCR-ABL utilizada.

Relação das linhagens celulares empregadas no desenvolvimento do presente estudo:

- HL-60.vetor e HL-60.BCR-ABL (HL-60.BA): linhagem obtida a partir da HL-60 transduzida com retrovírus contendo os plasmídeos pSR α MSVtkneo e pSR α MSVtkneo.BCR-ABL;
- Jurkat: linhagem derivada de linfócitos T de paciente com LLA, BCR-ABL negativa (ATCC n° TIB-152);
- Jurkat.vetor, Jurkat.BCR-ABL (Jurkat.BA), Jurkat.BA.KR: linhagem obtida em nosso laboratório, a partir de células Jurkat transduzidas com retrovírus contendo respectivamente os plasmídeos pSR α MSV.tkneo, pSR α MSVp185BCR-ABLtkneo e pSR α MSVp185BCR-ABL/K671Rtkneo.
- K562: Isolada de efusão pleural de uma paciente com 53 anos em fase terminal da crise blástica. Linhagem de origem hematopoiética, multipotente que se diferencia espontaneamente em precursores das séries eritrocítica, granulocítica e monocítica; (ATCC n° CCL-243).
- K562.WASP, K562.WIP e K562.WASP.WIP: linhagem produzida em colaboração com a Dra. Yolanda Calle e Dr. Gareth Jones (King's College London), utilizando seu vetor lentiviral cuja referência é mencionada em nossa introdução. As células foram purificadas no Brasil por *cell sorting* utilizando citômetro de fluxo BD[®] ARIA.
- KCL22: linhagem derivada de paciente com LMC, na crise blástica, BCR-ABL positiva, gentilmente cedida pelo Dr. Owen Witte (University of California, Los Angeles, USA).
- LAMA-84: linhagem derivada de paciente com LMC, BCR-ABL positiva, gentilmente cedido pelo Dr. James Griffin (Dana-Farber Cancer Institute, MA, USA);
- BV173: linhagem derivada de paciente LMC em crise blástica, do sexo masculino, BCR-ABL positiva, doada gentilmente pelo Dr. Douglas Green (St. Jude's Hospital, Memphis, USA).

3.3 Animais:

Neste trabalho foram utilizados camundongos BALB/c nude machos, singênicos, com idade entre 4-8 semanas provenientes do Biotério de Criação do Instituto de Ciências Biomédicas. Os animais foram mantidos de acordo com os Princípios Éticos em

Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.4 Cultivo de células:

As células que proliferam em suspensão (todas, exceto a Phoenix™ Ampho) foram mantidas em meio RPMI-1640 completo (Life Technologies, INC., USA). Já as células aderentes foram cultivadas em meio DMEM completo (Dulbecco's Modified Eagle's Médium", Life Technologies, INC., USA). Nos dois casos, o meio foi suplementado com 2,0 g/L de bicarbonato de sódio, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 U/ mL penicilina, 100 µg/mL sulfato de estreptomicina (Life Technologies, Inc., USA) e 10% de soro fetal bovino (Life Technologies, Inc., USA). As células foram mantidas em incubadoras umidificadas na temperatura de 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂ (Forma Scientific).

3.5 Coleta e isolamento de células mononucleares de sangue periférico:

Vinte mililitros do sangue periférico de todos os sujeitos de pesquisa foram coletados em tubos contendo o anticoagulante EDTA. As amostras de sangue dos sujeitos de pesquisa foram centrifugados a 500 x g por 15 min a 4 °C e posteriormente, o plasma foi transferido para outro tubo. O plasma foi armazenado a -80 °C, para posterior análise. As células mononucleares do sangue foram separadas pelo protocolo padrão de densidade por gradiente de Ficoll-Hypaque 1,077 (BOYUM, 1976). A viabilidade celular foi avaliada por exclusão de Azul de Tripán. De acordo com o número de células obtidas, uma parte das células foi estocada em Trizol e tampão de amostra de "Western Blot".

3.6 Extração de RNA:

A extração do RNA total das linhagens celulares e células de pacientes foi realizada pelo método do Trizol, de acordo com protocolo do fabricante (Invitrogen Life Technologies). Resumidamente, 5x10⁶ células foram lisadas com 0,5 mL de Trizol e

incubadas por 5 min a temperatura ambiente (TA), em seguida, foi adicionado 0,1 mL de clorofórmio e os microtubos foram agitados vigorosamente por 15 s, e incubados por 2-5 min. Após a separação da fase aquosa por centrifugação a 12000 x g a 4° C por 15 min, o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com 0,25 mL de isopropanol, por 10 min a TA, e centrifugação a 12000 x g a 4 °C, por 10 min. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o RNA lavado com 0,5 mL de etanol 75%, centrifugado a 7500 x g a 4 °C, por 5 min. Por último, após remoção do sobrenadante, o RNA obtido foi ressuspense em 20-30 µL de água livre de RNases para ser utilizado na quantificação e síntese de cDNA.

3.7 Síntese de cDNA:

Três microgramas (3 µg) de RNA total foram utilizadas para obtenção do cDNA, utilizando-se kit de transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) de acordo com protocolo do fabricante. Para verificação da qualidade do cDNA sintetizado, foi feita a reação de RTPCR para β -ACTINA.

3.8 PCR em tempo real:

Para avaliar a expressão dos genes estudados neste projeto, oligonucleotídeos (*primers*) específicos foram desenhados para amplificar estes genes nas amostras por meio da técnica de PCR em tempo real. A amplificação em tempo real foi realizada utilizando-se o Kit comercial *Master Mix Syber Green* (Life Technologies) e o termociclador MxPro 3005P (Stratagene). Como controle endógeno foi amplificado o gene GAPDH, cuja expressão é constitutiva ("*housekeeping gene*"). Os *primers* utilizados foram: WASP F: GGCTGGTCGG CTGCTCTGGGAACA; R: GGTGGTGGGGTAGCTGGCGTCTGT; GAPDH F: GGAGAAGGCTGG GGCTCAT; R: GTCCTTCCACGATACCAAAGTT; BAD F: CCGAGTGAGCAGGAAGACTC; R: GG TAG GAGCTGTGGCGACT; BAK F: TTTCCGCAGCTACGTTTTT; R: TGGTGGCAATCTTGGTGAAGT; BID F: GCTTCCAGTGTAGACGGAGC; R: GTGCAGATTCATGTGTGGATG; BIK F: TCTGCAATTGTCA CCGGTTA; R: TTGAGCACACCTGCTCCTC; NOXA F: AGCTGGAAGTCGAGTGTGCT; R: ACGTGCAC CTCCTGAGAAAA; BLC-XL F: CTGAATCGGAGATGGAGACC; R: TGGGATGTCAGGTCACTGAA; MCL-1 F: AGAAAGCTGCATCGAACCAT; R: CCAGCTCCTACTCCAGCAAC; FAS F: CAAGGG

ATTGGAATTGAGGA; R: TGGAAGAAAAATGGGCTTTG; C-FLIP F: GCCGAGGCAAGATAAGCA; R: GCCCAGGGAAGTGAAGGT; TRAIL F: AAGGCTCTGGGCCGCAAATAAAC; R: GCCAACTAAAAAG GCCCGAAAAA.

3.9 SDS PAGE e *Western Blot*:

Amostras contendo 1×10^6 células foram centrifugadas a $210 \times g$ por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 80 μL de tampão de amostra (Tris Cl 50mM, pH 6,8; SDS 2%; Glicerol 10%; β -mercaptoetanol 2,5%) para serem aquecidas a 100°C por 5 minutos e resfriadas rapidamente, sendo mantidas no gelo até o momento da aplicação ou estocadas a -20°C para posterior utilização. Foram preparados géis com diferentes concentrações (15-10%) de acordo com o peso molecular da proteína analisada e foram aplicados 10-20 μg de amostra em cada poço do gel. As proteínas foram separadas utilizando uma voltagem contínua de 100 V. Ao término da corrida das amostras, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de PVDF de 0,45 μm (Pierce) em amperagem contínua de 0,45 mA de por 1 hora e 30 minutos. Em seguida a membrana foi colocada em uma solução de bloqueio TBS-Tween (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH=7,5, 0,05% Tween-20, 5% de leite desnatado, 0,01% azida sódica) por duas horas. Após esse período, as membranas foram marcadas com os anticorpos primários específicos (diluídos em leite desnatado 5%) por uma hora, lavadas com TBSTween para em seguida serem marcadas com o anticorpo secundário acoplado à peroxidase. Novamente a lavagem das membranas foi realizada e após esse período, o excesso de TBSTween foi retirado e as membranas incubadas em solução de ECL (Amersham Pharmacia Biotech) para que o sinal de quimioluminescência fosse detectado pela exposição rápida de filmes auto-radiográficos X-OMAT-LS (Kodak, co).

3.10 Avaliação do número absoluto de células em cultura celular:

Quatro vezes 10^4 células K562.WT, K562 re-expressando WASP (*high*), K562 expressando WIP ou K562 expressando ambos genes foram cultivadas em placas de 6 *wells* com 1mL de RPMI suplementado, sendo que a cada 24 horas as células eram homogeneizadas e na cultura era adicionado 0,5mL de meio fresco suplementado, para

evitar estresse por *starvation* das células. O número absoluto de células foi contado em câmara de Neubauer a cada 24 horas até completar 120 horas de experimento.

3.11 Avaliação da frequência de populações celulares em co-cultura:

Co-cultura contendo inicialmente 2×10^5 células foi estabelecida utilizando as linhagens K562.WT (eGFP negativa) e K562.WASP (eGFP positiva), em três diferentes condições: 25%:75%; 50%:50%; 75%:25%, respectivamente. As células eram homogeneizadas e repicadas a cada 24 horas, recebendo meio fresco. Após 7 dias de co-cultura, a frequência de cada população foi avaliada por citometria de fluxo.

3.12 Avaliação da proliferação celular:

As células K562.WT e K562.WASP foram marcadas *Violet Cell Trace* (Life technologies) e cultivadas por 4 dias, sendo a taxa proliferativa acompanhada por citometria de fluxo através do decaimento da fluorescência inicial devido às divisões celulares. Células K562.WT no dia zero, logo após incubação, foram analisadas no citômetro para determinação da fluorescência inicial do experimento cujo decaimento.

3.13 Tratamento das linhagens celulares com Mesilato de Imatinibe:

Linhagens celulares foram tratadas com mesilato de imatinibe na concentração de 0,1 a 10 μM por 24 e 48 horas e amostras de cDNA e proteínas foram preparadas a partir deste material para verificação da expressão de genes. Em alguns experimentos, as células foram marcadas logo após o tratamento para quantificação de morte celular por citometria de fluxo.

3.14 Tratamento das células com indutores de morte:

Uma vez 10^5 células K562.egfp e K562.WASP.egfp foram cultivadas em placas de 96 wells com 200 μL RPMI suplementado. Foram utilizados os seguintes indutores de morte:

Camptotecina (100 μ M), Actinomicina D (5 μ M) e radiação Ultra Violeta (400mJ/cm²). Após 18 horas, a morte celular foi avaliada pelo conteúdo de DNA.

3.15 Bloqueio da via de TRAIL:

K562.WT, K562.WASP low e K562.WASP high foram cultivadas em placas de 96 *wells* na presença ou não de 5 μ g/mL de TRAIL R2-Fc (dominante negativo de TRAIL, que se liga a DR4 e DR5 e bloqueia a via extrínseca de morte). O reagente foi doado gentilmente pelo Dr. Henning Walkzak, do Imperial College London, UK. A morte celular foi avaliada após 48 horas por incorporação de iodeto de propídio.

3.16 Infecção de linhagens de células humanas com partículas virais contendo DNA recombinantes do gene WASP:

Sobrenadantes virais foram produzidos pelo grupo da Dra. Yolanda Calle do King's College London, contendo lentivírus carregando o gene WASP fundido à proteína fluorescente verde eGFP (WASP.egfp), ou carregando WIP.mCherry. Duas vezes 10⁵ células alvo HL60.BA e K562 foram plaqueadas juntamente com 10 μ l de Polibrene (800 μ g/ml), e receberam 100 μ L do concentrado viral. Após 72 horas as células foram levadas ao citômetro de fluxo para confirmação da infecção pela expressão de *egfp* e *mCherry*. A eficiência foi sempre superior a 70% de infecção.

3.17 Inoculação subcutânea de camundongos:

As células K562 selvagem e K562.WASP mantidas em cultura, foram centrifugadas a 240 x g, por 5 min, a 4 °C e ressuspensas em PBS 1X gelado. Este procedimento foi repetido duas vezes e na última vez, as células foram ressuspensas na concentração de 1x10⁷ células/100 μ L de PBS 1X. Foram inoculadas dez milhões de células subcutaneamente na região dorsal dos flancos esquerdo e direito, respectivamente, de camundongos BALB/c *nude* anestesiados por injeção intraperitoneal de 100 μ L de solução anestésica (composta de 100 μ L de Xilasina a 10mg/mL, e 200 μ L de Cetamina a 50mg/mL, q.s.p 2mL de PBS).

3.18 Determinação da apoptose por fragmentação de DNA:

Amostras contendo $1-4 \times 10^5$ células foram centrifugadas a 210g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensas em uma solução hipotônica, contendo 0,1% de citrato de sódio, 0,1% de triton X-100 e 50µg/mL de iodeto de propídeo (PI). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 4°C para promover a fragilização da membrana celular pelo Triton X-100 e lise celular pelo choque hipotônico da solução. Após a lise, o material nuclear fica acessível ao iodeto de propídeo (PI), que se intercala no DNA genômico e produz uma fluorescência capaz de ser analisada no citômetro de fluxo (FACScalibur-Becton Dickinson). A análise é realizada em 5000 eventos, o resultado é dado pelo histograma do software CellQuest (Becton Dickinson). O histograma indica a ploidia nuclear em função da fluorescência. As células apresentam um pico maior correspondente à fase G0-G1 (2n) do ciclo celular e um menor, G2-M (4n), intercalados pela fase S. A população que se encontra à esquerda do pico G0-G1, por possuírem uma quantidade de DNA inferior a 2n (hipodiplóide), corresponde às células em apoptose.

3.19 Análise da metilação de DNA por tratamento com Bissulfito Sódico:

Essa abordagem consiste na modificação do DNA genômico das amostras através do tratamento com bissulfito de sódio. Através desta técnica, todas as citosinas não-metiladas do DNA são modificadas e convertidas a uracilas, as quais são substituídas por timinas durante a síntese de uma nova fita de DNA. As citosinas metiladas, entretanto, são mantidas intactas. Dessa forma, a seqüência do DNA tratado será alterada dependendo de sua condição original metilada ou não-metilada. Em seguida esse fragmento será seqüenciado para se determinar os locais de metilação.

3.20 Análise estatística dos dados:

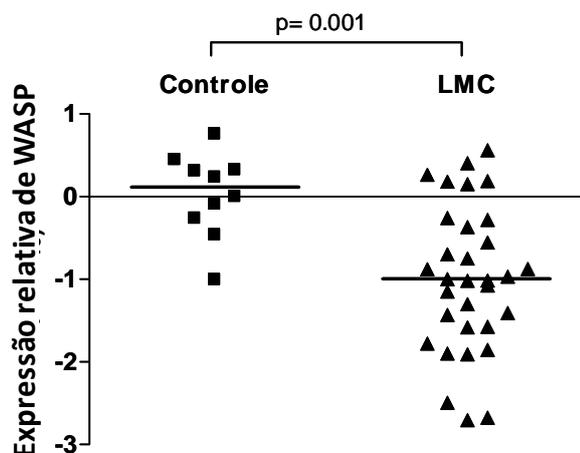
O software *GraphPad Prism 5* foi utilizado para construção dos gráficos e análise estatística através dos testes *T student*, *One Way ANOVA*, *Two Way ANOVA* e pós teste de *Bonferroni*, como indicado em cada figura do manuscrito.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da expressão e regulação de WASP:

O estudo do papel do gene WASP dentro do contexto da LMC requeria, inicialmente, investigar se o mesmo estava ou não expresso em pacientes. Assim, nós comparamos a expressão de WASP em amostras de pacientes LMC com doadores saudáveis. A expressão de WASP foi menor nos pacientes LMC comparando com indivíduos normais ($p=0.001$) (Figura 6A). Buscando uma mais clara interpretação e análise desses dados, nós avaliamos a expressão de WASP nas diferentes fases da LMC, incluindo agora aqueles pacientes que foram tratados com mesilato de imatinibe e alcançaram uma remissão citogenética completa. Como podemos observar na figura 6B, indivíduos na fase crônica ou inicial da doença apresentam níveis normais de WASP, similares aos de indivíduos saudáveis. No entanto, a progressão da doença para fases acelerada e blástica é acompanhada por uma redução dos níveis de RNAm para WASP. De maneira interessante, o grupo de pacientes tratados com mesilato de imatinibe que alcançou uma remissão citogenética completa tem seus níveis de WASP restaurados (Figura 6B).

A



B

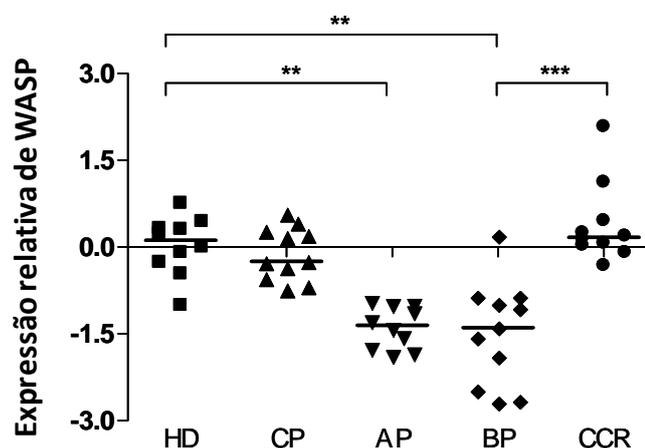


Figura 6: A expressão de WASP é suprimida em pacientes LMC desde a fase acelerada da doença.

A: Os níveis de expressão de WASP são reduzidos em pacientes LMC quando comparados com indivíduos saudáveis. A expressão relativa de WASP foi determinada por qPCR usando GAPDH como *housekeeping gene* (** $p < 0.01$, comparado com HD). “*t*” student foi usado como teste estatístico. **B:** A supressão de WASP foi observada nas fases avançadas da doença (Fase Acelerada (AP) e Crise Blástica (BP)). (** $p < 0.01$, comparado com HD). Pacientes em Remissão Citogenética Completa (CCR) apresentaram níveis normais de WASP (### $p < 0.0001$, comparado com BP). ANOVA e pós-teste de Bonferroni foram usados para análise estatística.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

Nossos dados nos mostram que a supressão de WASP parece ocorrer com a progressão da doença para fases avançadas. A progressão da LMC é sabidamente acompanhada (ou causada, isso não está absolutamente estabelecido na literatura) pelo aumento dos níveis de Bcr-Abl nas células leucêmicas. No intuito de investigar se a oncoproteína é, de alguma forma,

responsável pela supressão de WASP, nós correlacionamos os níveis de expressão dos dois genes em cada amostra de pacientes, o que nos demonstrou que há uma correlação negativa, na qual os pacientes com mais elevados níveis de Bcr-Abl apresentaram menores níveis de WASP (Figura 7). Essa correlação negativa corrobora os dados anteriores, pois sugere não apenas que a presença de Bcr-Abl está promovendo o silenciamento de WASP, mas esse silenciamento é influenciado pelo grau de expressão de Bcr-Abl.

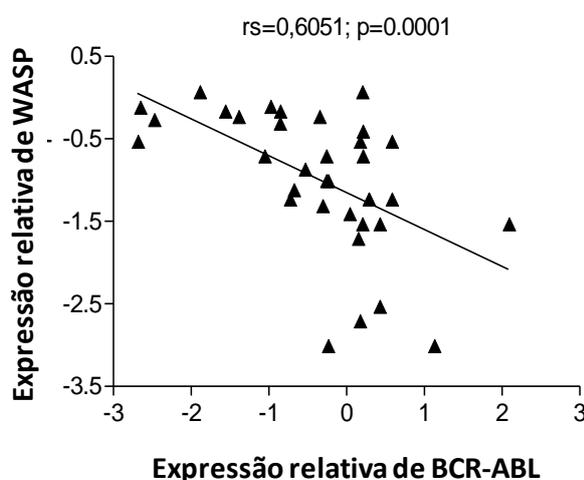


Figura 7: A expressão de WASP correlaciona negativamente com a de Bcr-Abl em pacientes LMC.

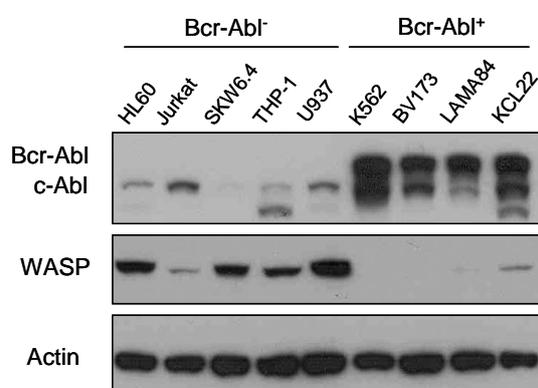
Os valores de expressão relativa de WASP e BCR-ABL produzidos por qPCR estão representados em escala de LOG_{10} para uma melhor dispersão dos dados e foram correlacionados. Teste de *Spearman* foi utilizado com regressão linear.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

Em uma abordagem diferente, nós determinamos a expressão de WASP em diferentes linhagens celulares derivadas de pacientes com leucemias Bcr-Abl positivas, comparando com linhagens derivadas de pacientes com leucemias Bcr-Abl negativas. Em células derivadas de pacientes LMC (portanto, Bcr-Abl-positivas) a expressão de WASP mostrou-se discreta ou indetectável, ao passo que linhagens leucêmicas Bcr-Abl-negativas apresentaram níveis detectáveis ou exuberantes dessa proteína (Figura 8). Assim como observado em amostras de pacientes, essa supressão de WASP é variável, e ocorre desde os níveis transcricionais em K562, LAMA e KCL22, como podemos observar na figura 8B quando comparamos com amostra de um indivíduo doador saudável (o qual corresponde à mediana do grupo controle de pacientes de nosso estudo).

Para confirmarmos se a supressão de WASP era promovida, de fato, por ação de Bcr-Abl, nós utilizamos dois pares de linhagens celulares estabelecidas em nosso laboratório. HL60 e Jurkat foram infectadas com vetores retrovirais para indução da expressão de Bcr-Abl, obtendo HL60.BA e Jurkat.BA. Como podemos observar na figura 9, a transcrição de WASP foi profundamente suprimida e sua expressão protéica totalmente silenciada nas duas linhagens positivas para Bcr-Abl. Esses dados concretizam o primeiro achado de nosso projeto: Bcr-Abl provoca diminuição da expressão de WASP, tanto em nível de RNA quanto protéico.

A



B

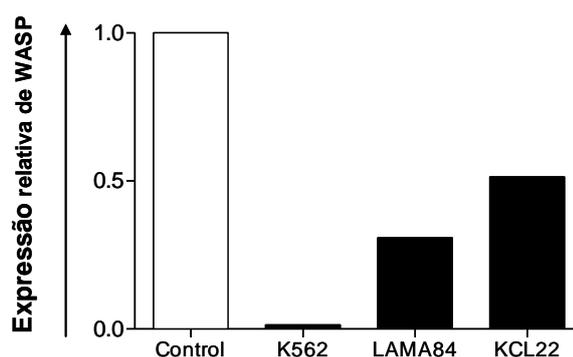


Figura 8: Linhagens celulares derivadas de LMC apresentam níveis diminuídos de expressão de WASP. A: *Western blot* mostrando a expressão de WASP em linhagens celulares leucêmicas negativas e positivas para Bcr-Abl. Actina foi utilizada como controle de *loading*. **B:** A expressão relativa de WASP em linhagens celulares derivadas de pacientes em crise blástica de LMC foi comparada com a de um indivíduo saudável correspondente à mediana de nosso grupo controle. qPCR foi utilizado.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

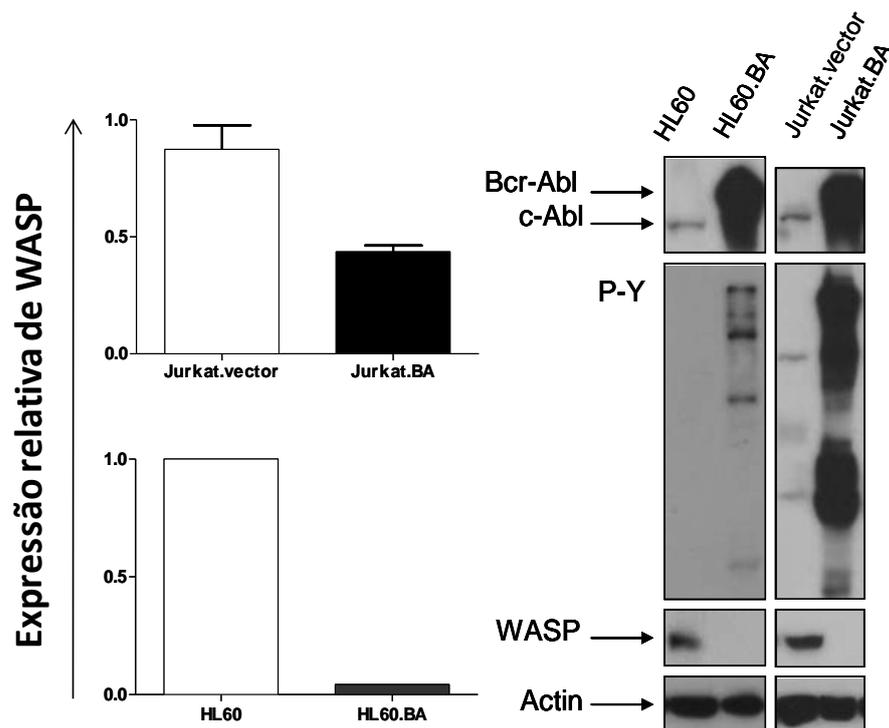


Figura 9: Expressão estável de Bcr-Abl em duas linhagens originalmente negativas para esse gene induziu o silenciamento completo de WASP. As linhagens celulares HL-60.BA e Jurkat.BA foram produzidas em nosso laboratório previamente através de infecção com vetores retrovirais contendo o gene BCR-ABL e seleção positiva por antibiótico. qPCR e *western blot* foram utilizados para avaliação da expressão transcricional relativa e protéica de WASP, respectivamente. O *blotting* para Bcr-Abl confirma a expressão e o aumento da fosforilação em resíduos de tirosina confirma a funcionalidade da oncoproteína. Actina foi usada como controle de *loading*.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

A partir deste momento, nosso projeto se dedicou a duas frentes de trabalho, sendo uma delas voltada a expandir o conhecimento a respeito dos mecanismos pelos quais Bcr-Abl promoveria a regulação de WASP. Inicialmente, questionamos se a atividade tirosina quinase de Bcr-Abl era importante para a supressão de WASP. Nós mostramos previamente que a linhagem Jurkat perde completamente a expressão de WASP quando infectada ectopicamente por vetor contendo o oncogene Bcr-Abl. Numa abordagem semelhante, nós comparamos a expressão de WASP em Jurkat tranfectada com vetor vazio, Jurkat.BA e Jurkat tranfectada com Bcr-Abl quinase-deficiente (Jurkat.BA.KR). Como vemos na figura 10, a presença de um Bcr-Abl incapaz de fosforilar seus substratos não induz diminuição dos níveis de WASP. Esse dado sugere que a atividade quinase de Bcr-Abl pode ser importante para a supressão da expressão de WASP.

Uma segunda abordagem foi tratar diferentes linhagens celulares com Mesilato de Imatinibe, droga bloqueadora da atividade quinase de Bcr-Abl. De forma interessante, a expressão de WASP não foi recuperada, indicando que a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl não é essencial para manter WASP silenciado (figura 11). Além disso, nossos dados sugerem que a supressão de WASP pode ser um evento irreversível, mediado por mecanismo estável de silenciamento gênico.

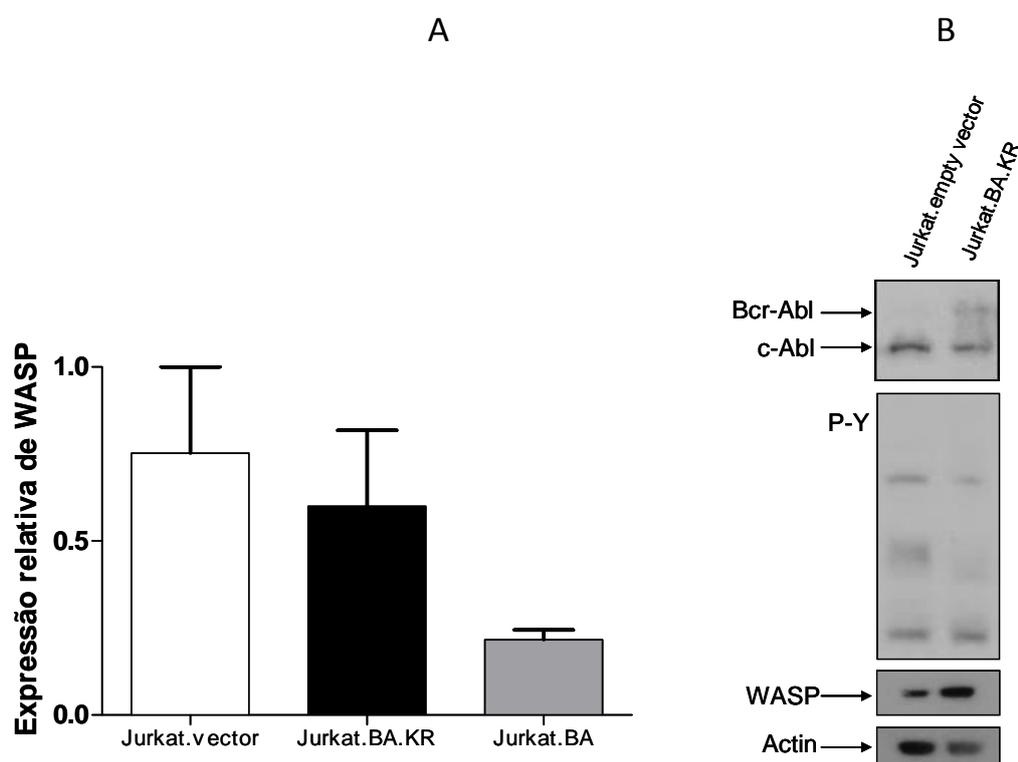


Figura 10: Bcr-Abl quinase-deficiente é incapaz de silenciar WASP em Jurkat. A linhagem Jurkat foi infectada com vetores retrovirais contendo Bcr-Abl selvagem e Bcr-Abl mutado no domínio SH1 (domínio quinase). qPCR e *western blot* foram utilizados para avaliação da expressão transcricional relativa e protéica de WASP, respectivamente. O *blotting* para Bcr-Abl confirma a expressão e o padrão de fosforilação em resíduos de tirosina confirma que Bcr-Abl.KR é uma quinase deficiente. Actina foi usada como controle de *loading*.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

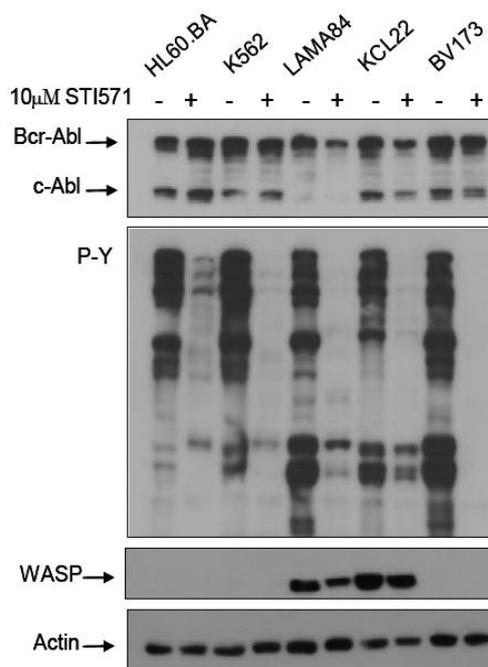


Figura 11: Expressão protéica de WASP após tratamento com Imatinibe em diferentes linhagens Bcr-Abl positivas. HL60.BA, K562, LAMA84, KCL22 e BV173 foram tratadas com 10 μ M STI571 (Imatinibe) e a expressão de WASP foi analisada por *western blot* após 24 horas de tratamento. O *blotting* para WASP teve o filme super exposto para a visualização de eventuais bandas sutis. A marcação para c-Abl foi usada como controle de expressão de Bcr-Abl. Anti-fosfo-tirosina foi usado como controle de atividade tirosina quinase de Bcr-Abl e actina foi usada como controle de *loading*.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

A expressão gênica pode ser suprimida de forma estável através de metilação do DNA, em sítios CpG localizados no promotor do gene. Tais metilações modificam a estrutura da cromatina de forma que a maquinaria de transcrição não tem acesso ao promotor, determinando o silenciamento do gene de maneira estável e dificilmente reversível. Neste contexto, nós inicialmente investigamos por análise *in silico* se os dois promotores descritos de WASP (Figura 12A) apresentavam ilhas CpG, passíveis de serem metiladas. Como mostra a figura 12B, em região do DNA da linhagem celular BV173 compreendida da origem de transcrição até 5Kb *upstream* o gene WASP, há duas regiões ricas em sequências CG, sendo uma mais proximal e outra mais distal em relação ao gene. Ambas as regiões são sítio de ligação para diferentes fatores de transcrição. Tendo essa informação em mãos, nós investigamos se as ilhas CpG localizadas *upstream* o gene WASP estariam metiladas em

BV173, acarretando o silenciamento do gene nessa linhagem celular derivada de paciente LMC. De fato, nossos dados demonstraram que as ilhas CpG localizadas no promotor proximal de WASP estão totalmente metiladas na linhagem BV173 (Figura 12C).

4.2 Recuperação da expressão de WASP:

Até o momento, nós demonstramos que Bcr-Abl suprime a expressão de WASP em células hematopoiéticas de pacientes LMC, e que a metilação do DNA em ilhas CpG no promotor de WASP poderia ser, pelo menos, um dos mecanismos envolvidos nesse fenômeno. Passamos então à investigação do impacto ou consequência biológica da supressão de WASP para a LMC. Para tal, nós recuperamos a expressão de WASP através de infecção por vetor lentiviral na linhagem K562, obtendo K562 expressando WASP em baixos e altos níveis (eGFP *low* e *high*) (Figura 13). Com essa ferramenta nós passamos a investigar se a presença de WASP na célula leucêmica contribui, se opõe ou é irrelevante para fenômenos envolvidos na tumorigênese, tais como proliferação e morte celular.

Figura 12: Ilhas CpG localizadas no promotor proximal de WASP estão hiper-metiladas. **A:** Esquema ilustrando os dois promotores descritos para o gene WASP, sendo um promotor proximal (Prom P) e um distal (Prom D). Os dois promotores estão separados entre si por 5Kb. **B:** Análise *in silico* utilizando o banco de dados ENCODE demonstrou que há duas regiões ricas em ilhas CpG (blocos verdes) *upstream* o gene WASP. A sequência mais próxima ao início de transcrição do gene está localizada no promotor proximal de WASP, e as ilhas CpG que distam aproximadamente 6Kb do gene estão localizadas no promotor distal. Essas ilhas CpG correspondem às regiões para ligação de diferentes fatores de transcrição (listados à esquerda; blocos negros: alta afinidade pela região; blocos cinza: afinidade moderada pela região; blocos claros: baixa afinidade para a região de DNA). **C:** Através da análise de metilação do DNA genômico da linhagem celular BV173, foi possível mostrar que as ilhas CpG do promotor proximal de WASP estão hiper-metiladas, levando ao silenciamento do gene. A figura mostra 1000 pb *upstream* e 500 pb *downstream* ao TSS de WASP. As linhas verticais abaixo do mapa são os sítios de CpG. Cada linha horizontal representa o sequenciamento de uma molécula única de DNA. Círculo preto: CpG metilada; círculo branco: CpG não-metilada.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

Cromossomo X. p11;23.

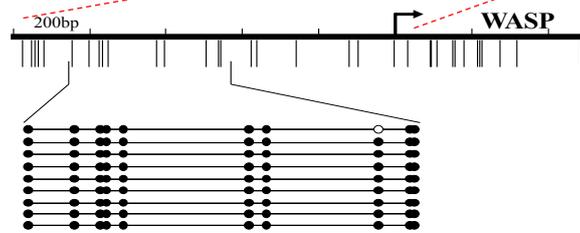
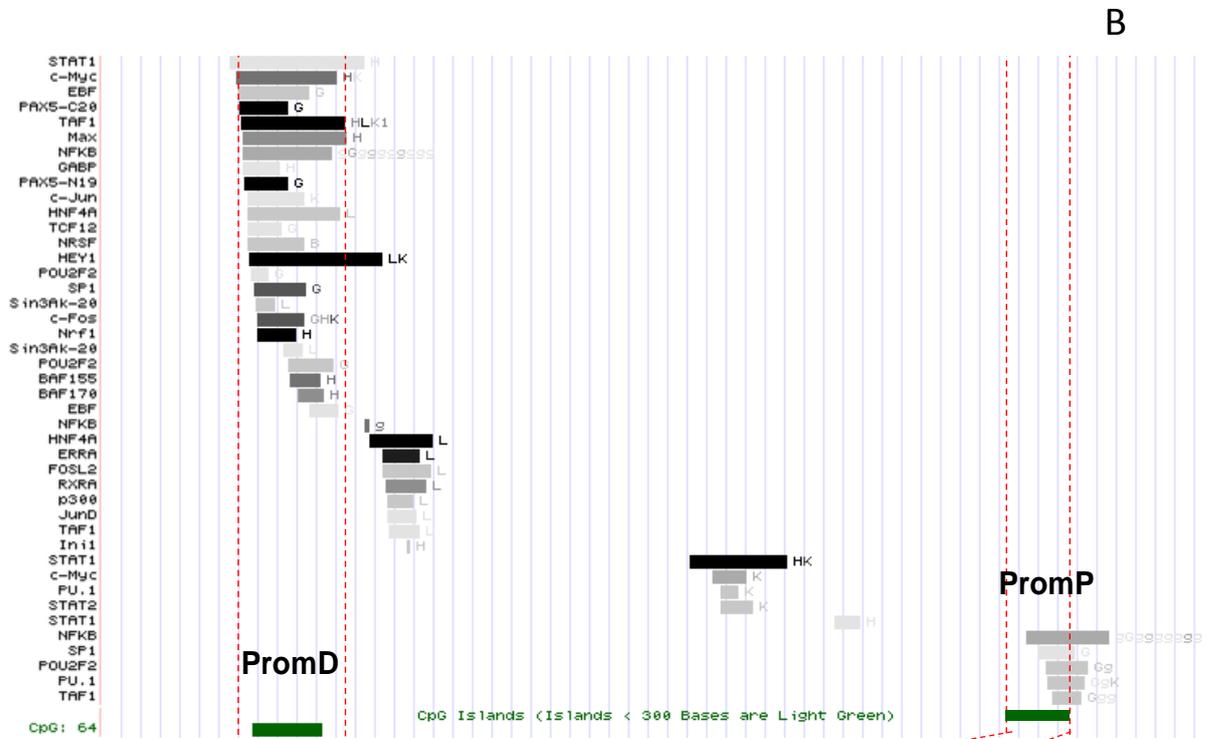
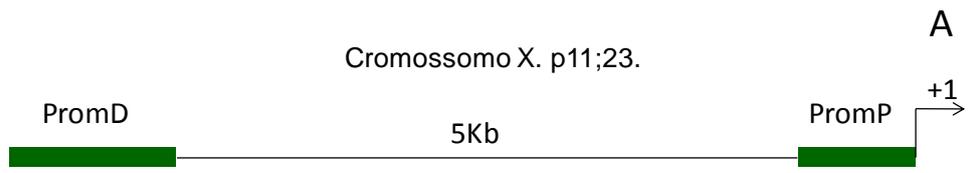
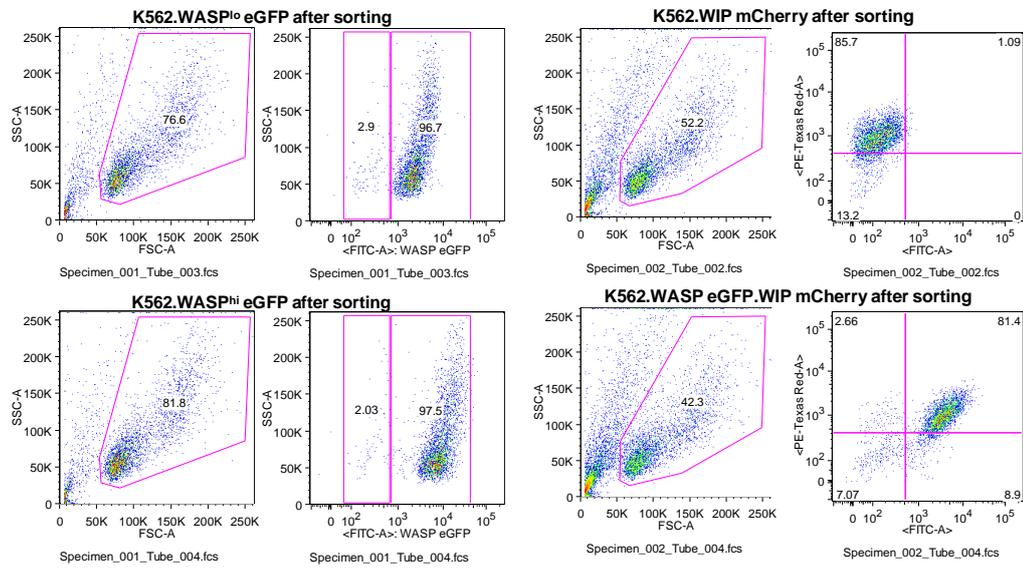


Figura 13: Recuperação da expressão de WASP em K562 através de infecção por vetores lentivirais.

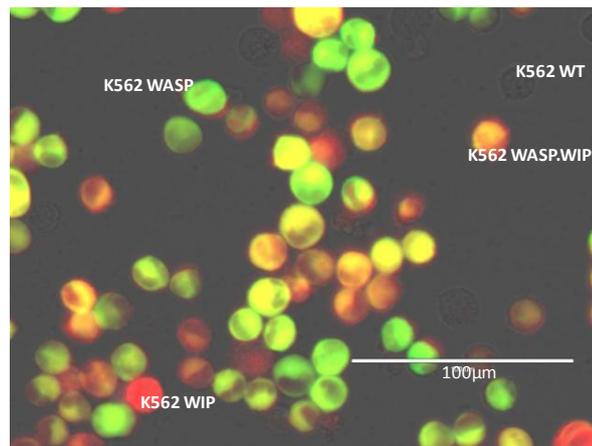
A: *Dot plot* mostrando a pureza obtida após *cell sorting* das células infectadas. **B:** Micrografia da cultura celular de K562.WASP.WIP (infectada com ambos os lentivirus para WASP *eGFP* e WIP *mCherry*), mostrando as quatro sub-populações de células presentes antes do *cell sorting*. **C:** *Western blot* mostrando que a recuperação de WASP (*eGFP*) em K562. O *blotting* para WIP (*mCherry*) foi usado como um controle adicional da infecção e actina como controle de *loading*.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

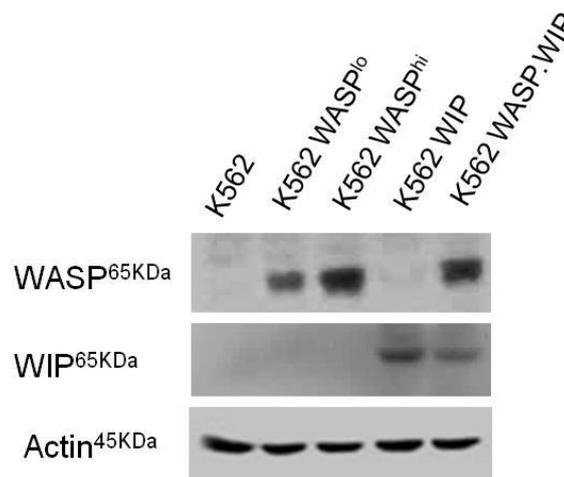
A



B



C



4.3 Consequências biológicas do silenciamento de WASP na proliferação celular:

Experimentos simples foram realizados inicialmente, nos quais K562 selvagem (WT), K562.WASP *high*, K562.WIP (que foi utilizada como controle) e K562 WASP.WIP (expressando os dois genes de forma ectópica) foram cultivadas por 120 horas e o número de células foi acompanhado diariamente por contagem em câmara de Neubauer. Já a partir das 96 horas de cultura foi possível observar que a re-expressão de WASP em K562 retardou o crescimento celular quando comparado com K562.WT e K562.WIP (Figura 14).

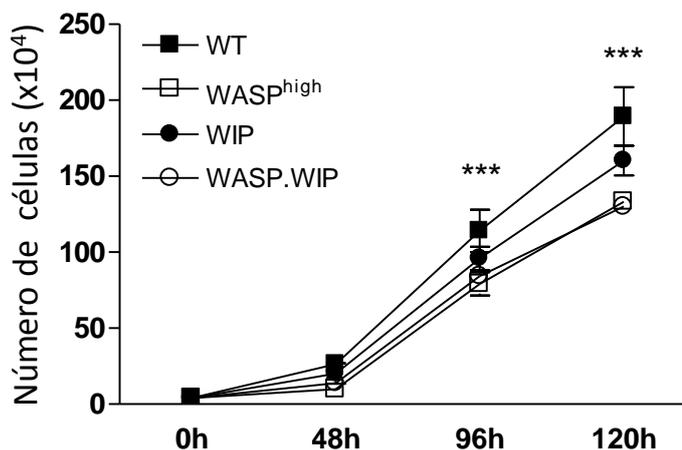


Figura 14: A expressão de WASP modula negativamente o crescimento celular: K562 WT, K562 re-expressando WASP (*high*), K562 expressando WIP e K562 expressando ambos genes foram cultivadas e o número de células foi contado em câmara de Neubauer nos tempos mostrados na figura. Two way ANOVA e Bonferroni foram utilizados como testes estatísticos. *** $p < 0.001$.

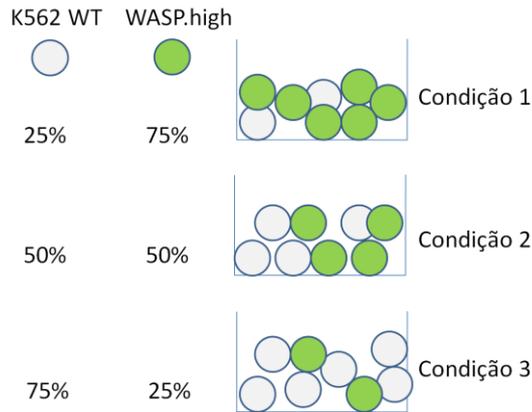
FONTE: Produzido pelo próprio autor.

Uma segunda abordagem foi utilizada para confirmar o fato de que K562.WT e K562.WASP se comportavam de forma diferente quanto à proliferação celular. Nós realizamos co-cultura das duas linhagens iniciando com a proporção 25:75%, 50%:50% ou 75%:25% de K562.WT e K562.WASP, respectivamente (Figura 15A). Em todas as condições, o aumento da frequência das células eGFP negativas (linhagem selvagem) foi superior ao da célula expressando WASP após 7 dias de cultura (Figura 15B), sugerindo que a expressão de WASP causa um impacto negativo na proliferação das células leucêmicas.

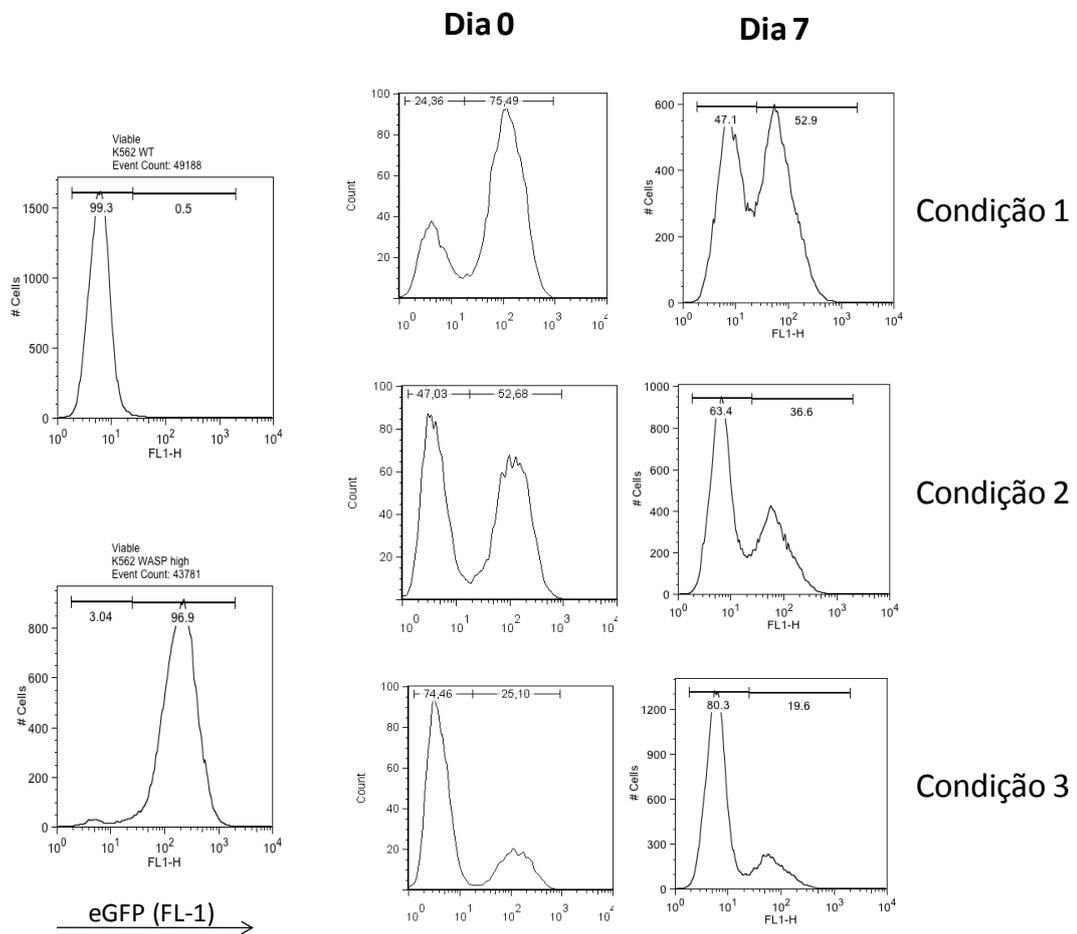
Figura 15: As células K562 expressando WASP mostram desvantagem no crescimento celular em co-cultura com a linhagem leucêmica selvagem. A: Esquema ilustrando o desenho experimental, no qual K562 WT (eGFP negativa) foi co-cultivada com K562 WASP (eGFP positiva) em três diferentes condições (25%:75%; 50%:50%; 75%:25%). **B:** Após 7 dias de culturas a frequência de cada população foi avaliada por citometria de fluxo. Histogramas isolados à esquerda mostram o perfil de cada linhagens em cultura. Histogramas centrais evidenciam a frequências das linhagens no dia zero e histogramas à direita evidenciam as frequências observadas após 7 dias de co-cultura.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

A



B



Os resultados até então obtidos poderiam ter três explicações: a expressão de WASP em células leucêmicas i) regula negativamente sua proliferação, ou ii) aumenta sua taxa de apoptose, ou ainda iii) provoca os dois fenômenos ao mesmo tempo. Ao avaliarmos a taxa de divisão celular através do decaimento de fluorescência incorporado pelas células, nós observamos que as duas linhagens celulares proliferavam de forma similar após 4 dias de cultura (Figura 16).

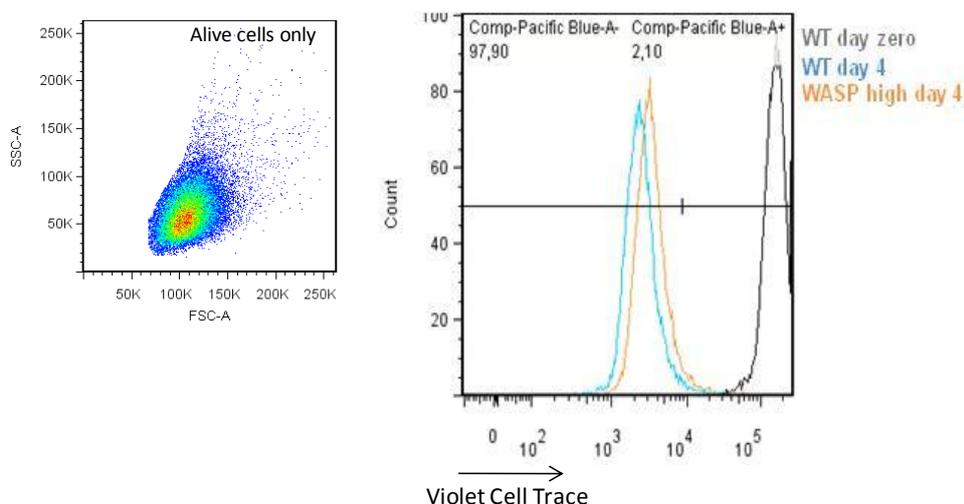


Figura 16: A expressão de WASP não interfere com a taxa de proliferação de K562. As células K562 WT e K562 WASP foram marcadas Violet Cell Trace (Invitrogen) e cultivadas por 4 dias, sendo a taxa proliferativa acompanhada por citometria de fluxo através do decaimento da fluorescência inicial devido às divisões celulares. O dot plot à esquerda destaca que consideramos apenas as células vivas para investigação da proliferação celular, excluindo do gate analisado as células mortas e debris. O histograma à direita mostra a fluorescência das células no quarto dia de cultura. Linha preta: Fluorescência de células K562 WT no dia zero, logo após incubação, servindo de controle de fluorescência inicial; linha azul: K562 WT no quarto dia; linha laranja: K562 WASP no quarto dia.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

4.4 Consequências biológicas do silenciamento de WASP na resistência a apoptose:

Uma vez que a recuperação de WASP pareceu não modificar a taxa proliferativa das células K562, nós partimos para a segunda possibilidade: a modulação da apoptose. A recuperação de WASP em K562 seria capaz de modular a forte resistência à apoptose conferida por Bcr-Abl às células leucêmicas? Para responder tal questão, nós co-cultivamos novamente K562 WT (eGFP negativa) e K562 WASP (eGFP *high*) por 48 horas e avaliamos a

taxa de morte celular em cultura por incorporação de iodeto de propídeo. De maneira interessante, nós observamos que K562 expressando WASP sofria apoptose em cultura (Figura 17), sugerindo que WASP era capaz de tornar essa célula susceptível a um processo espontâneo de morte celular.

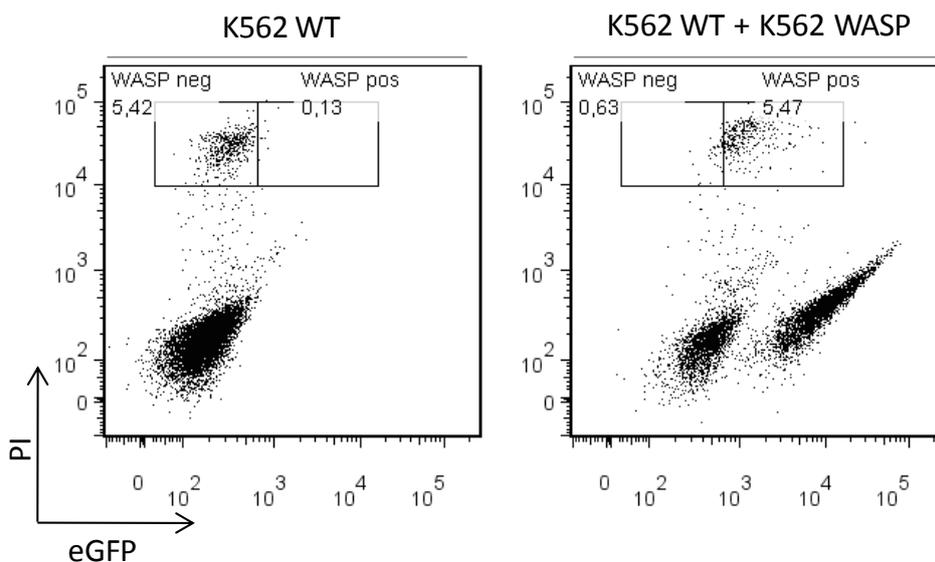
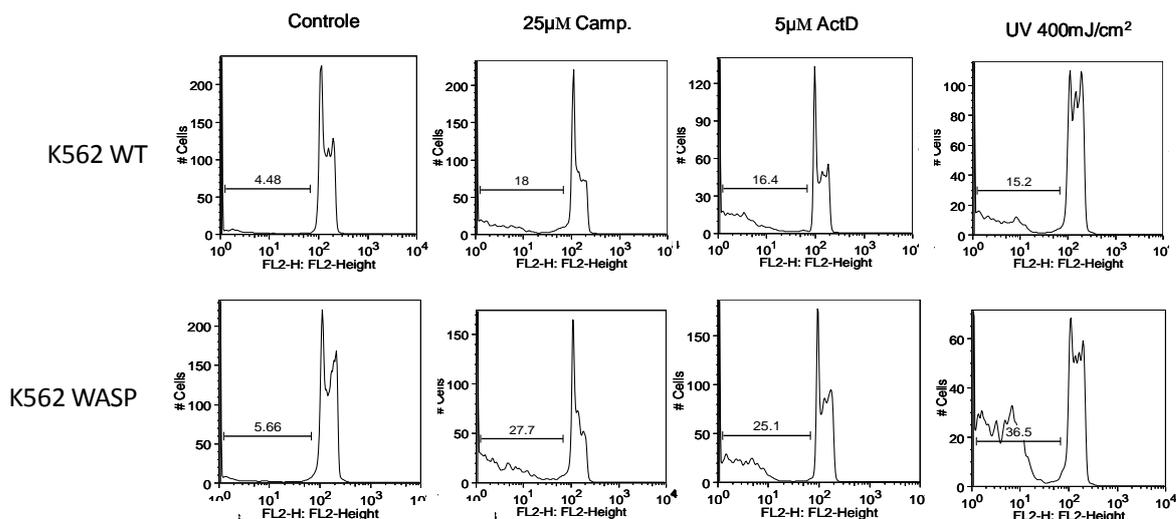


Figura 17: As células K562 expressando WASP sofrem morte celular espontânea. K562 WT (eGFP negativa) foi co-cultivada com K562 WASP (eGFP positiva) por 2 dias e a taxa de morte celular foi avaliada por citometria de fluxo através da incorporação de Iodeto de Propídeo (PI). Como controle positivo e de *gating*, K562 WT foi cultivada separadamente durante os 4 dias de experimento, porém sem adição de meio de cultura fresco, o que gerou estresse e induziu morte de parte das células, como mostramos no dot plot à esquerda. Na co-cultura foi adicionado volume fixo de meio de cultura fresco para evitar estresse por *starvation*.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

O fato de WASP sensibilizar as células leucêmicas a um processo de apoptose espontânea nos conduziu por um caminho natural de questionamentos: e quanto à apoptose induzida por quimioterápicos? WASP seria capaz de se opor ao forte efeito anti-apoptótico de Bcr-Abl frente a essas drogas? A figura 18 mostra que K562 expressando WASP foi mais sensível à apoptose induzida por Camptotecina, Actinomomicina D e radiação Ultra Violeta.



B

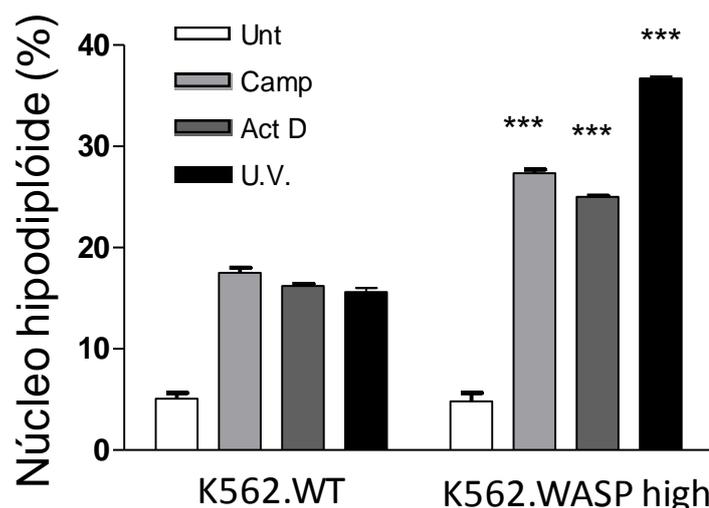


Figura 18: A expressão de WASP torna a linhagem leucêmica K562 mais susceptível à apoptose induzida por Camptotecina, Actinomicina D e radiação Ultra Violeta. K562 WT e K562 WASP foram tratadas com 25µM de Camptotecina (Camp), 5 µM de Actinomicina D (Act D) e 400mJ/cm² de UVB. A morte celular foi avaliada após 24 horas de tratamento por citometria de fluxo através da quantificação de núcleos hipodiplóides. **A:** Histogramas mostrando a frequência de núcleos hipodiplóides nas linhagens celulares tratadas e controle. **B:** Representação gráfica dos dados da figura A, analisados estatisticamente por *Two way ANOVA* e pós teste de Bonferroni. ***p<0.001.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

Drogas como Camptotecina e Actinomicina D são utilizadas na terapia de alguns tipos de câncer, mas não na LMC, que tem o Imatinibe como primeira linha de tratamento dos pacientes. Buscando uma abordagem mais próxima do contexto da LMC, nós tratamos as linhagens K562.WT e

K562.WASP com diferentes doses de Mesilato de Imatinibe, e avaliamos a taxa de apoptose após 48 horas de tratamento. A expressão de WASP tornou as células leucêmicas mais susceptíveis a diferentes doses de Imatinibe (Figura 19). Esses dados mostram que WASP pode ter um papel na regulação do processo de apoptose, e além disso, que a expressão de WASP nas células Bcr-Abl positivas pode ser determinante na resistência ou susceptibilidade dessas células ao tratamento correntemente utilizado nos pacientes LMC.

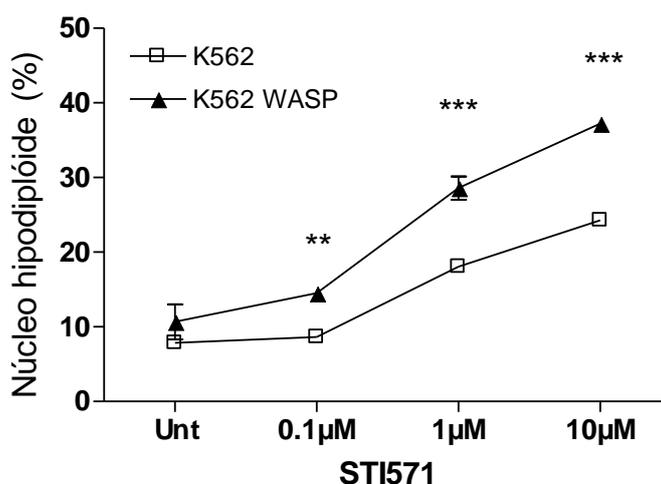


Figura 19: A expressão de WASP torna a linhagem leucêmica K562 mais susceptível à apoptose induzida por Imatinibe (STI571). K562 WT e K562 WASP foram tratadas com diferentes doses de Mesilato de Imatinibe por 48 horas. A morte celular foi avaliada após por citometria de fluxo através da quantificação da frequência de núcleos hipodiplóides. *Two way ANOVA* e pós teste de Bonferroni foram utilizados para análise estatística. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. Unt: não tratado.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

4.5 WASP regula a maquinaria molecular de apoptose nas células leucêmicas:

Visto que a re-expressão de WASP em K562 interferiu com o processo de morte celular dessas células, nós nos dedicamos ao entendimento dos mecanismos que estariam por trás deste achado. O balanço de expressão de membros da família Bcl-2 é determinante na regulação da via intrínseca de apoptose. Por análise de qPCR, nós observamos que a expressão de WASP não modificou o padrão de expressão de membros pró-apoptóticos, assim como a expressão do receptor de morte Fas (Figura 20A). Contudo, ao avaliarmos a expressão de genes anti-apoptóticos, observamos que Bcl-XL, um dos genes-alvo de Bcr-Abl que desempenha um papel importante na resistência a apoptose induzida pelo oncogene, tinha sua expressão transcricional diminuída em mais

de 50% (Figura 20B). Esse dado nos permite hipotetizar que WASP pode ter tornado a célula leucêmica K562 mais sensível a apoptose através da supressão da expressão de Bcl-XL.

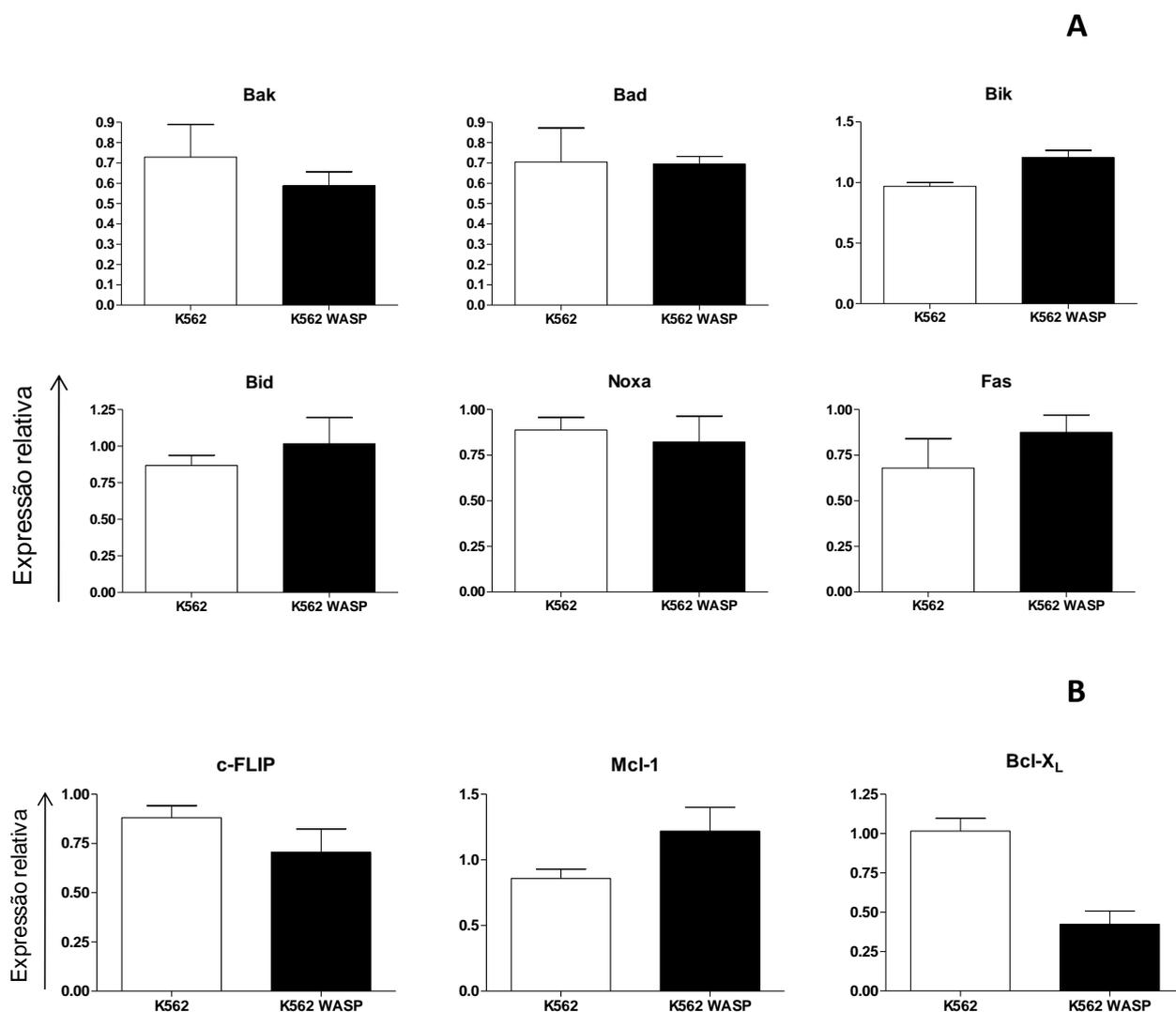


Figura 20: Expressão relativa de genes envolvidos no processo de apoptose após a expressão de WASP em K562. Foram sintetizados cDNA das linhagens K562 WT e K562 WASP e os níveis de transcrição dos genes foram avaliados por qPCR. **A:** Expressão relativa de genes pró-apoptóticos. **B:** Expressão relativa dos genes anti-apoptóticos c-FLIP, Mcl-1 e Bcl-XL.

FONTES: Produzido pelo próprio autor.

Além de Bcl-XL, um grupo de genes envolvidos no processo apoptótico foi também modulado pela expressão de WASP, chamando nossa atenção de forma especial. Os receptores de morte DR4 e DR5, os quais estão suprimidos em grande número de tumores, incluindo LMC, tiveram sua expressão aumentada na linhagem K562 WASP, quando comparada com K562 selvagem. E igualmente interessante, houve um aumento notável da transcrição de seu ligante de morte, TRAIL (Figura 21).

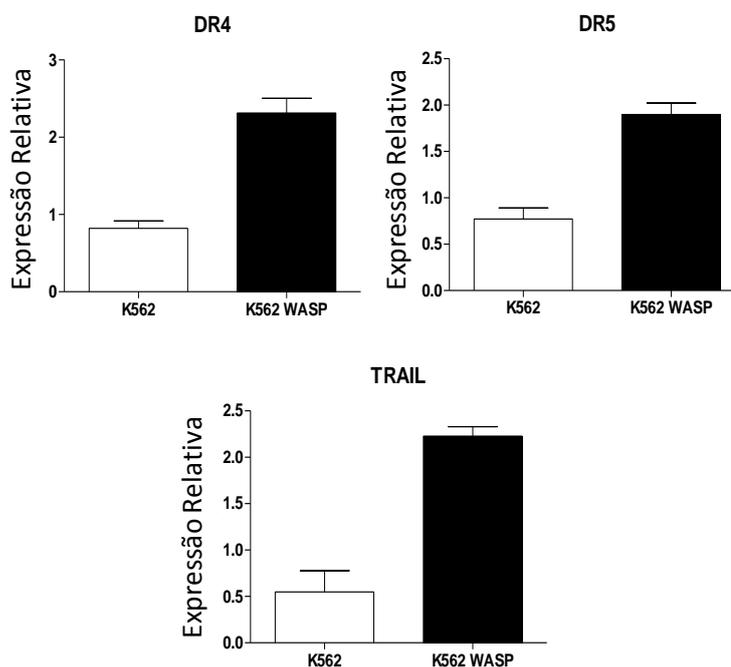


Figura 21: A expressão de WASP regula positivamente a expressão TRAIL e de seus receptores de morte DR4 e DR5 na linhagem leucêmica K562. Foram sintetizados cDNA das linhagens K562 WT e K562 WASP e os níveis de transcrição dos genes DR4, DR5 e TRAIL foram avaliados por qPCR.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

Esses dados mostram que a expressão de WASP leva a um aumento dos níveis de expressão tanto dos receptores de morte quanto do seu ligante, o que poderia conduzir as células leucêmicas a uma espécie de suicídio celular pela via extrínseca de apoptose, onde elas próprias forneceriam TRAIL. Isso poderia estar relacionado ao aumento da taxa de apoptose espontânea observada anteriormente. Para confirmar, nós cultivamos as linhagens celulares na presença ou não de TRAIL R2-Fc, uma molécula que compete com TRAIL na ligação com os receptores de morte, bloqueando a via extrínseca de apoptose. Ao

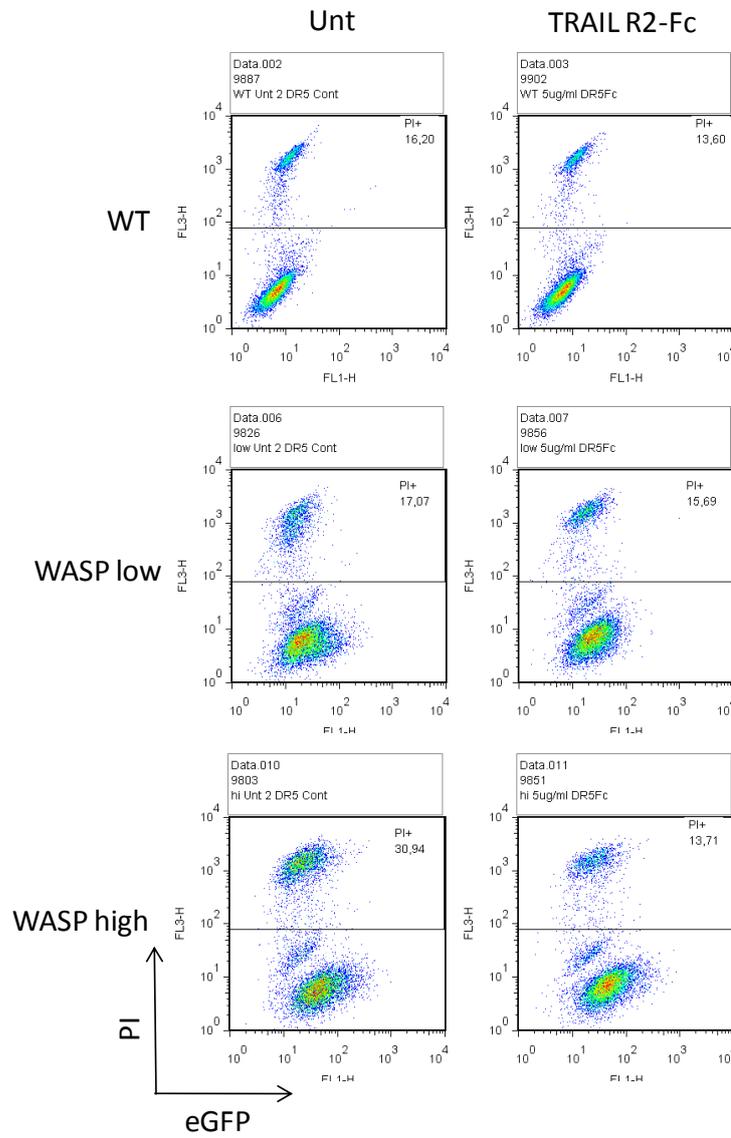
bloquearmos a via de TRAIL nós diminuimos a taxa de apoptose espontânea para os níveis basais, demonstrando que WASP provoca a apoptose espontânea de células leucêmicas K562 através da via de TRAIL (Figura 22).

A re-expressão de WASP parece ser capaz de modular negativamente a principal característica conferida por Bcr-Abl às células leucêmicas: a forte resistência a apoptose. A super expressão do gene anti-apoptótico Bcl-XL foi suprimida, os receptores de morte DR4 e DR5, bem como seu ligante TRAIL tiveram a expressão elevada. Mas como WASP estaria atuando para produzir tais eventos?

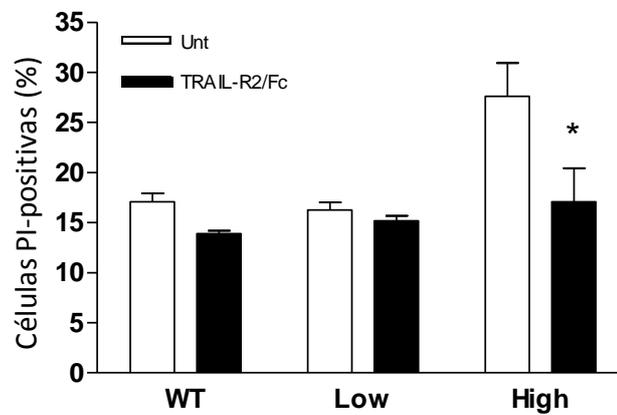
Figura 22: Morte celular espontânea induzida pela expressão de WASP nas células leucêmicas é dependente da via de TRAIL. K562 WT, WASP low e WASP high foram cultivadas na presença ou não de 5µg/mL de TRAIL R2-Fc (dominante negativo de TRAIL, que se liga a DR4 e DR5 e bloqueia a via extrínseca de morte). **A:** A morte celular foi avaliada após 48 horas por incorporação de iodeto de propídio. **B:** Representação gráfica dos dados mostrados na figura A. *Two way* ANOVA e pós teste de Bonferroni foram utilizados para análise estatística. * $p < 0.05$.

FONTE: Produzido pelo pr

A



B



4.6 WASP se liga a Bcr-Abl e modula sua atividade tirosina-quinase:

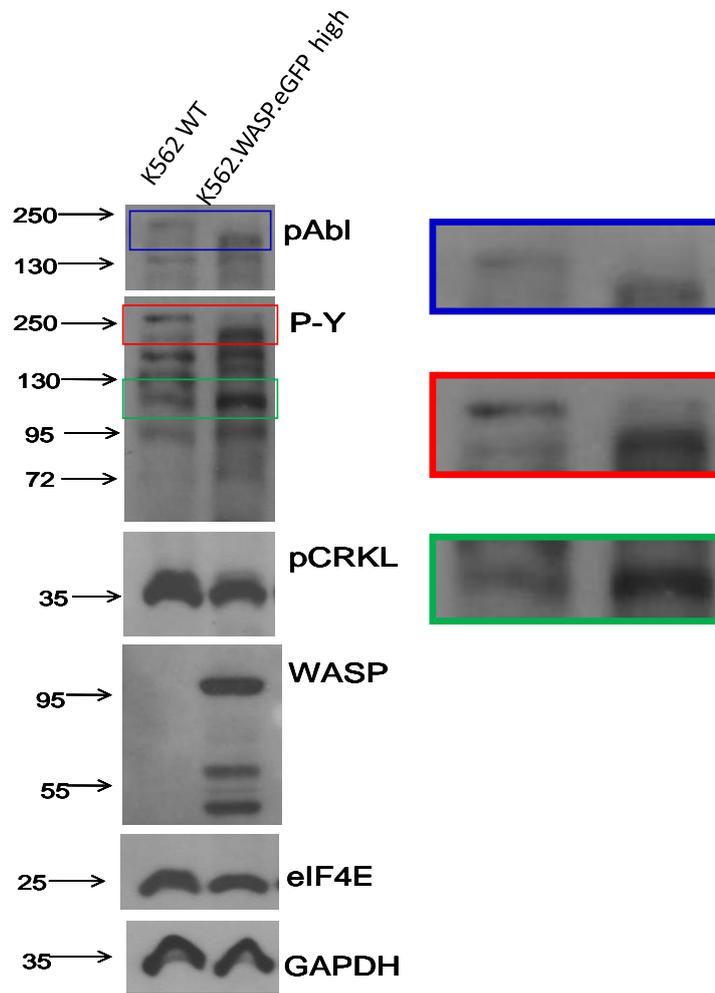
Uma vez que a atividade tirosina quinase é descrita ser essencial para a leucemogênese, nós investigamos se WASP poderia interferir com a fosforilação das proteínas-alvo de Bcr-Abl. A figura 23A mostra que o padrão de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina é diferente entre K562 selvagem e K562 expressando WASP. A auto-fosforilação de Bcr-Abl (240KDa), fundamental para ativação da oncoproteína, é dramaticamente suprimida na presença de WASP (retângulos azul e vermelho). Outras proteínas (não identificadas) também são diferencialmente fosforiladas na linhagem K562 WASP high, como podemos observar no *blotting* de fosfo-tirosina.

Na tentativa de compreender o mecanismo pelo qual WASP modularia a capacidade ou habilidade de Bcr-Abl fosforilar seus alvos, nós imunoprecipitamos WASP, obtendo resultados originais e de grande importância no estudo da LMC: WASP é capaz de se ligar molecularmente a Bcr-Abl (Figura 23B). Essa interação molecular pode estar relacionada com a modulação da atividade tirosina-quinase da oncoproteína, que por consequência interferiria com a capacidade tumorigênica de Bcr-Abl.

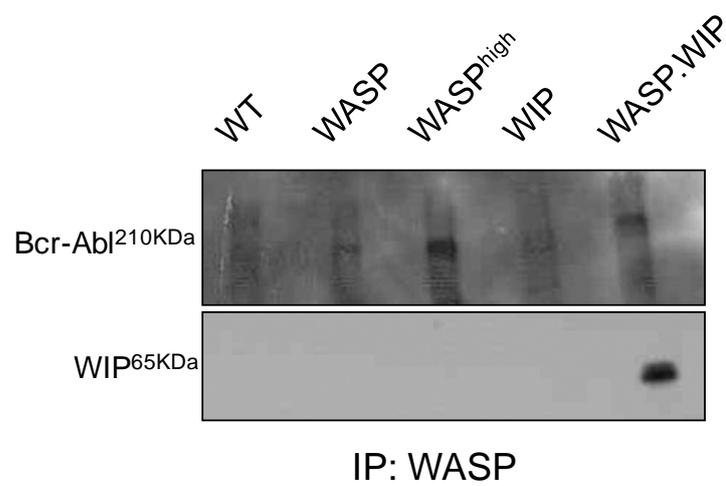
Figura 23: WASP é capaz de se ligar a Bcr-Abl, provocando uma mudança no padrão de fosforilação de proteínas da célula K562. **A:** Extratos protéicos de células K562 WT, K562 WASP (linhagem celular sem separação de populações *high* e *low*), K562 WASP *high*, e K562 WIP, foram utilizados para imunoprecipitação de WASP. A ligação de WASP com Bcr-Abl foi verificada por *western blot*. WIP foi utilizado como controle positivo. **B:** Alterações no padrão de fosforilação de proteínas provocadas pela provável ligação de WASP com Bcr-Abl foram avaliadas por *western blot*. Os retângulos azul, vermelho e verde destacam as diferenças na fosforilação de Abl e duas proteínas não determinadas, respectivamente. Os *blottings* à direita mostram em maior detalhe as referidas variações. O *western blot* para WASP evidencia a expressão em elevados níveis em K562 WASP *high*. As proteínas eIF4E e GAPDH foram usadas como controle de *loading*.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

A



B



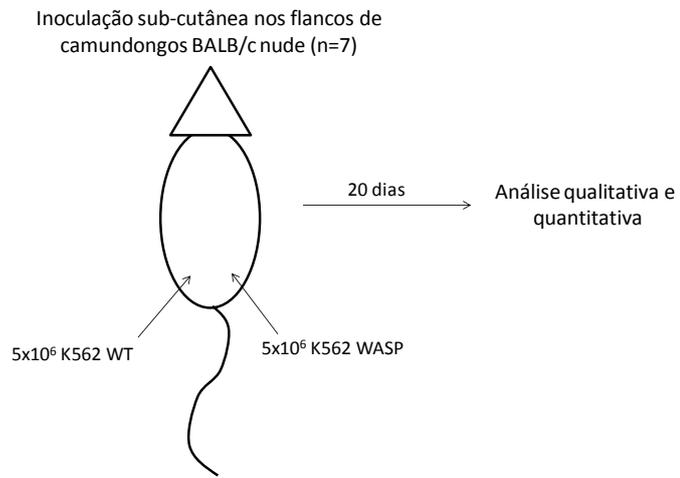
4.7 A expressão de WASP em células leucêmicas inibe sua capacidade tumorigênica em modelo *in vivo*:

Os dados apresentados até o momento sugerem fortemente um papel para a supressão de WASP na LMC, visto que WASP parece ser capaz de se ligar a Bcr-Abl, modular sua atividade quinase e se opor à sua principal característica tumorigênica: o aumento da resistência a apoptose. Para fortalecermos esses achados, nós utilizamos um modelo murino de tumor sólido subcutâneo induzido pela célula leucêmica K562, no qual K562.WT e K562.WASP foram injetadas nos flancos de animais BALB/c nude e o crescimento tumoral foi acompanhado por 21 dias (Figura 24A). Enquanto K562 WT induziu o desenvolvimento de um tumor sólido exuberante, com mediana de 460mm^3 de volume, K562 WASP induziu o aparecimento de tumores discretos ou indetectáveis ao olho desarmado, com mediana das massas tumorais de 40mm^3 de volume (Figuras 24B e 24C). Dessa forma, nossos resultados mostram que a expressão de WASP em K562 é capaz de diminuir sua capacidade tumorigênica *in vivo*.

Figure 24: A expressão de WASP modula negativamente a capacidade tumorigênica de células leucêmicas em modelo murino. A e B: K562 WT e K562 WASP foram inoculadas (subcutâneo) nos flancos esquerdo e direito, respectivamente, de 7 animais BALB/c nude. O desenvolvimento de tumor sólido foi acompanhado por 21 dias, quando os animais foram sacrificados. **C:** O volume tumoral foi medido e calculado multiplicando-se comprimento (C), largura (L) e profundidade ou altura (A) da massa tumoral. Para análise estatística foi usado o “t” test.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

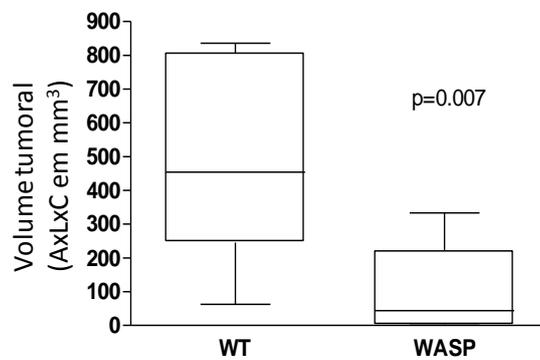
A



B



C



4.8 O silenciamento de WASP correlaciona-se com pior sobrevida dos pacientes LMC:

Segundo nossos dados, WASP parece ser capaz de se opor ao efeito anti-apoptótico de Bcr-Abl e à habilidade tumorigênica dessa oncoproteína. Nós então investigamos se pacientes LMC com maiores níveis ou com mais discretas diminuições de expressão de WASP teriam melhor prognóstico, ou melhor resposta ao tratamento com Imatinibe. Para tal, nós dividimos os pacientes de fase Acelerada e Blástica (os quais estatisticamente apresentam níveis diminuídos de expressão de WASP) em dois subgrupos: WASP *low* e WASP *very low* (Figura 25A), sendo o *cutoff* a mediana de expressão de WASP nesses pacientes (ver Figura 6B). Atendendo às nossas expectativas, nós observamos que pacientes LMC que expressavam níveis de WASP moderadamente suprimidos (WASP *low*) apresentaram maior sobrevida global. Ao contrário, pacientes com níveis profundamente diminuídos de WASP (WASP *very low*) apresentaram menor sobrevida global (Figura 25B). Isso indica que a manutenção da expressão de WASP, mesmo que em níveis discretos, pode conferir uma vantagem ao paciente LMC, contribuindo para sua resposta ao tratamento com Imatinibe.

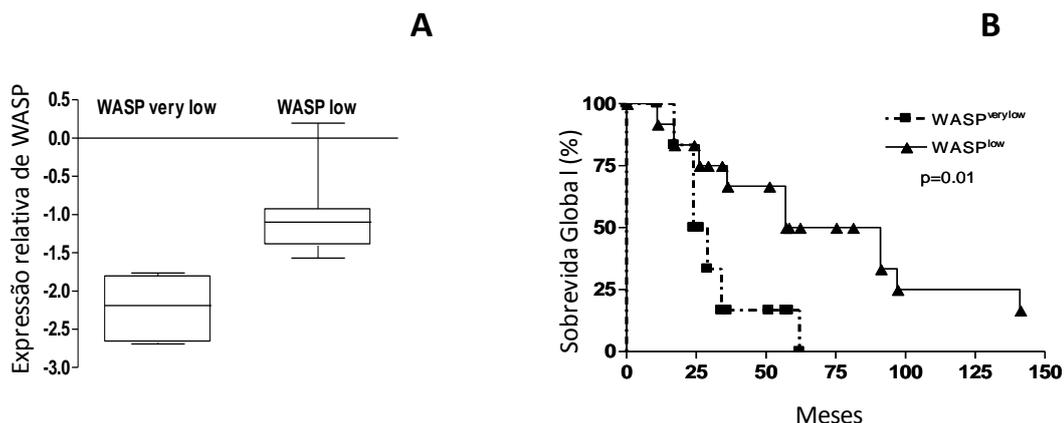


Figura 25: A expressão de WASP correlaciona com maior sobrevida global de pacientes LMC sob tratamento com Imatinibe. A: Os valores de expressão relativa de WASP foram obtidos de pacientes nas fases Acelerada e Blástica da LMC (rever em Figura 6). Os pacientes foram então divididos em dois subgrupos, de acordo com a expressão de WASP: *WASP low* e *WASP very low*, tendo como *cutoff* a mediana de expressão do gene nesses pacientes. **B:** Pacientes com expressão abaixo da mediana (*WASP very low*) apresentaram menor sobrevida global, ao passo que pacientes com níveis de expressão de WASP acima da mediana e, portanto, mais próximos dos níveis normais, apresentaram maior sobrevida global sob o tratamento com Imatinibe.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

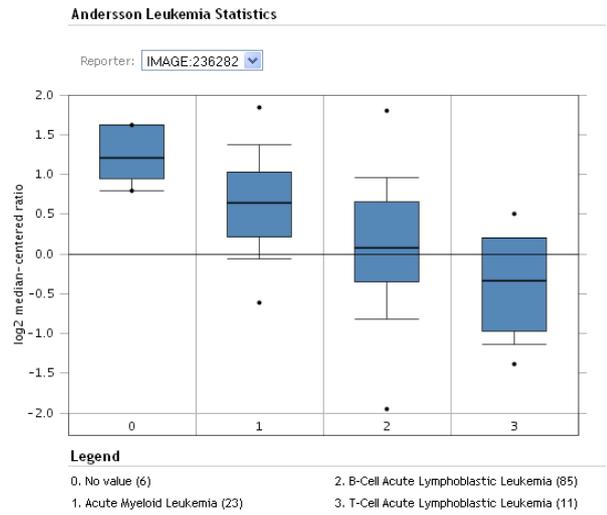
4.9 Análise *in silico* da expressão de WASP em outras neoplasias hematológicas:

Utilizando uma ferramenta de bioinformática disponível atualmente, nós pesquisamos se há algum relato de expressão diferencial de WASP em outras leucemias. O banco público de dados ONCOMINE reúne 50 mil depósitos de dados oriundos de diversos grupos de estudo do câncer pelo mundo. Trata-se de dados de *microarray* realizados com amostras de indivíduos controle e pacientes com diferentes tipos de neoplasias, sendo a maioria deles não-publicados em artigos convencionais. Dois grupos depositaram dados que mostram diminuição dos níveis de WASP em diferentes leucemias. *Anderson Leukemia* descreve uma supressão de WASP em células hematopoiéticas de 23 pacientes com Leucemia Mielóide Aguda, em 85 pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B e em 11 pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T (Figura 26A). O grupo *Choi Leukemia* também depositou dados mostrando diminuição de WASP, mas em células T CD4 de pacientes com Leucemia/Linfoma Crônica (Figura 26B) e Aguda de Células T de Adultos (26C).

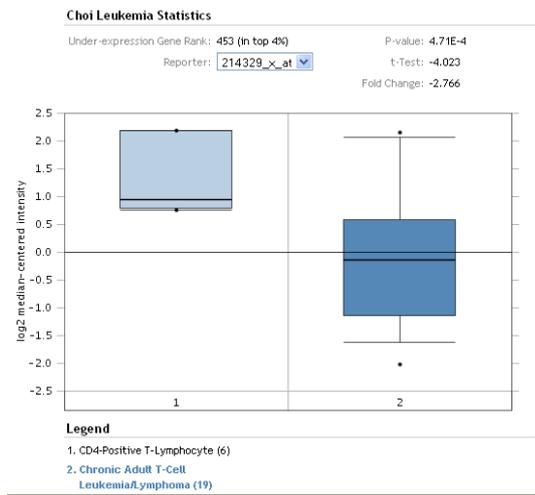
Figura 26: Níveis diminuídos de expressão de WASP podem ser encontrados em outros tipos de leucemias. Utilizando a plataforma ONCOMINE, a qual reúne atualmente 50.000 resultados de *microarray* de vários grupos do mundo que pesquisam câncer, nós investigamos se o gene WASP poderia estar diferentemente expresso em outros tipos de leucemias. **A:** Resultados depositados pelo grupo *Anderson's Leukemia* permitiram a comparação dos níveis de expressão de WASP em medula óssea de indivíduos normais (*no value*; n=6) com amostras de medula óssea de indivíduos com Leucemia Mielóide Aguda (n=23), Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B (n=85) e Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T (n=11). ANOVA foi aplicado para análise estatística. **B:** Dados depositados pelo grupo *Choi Leukemia* permitiram a comparação dos níveis de WASP entre células T CD4+ de indivíduos saudáveis (n=6) e Linfoma/Leucemia Crônica de Células T de Adultos (n=19). Test "t" foi aplicado para análise estatística. **C:** Dados depositados também pelo grupo *Choi Leukemia* permitiram a comparação dos níveis de WASP entre células T CD4+ de indivíduos saudáveis (n=6) com Linfoma/Leucemia Aguda de Células T de Adultos (n=22). Teste "t" foi aplicado para análise estatística.

FONTE: Produzido pelo próprio autor.

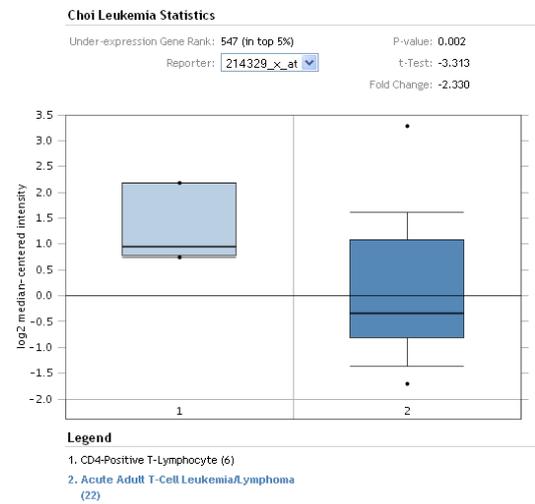
A



B



C



Esses dados enfatizam a importância de nosso estudo. Uma vez que a supressão de WASP é um fenômeno ocorrente em diversas neoplasias hematológicas, nossos resultados podem ser discutidos sob outros contextos, podendo esclarecer a biologia molecular de cada doença envolvida e ampliar a possibilidade de desenvolvimento de novas terapias no futuro.

5 DISCUSSÃO

A Leucemia Mielóide Crônica é modelo perfeito de como a pesquisa de base, produzindo o conhecimento molecular da doença, pode oferecer uma plataforma para o diagnóstico e terapia. Nosso trabalho, de maneira original, disponibiliza mais uma peça para esta plataforma, inserindo no contexto da Leucemia Mielóide Crônica a proteína WASP, uma molécula absolutamente essencial para o compartimento hematopoiético. O desenvolvimento e aprimoramento dos inibidores de tirosina quinase (ITK) revolucionaram a terapia da LMC nos últimos dez anos, fazendo com que os hematologistas digam nas conferências e conversas informais que “... *Se toda leucemia fosse como a LMC, nós estaríamos muito mais tranquilos*”. Essa afirmativa é acertada. Entretanto, não podemos negligenciar que a excelência dos ITK depende da precocidade do início do tratamento (o que nem sempre é possível). Além disso, que cerca de 25% dos pacientes em fase crônica não respondem ao Imatinibe ou apresentam resposta sub-ótima passando para protocolos com ITK de segunda geração. E ainda, que 50% dos pacientes tratados com ITK de segunda geração não alcançam remissão da doença [3]. Isso significa, numa linguagem direta, que cerca de 12,5% de todos os pacientes LMC precisam de algo melhor do que está disponível. Nesse ínterim, o estudo de novos genes, novos alvos moleculares, novas alternativas, é fundamental para o contínuo avanço no desenvolvimento de terapias para esses pacientes.

Inicialmente, nós mostramos que Bcr-Abl promove uma supressão de WASP desde o RNAm até a proteína, tendo sido este fenômeno observado em linhagens celulares e em amostras de pacientes (Figuras 6, 8 e 9). Essa diminuição correlaciona-se negativamente com a expressão do Bcr-Abl, de modo que amostras de pacientes com maiores níveis de Bcr-Abl apresentaram menores níveis de WASP (Figura 7). Ren relata que a expressão de Bcr-Abl aumenta em cada célula leucêmica com a progressão da doença, devido a um aumento da transcrição e por duplicação gênica [6]. O fato dos leucócitos circulantes de pacientes em fase crônica expressarem normalmente WASP pode estar associado aos baixos níveis do oncogene presentes nas células. A partir da fase acelerada, quando há mais Bcr-Abl, WASP seria profundamente modulado. Uma crítica que poderia ser levantada sobre nossos dados é que a diminuição de WASP poderia ser apenas um reflexo da mudança da frequência das células circulantes. Ou seja, o desvio a esquerda, o maior número de blastos circulantes, uma eventual

queda da população linfocitária ou neutrofílica poderiam dar a falsa impressão de que o gene WASP está diminuído nas células. Embora interessante, essa crítica é facilmente posta em cheque visto que i) o número de blastos elevado no sangue configura apenas a crise blástica, mas WASP está diminuído desde a fase acelerada; ii) WASP é fortemente expresso em todas as células hematopoiéticas, desde os precursores CD34⁺ (células imaturas) até os leucócitos maduros, o que significa que uma mudança na frequência das populações circulantes não comprometeria a detecção de WASP no *pool*.

Nossos dados de supressão de WASP durante a evolução da LMC trazem, de imediato, um ponto que gostaríamos de discutir neste manuscrito. Pacientes sob tratamento com Imatinibe podem permanecer em fase crônica ou evoluir para fases blástica da doença. Entre esses dois momentos ocorre a fase acelerada, quando alterações citogenéticas adicionais podem ser detectadas e um aumento do número de blastos na medula óssea é observado. Nesse caso, intervenções como aumento de dose de Imatinibe, uso de inibidores de tirosina quinase da segunda geração (Nilotinibe e Dasatinibe), ou mesmo um transplante de medula óssea deve ser cogitado. Nesse contexto, a precocidade da descoberta da evolução da doença é fundamental para o sucesso da nova medida implementada [63, 64].

Marcadores de evolução da doença ou de prognósticos são importantes por auxiliarem as decisões médicas quanto à melhor intervenção e à antecipação de tratamentos que previnam um quadro indesejável da doença. Atualmente, o monitoramento de resposta ao tratamento e evolução da LMC é feito por PCR em tempo real de amostra de sangue periférico para o oncogene BCR-ABL. Nós acreditamos que WASP poderia ser utilizado como um marcador adicional de evolução da LMC, pois sua expressão, que é normal em fase crônica, diminui drasticamente já na fase acelerada, antes da leucemia entrar em crise blástica, quando o paciente tem baixíssima chance de boa resposta com as intervenções médicas. Além disso, nossos resultados mostram que a diminuição de WASP é detectada em sangue periférico, nos leucócitos circulantes, não havendo necessidade de punções de medula óssea, as quais são invasivas, de maior custo, e muitas das vezes requerem procedimento cirúrgico e anestesia. WASP poderia ser avaliado por PCR em tempo real ou mesmo por citometria de fluxo.

Embora nossos resultados não revelem toda regulação e processos envolvidos na supressão de WASP, nós alcançamos respostas importantes quanto a esse fenômeno. O fato de um Bcr-Abl deficiente de sua função quinase (Bcr-Abl KR) não ser capaz de suprimir WASP na

linhagem Jurkat indica que a fosforilação de algum (ou alguns) alvo em resíduos de tirosina é um evento importante na indução do silenciamento de WASP (Figura 10). Em contrapartida, o tratamento com Imatinibe não recuperou a expressão de WASP, indicando que, uma vez silenciado, a atividade tirosina quinase não é mais necessária para manter WASP suprimido (Figura 11). Ao mostrarmos que o promotor de WASP é metilado em uma linhagem Bcr-Abl positiva, nós mostramos, pela primeira vez, que WASP é passível deste tipo de regulação. Este mecanismo epigenético de silenciamento é estável, o que explicaria o fato de o tratamento com Imatinibe não recuperar WASP nas linhagens celulares testadas. Bcr-Abl poderia então fosforilar alvos, ativando vias que culminem na metilação das ilhas CpG no promotor proximal de WASP. Por ser um evento estável, mesmo bloqueando o domínio quinase da oncoproteína, WASP não poderia ser recuperado.

Alguns elementos de nossos resultados nos indicaram que a metilação do promotor de WASP pode não ser o único mecanismo envolvido em sua supressão. A linhagem KCL22 exibiu níveis transcricionais e protéicos de WASP diminuídos, mas detectáveis (Figura 8), da mesma forma que a transcrição do gene WASP foi reduzida, mas não bloqueada em Jurkat.BA (Figura 9). É possível que Bcr-Abl induza a supressão de WASP por mecanismos diversos, dependendo do contexto intracelular.

Mais que um marcador, devido à sua importância para as células hematopoiéticas, nós acreditamos que o silenciamento de WASP não seria um evento sem relevância, sem consequência biológica. Para investigar essa questão nós recuperamos WASP em K562 por infecções lentivirais, obtendo K562 WASP *low* e K562 WASP *high* (Figura 13). Bcr-Abl provoca o quadro de LMC alterando três funções celulares centrais: proliferação, resistência à morte celular e adesão [65]. Após diferentes abordagens, nós concluímos que recuperação de WASP não modificou o padrão de proliferação das células leucêmicas (Figura 16), mas se opôs à principal característica tumorigênica das células Bcr-Abl-positivas: a forte resistência a apoptose. Além de morrerem mais em cultura por um processo de apoptose espontânea (Figura 17), K562 expressando WASP tornou-se mais sensível à apoptose induzida por diferentes quimioterápicos (Figura 18), e de maneira especial, ao Imatinibe, a principal droga usada no tratamento de pacientes com LMC (Figura 19). Esse dado abre um leque de discussões e possibilidades, pois sugere que células leucêmicas que expressam WASP morrem mais sob a administração do Imatinibe. Isso sugeriria que pacientes LMC que preservam a expressão de

WASP em suas células leucêmicas poderiam responder melhor ao tratamento com Imatinibe, pois tais células seriam mais sensíveis e morreriam mais facilmente, permitindo uma remissão da doença.

Uma célula pode ser sensibilizada a apoptose por diferentes formas, sendo todas elas baseadas na complexa rede molecular que regula este processo de morte. Aumento da expressão de membros pró-apoptóticos ou diminuição dos anti-apoptóticos da família Bcl-2; aumento da expressão de receptores e ligantes de morte; diminuição da expressão de inibidores da via extrínseca, como FLIP [66]. Uma vez que WASP jamais foi descrito como um regulador da maquinaria molecular de morte, nós investigamos as diferentes possibilidades (Figura 20). Desde 1998 é sabido que a super expressão de Bcl-XL induzida por Bcr-Abl é uma das principais responsáveis pela forte resistência a apoptose observada nas células leucêmicas [67]. Bcl-XL previne a apoptose induzida pela via intrínseca (mitocondrial), tornando a célula resistente a radiações ou drogas que promovam quebra do DNA ou parada de transcrição, por exemplo. De maneira interessante, nossos dados mostraram que a recuperação de WASP em K562 diminuiu os níveis de transcrição do gene anti-apoptótico Bcl-XL (Figura 20), podendo este fato estar relacionado com o aumento de susceptibilidade das células leucêmicas frente à radiação U.V, tratamento com Camptotecina (que promove inativação de topoisomerasas e subsequente quebra do DNA), e também frente ao Imatinibe. Sendo Bcl-XL um elemento-chave na biologia da LMC, prevenindo a apoptose induzida pela via intrínseca, nossos dados sugerem que a supressão de WASP, por conter a super expressão de Bcl-XL, pode ser importante para o desenvolvimento da doença.

Após recuperarmos WASP, nós observamos que o ligante de morte TRAIL, bem como seus receptores DR4 e DR5 passaram a ser expressos em K562 (Figura 21). Apesar de não termos conseguido investigar o mecanismo pelo qual WASP induziu a expressão desses genes, nós mostramos que esse fenômeno era fundamental para a susceptibilidade à apoptose induzida por WASP na célula leucêmica. Após bloquearmos a ação de TRAIL pelo uso do competidor antagonista TRAIL-R2-Fc, a taxa de morte celular foi reduzida aos níveis do grupo controle (Figura 22).

O fato de a re-expressão de WASP aumentar os níveis de TRAIL é intrigante, visto que nosso grupo publicou recentemente uma nova regulação deste gene, onde PRAME é responsável por induzir metilação de regiões do promotor do gene TRAIL, levando ao seu

silenciamento em células Bcr-Abl-positivas [68]. Considerando nossos dados de WASP e nossos achados publicados no referido artigo, é possível que WASP interfira com esse fenômeno de metilação do promotor de TRAIL, permitindo sua expressão. Deixamos em aberto várias possibilidades que pretendemos investigar futuramente, como a interação de WASP com PRAME ou outras moléculas do complexo que medeia a metilação, ou ainda a modulação da expressão dessas moléculas por WASP.

Nas entrelinhas de nossos resultados encontram-se informações relevantes. A recuperação de WASP induz super expressão de DR4 e DR5, o que tornaria a célula leucêmica mais susceptível ao ataque de células NK do sistema imune, as quais usam de TRAIL como molécula matadora [69, 70]. Mas, além disso, ao haver super expressão do próprio TRAIL, as células leucêmicas passam a ser capazes de matarem umas às outras no ambiente tumoral na medula óssea. É descrito que a ligação TRAIL/DR torna a célula alvo mais sensível a apoptose induzida por Imatinibe [71], o que está em total acordo com nossos dados. Acreditamos que WASP contribui para a expressão de TRAIL e seus receptores de morte, induzindo a célula à morte espontânea observada em cultura, sensibilizando a célula leucêmica a apoptose induzida por Imatinibe e ainda tornando-as alvo do ataque de células NK do sistema imunológico.

Até o momento, nossos dados colocam a molécula WASP em uma posição delicada, embora desafiadora, no contexto de LMC e Bcr-Abl, atuando como um *tumor suppressor-like*, ou um inibidor endógeno, ao se contrapor a mais forte molécula anti-apoptótica já descrita: o Bcr-Abl. Mas qual seria o mecanismo molecular por trás desse efeito? Uma vez que a atividade tirosina-quinase de Bcr-Abl é essencial para o desenvolvimento da LMC [14], nós investigamos se WASP poderia estar modulando a capacidade da oncoproteína de fosforilar seus alvos. De maneira interessante, a re-expressão de WASP em K562 modificou o padrão de fosforilação em resíduos de tirosina induzido por Bcr-Abl (Figura 23A). Sabe-se que a ativação de Bcr-Abl inicia-se com sua auto-fosforilação na tirosina 177 [72]. Na figura 23A podemos observar que Bcr-Abl está diferencialmente fosforilado quando K562 expressa WASP. A mesma variação é notável nos demais alvos de Bcr-Abl que são fosforilados em tirosina. Esse dado indica que a presença de WASP na célula leucêmica altera a atividade de Bcr-Abl. A pergunta seguinte era inevitável: como WASP estava alterando tal função? Trabalhos têm mostrado que WASP interage fisicamente com proteínas quinase, como Fyn [60], Src quinase [73] e Lck [62]. Esses últimos autores também demonstraram que WASP se liga ao domínio SH1 e inibe a atividade tirosina

quinase de c-Abl. Esse achado foi de grande relevância para nosso trabalho, pois nos conduziu a investigar se WASP poderia interagir e inibir a atividade quinase de Bcr-Abl, funcionando como um supressor de tumor endógeno. Nesse contexto, o silenciamento de WASP seria de extrema importância para os efeitos oncogênicos de Bcr-Abl, podendo ser um elemento determinante para a progressão e gravidade da doença nos pacientes. Nossos experimentos de imunoprecipitação mostraram que WASP interage molecularmente com Bcr-Abl (Figura 23B). Esse dado revela um novo parceiro molecular de Bcr-Abl, e mais que isso, um regulador de Bcr-Abl, podendo esta interação molecular estar diretamente relacionada ao fato de que a presença de WASP na célula leucêmica diminui a resistência a apoptose e prejudica a habilidade tumorigênica de Bcr-Abl. Seguindo essa linha, poderíamos então interpretar o silenciamento de WASP como um possível mecanismo molecular de escape tumoral.

No intuito de fortalecermos ou descartarmos definitivamente essa nova função de WASP, nós testamos sua habilidade anti-tumoral em um modelo murino de tumor sólido subcutâneo, induzido por uma célula Bcr-Abl⁺ [74]. De maneira surpreendente e notável, K562 expressando WASP induziu pequenos ou indetectáveis tumores, com mediana de volume tumoral 10 vezes menor que aqueles induzidos por K562 selvagem. Considerando todos os resultados já discutidos, é possível que as células K562 WASP (ao contrário das K562 selvagens) mostraram-se suscetíveis ao ataque de células NK dos animais (via TRAIL), visto que é o único componente linfocítico presente neste animal. Ou ainda, no micro ambiente tumoral, as células K562 WASP, por expressarem em sua superfície TRAIL, DR4 e DR5, induziram a apoptose das células K562 vizinhas, contendo a progressão tumoral. Em ambos os casos, a mensagem final é idêntica: a expressão de WASP nas células leucêmicas compromete o desenvolvimento da neoplasia, favorecendo o indivíduo hospedeiro.

No intuito de confirmarmos a mensagem acima em nossos pacientes, nós correlacionamos os níveis de WASP com a sobrevida dos indivíduos. De fato, ao associar o grau de silenciamento de WASP com a gravidade da doença dos pacientes na fase acelerada e blástica, testando sua aplicação como possível marcador de gravidade de doença ou de prognóstico, nós vimos que pacientes com supressão discreta de WASP, ou seja, pacientes que preservavam a expressão de WASP, mesmo em baixos níveis, apresentaram sobrevida global maior que indivíduos com profundo silenciamento do gene (Figura 25).

A supressão de WASP não foi validada para nenhuma neoplasia hematológica na literatura (nossos achados são absolutamente pioneiros neste ponto). Entretanto, utilizando a plataforma ONCOMINE, nós encontramos dados de *microarray* revelando diminuídos níveis de WASP em outras leucemias. Esse resultado *in silico* possui dois elementos fundamentais, estando um fortalecendo nossos achados e o outro favorecendo críticas. As conseqüências da diminuição da expressão de WASP investigadas em nosso projeto podem ser observadas em outras leucemias, podendo fazer de WASP um alvo terapêutico não apenas para a LMC. Caso novos estudos corroborem nossos achados, mostrando que a ausência de WASP contribui para a evolução ou tumorigênese, não apenas da LMC, mas de outras leucemias, a recuperação de WASP pode ser discutida de forma mais ampla no universo da onco-hematologia. Contudo, as leucemias mostradas na figura 26 são, em sua maioria, Bcr-Abl negativas, o que significa que a diminuição de WASP pode não ser (apenas, ou sempre) dependente de Bcr-Abl, mas sim de outro elemento presente em comum nas diferentes neoplasias hematológicas. Por acreditarmos na solidez de nossos resultados, afirmamos que Bcr-Abl é o responsável por suprimir WASP na LMC, mas deixamos em aberto a discussão e possibilidade de que, em outros contextos moleculares, WASP poderia ser regulado através de diversos mecanismos, culminando na convergência fenotípica de sua supressão em diferentes tipos de leucemias.

A falta de expressão de WASP (por mutação no gene WASP ou em sua chaperona WIP) acarreta na imunodeficiência Síndrome de Wiskott Aldrich (WAS), visto que essa molécula tem sido descrita como importante para a função de inúmeras células do sistema imune. Células NK de pacientes WAS apresentam *killing* comprometido [49, 75]; macrófagos de pacientes WAS tem fagocitose mediada por IgG impedida [48]; a quimiotaxia de monócitos/macrófagos é comprometida em pacientes WAS, favorecendo infecções recorrentes [76]. Nos dias atuais, a recuperação da expressão de WASP tem sido usada como terapia, ou podemos dizer cura, de pacientes WAS. Células progenitoras CD34⁺ do pacientes são mobilizadas, concentradas e, *in vitro*, são infectadas por lentivirus contendo o gene WASP, recuperando sua expressão nessas células deficientes. Após, os pacientes sofrem uma completa mieloablação e recebem novamente as suas células-tronco hematopoiéticas que reconstituirão a nova medula óssea e o novo sistema imune e hematopoiético, agora com células que expressam WASP. Sendo a recuperação da expressão de WASP viável e segura em humanos, essa abordagem pode ser futuramente discutida para a LMC.

Esta tese produziu mais conhecimento sobre a biologia de WASP, de Bcr-Abl e da LMC. Oferece aos colegas a possibilidade de discutir sobre o uso de WASP como marcador de progressão e evolução da doença, que pode ser usado juntamente com PCR em tempo real para Bcr-Abl no monitoramento da LMC, denunciando evolução e permitindo mudança no protocolo de tratamento precocemente; oferece WASP como um parceiro molecular e um possível inibidor natural de Bcr-Abl; enfim, uma nova peça na complexa rede de moléculas que compõem o cenário da LMC.

6 CONCLUSÕES

A conclusão geral do trabalho é que a expressão de WASP está diminuída na LMC e este evento contribui para a resistência a apoptose conferida por Bcr-Abl e para sua capacidade tumorigênica.

Nosso trabalho produziu dados que levam às seguintes conclusões adicionais:

- Bcr-Abl é o responsável pela supressão da expressão do gene WASP;
- A atividade tirosina quinase de Bcr-Abl parece ser importante para silenciar WASP, mas não para mantê-lo em níveis diminuídos de expressão;
- A metilação de sítios CpG no promotor de WASP é um dos mecanismos envolvidos em seu silenciamento, sendo a primeira vez que tal mecanismo epigenético é descrito regulando este gene;
- A recuperação da expressão de WASP em K562 provoca a diminuição da expressão de Bcl-XL e o aumento de TRAIL e seus receptores DR4 e DR5;
- A recuperação do gene WASP induz apoptose espontânea na linhagem K562 através da via de TRAIL;
- A recuperação de WASP torna K562 mais sensível a apoptose induzida por diferentes drogas, incluindo Mesilato de Imatinibe;
- A re-expressão de WASP em K562 modula negativamente sua habilidade em produzir tumor subcutâneo em modelo murino;
- WASP é capaz de se ligar a Bcr-Abl e modular sua atividade tirosina-quinase;
- Maiores níveis de expressão de WASP correlacionam-se com maior sobrevida global em pacientes LMC tratados com Imatinibe;

REFERÊNCIAS¹

- [1] Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest*. 2010; 120(7):2254-64.
- [2] Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(6):441-53.
- [3] Radich JP. Chronic myeloid leukemia 2010: where are we now and where can we go? *Hematology*. 2010; 2010:122-8.
- [4] Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 1999; 340(17):1330-40.
- [5] Talpaz M. Treatment of CML: thoughts after ASCO 2002. *Med Gen Med*. 2002; 4(4):11.
- [6] Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature reviews*. 2005; 5(3):172-83.
- [7] Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007; 370(9584):342-50.
- [8] Atallah E, Talpaz M, O'brien S, Rios MB, Guo JQ, Arlinghaus R, et al. Chronic myelogenous leukemia in T cell lymphoid blastic phase achieving durable complete cytogenetic and molecular remission with imatinib mesylate (STI571; Gleevec) therapy. *Cancer*. 2002; 94(11):2996-9.
- [9] Clift RA, Storb R. Marrow transplantation for CML: the Seattle experience. *Bone marrow transplantation*. 1996; 17 Suppl 3:S1-3.
- [10] Fausel C. Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure. *J Manag Care Pharm*. 2007; 13(8 Suppl A):8-12.
- [11] Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*. 1993; 75(1):175-85.
- [12] Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G. Autoinhibition of c-Abl. *Cell*. 2002; 108(2):247-59.
- [13] Sadowski I, Stone JC, Pawson T. A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol Cell Biol*. 1986; 6(12):4396-408.
- [14] Zhang X, Ren R. Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1998; 92(10):3829-40.
- [15] Gross AW, Ren R. Bcr-Abl has a greater intrinsic capacity than v-Abl to induce the neoplastic expansion of myeloid cells. *Oncogene*. 2000; 19(54):6286-96.

- [16] Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1995; 15(10):5531-41.
- [17] Carlesso N, Frank DA, Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *Jounal Exp Med*. 1996; 183(3):811-20.
- [18] Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*. 1999; 98(2):181-91.
- [19] Amarante-Mendes GP, Naekyung Kim C, Liu L, Huang Y, Perkins CL, Green DR, et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood*. 1998; 91(5):1700-5.
- [20] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 2000; 407(6805):802-9.
- [21] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998; 282(5392):1318-21.
- [22] Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997; 91(2):231-41.
- [23] Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Develop*. 1999; 13(4):382-7.
- [24] Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *Journal Biol Chem*. 2009; 284(33):21777-81.
- [25] Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature Immunol*. 2009; 10(4):348-55.
- [26] Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998; 94(4):481-90.
- [27] Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998; 94(4):491-501.
- [28] Creagh E, Conroy H, Martin S. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev*. 2003; 193:10-21.
- [29] Wei M, Zong W, Cheng E, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross A, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001; 292(5517):727-30.
- [30] Pereira WO, Amarante-Mendes GP. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? *Scand J Immunol*. 2011; 73(5):401-7.
- [31] Green D. At the gates of death. *Cancer Cell*. 2006; 9(5):328-30.

- [32] Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Annals of internal medicine*. 2003; 138(10):819-30.
- [33] Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, et al. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood*. 1997; 90(12):4947-52.
- [34] Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *New England J Med*. 2006; 355(23):2408-17.
- [35] Cortes J, Hochhaus A, Hughes T, Kantarjian H. Front-line and salvage therapies with tyrosine kinase inhibitors and other treatments in chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011; 29(5):524-31.
- [36] Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001; 293(5531):876-80.
- [37] Gorre ME, Sawyers CL. Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2002; 9(4):303-7.
- [38] Eechoute K, Sparreboom A, Burger H, Franke RM, Schiavon G, Verweij J, et al. Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(3):406-15.
- [39] Wei G, Rafiyath S, Liu D. First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. *J Hematology Oncol*. 3:47.
- [40] Cortes J, Hochhaus A, Hughes T, Kantarjian H. Front-line and salvage therapies with tyrosine kinase inhibitors and other treatments in chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 29(5):524-31.
- [41] Parolini O, Berardelli S, Riedl E, Bello-Fernandez C, Strobl H, Majdic O, et al. Expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene during hematopoietic differentiation. *Blood*. 1997; 90(1):70-5.
- [42] Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*. 1994; 78(4):635-44.
- [43] Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(4):725-38.
- [44] Linder S, Aepfelbacher M. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol*. 2003; 13(7):376-85.
- [45] Calle Y, Chou HC, Thrasher AJ, Jones GE. Wiskott-Aldrich syndrome protein and the cytoskeletal dynamics of dendritic cells. *J Pathol*. 2004; 204(4):460-9.
- [46] Anton IM, Jones GE, Wandosell F, Geha R, Ramesh N. WASP-interacting protein (WIP): working in polymerisation and much more. *Trends Cell Biol*. 2007; 17(11):555-62.

- [47] Delaisse JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Internat J Clin Chem*. 2000: 291(2):223-34.
- [48] Lorenzi R, Brickell PM, Katz DR, Kinnon C, Thrasher AJ. Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood*. 2000: 95(9):2943-6.
- [49] Krzewski K, Chen X, Orange JS, Strominger JL. Formation of a WIP-, WASp-, actin-, and myosin IIA-containing multiprotein complex in activated NK cells and its alteration by KIR inhibitory signaling. *J Cell Biol*. 2006: 173(1):121-32.
- [50] Maillard MH, Cotta-de-Almeida V, Takeshima F, Nguyen DD, Michetti P, Nagler C, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007: 204(2):381-91.
- [51] Hagemann TL, Mares D, Kwan S. Gene regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and the human homolog of the *Drosophila* Su(var)3-9: WASP and SUV39H1, two adjacent genes at Xp11.23. *Bioch Biophys Acta*. 2000: 1493(3):368-72.
- [52] Hagemann TL, Kwan SP. The identification and characterization of two promoters and the complete genomic sequence for the Wiskott-Aldrich syndrome gene. *Biochem Biophys Res Communicat*. 1999: 256(1):104-9.
- [53] Perrotti D, Cesi V, Trotta R, Guerzoni C, Santilli G, Campbell K, et al. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nature genetics*. 2002: 30(1):48-58.
- [54] Chang JS, Santhanam R, Trotta R, Neviani P, Eiring AM, Briercheck E, et al. High levels of the BCR/ABL oncoprotein are required for the MAPK-hnRNP-E2 dependent suppression of C/EBPalpha-driven myeloid differentiation. *Blood*. 2007: 110(3):994-1003.
- [55] Calle Y, Carragher NO, Thrasher AJ, Jones GE. Inhibition of calpain stabilises podosomes and impairs dendritic cell motility. *J Cell Science*. 2006: 119(Pt 11):2375-85.
- [56] Ramesh N, Anton IM, Hartwig JH, Geha RS. WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Nat Acad Sciences*. 1997: 94(26):14671-6.
- [57] Konno A, Kirby M, Anderson SA, Schwartzberg PL, Candotti F. The expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is dependent on WASP-interacting protein (WIP). *Internat Immunol*. 2007: 19(2):185-92.
- [58] de la Fuente MA, Sasahara Y, Calamito M, Anton IM, Elkhali A, Gallego MD, et al. WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proceed Nat Acad Sciences*. 2007: 104(3):926-31.
- [59] Rivero-Lezcano OM, Marcilla A, Sameshima JH, Robbins KC. Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol*. 1995: 15(10):5725-31.
- [60] Banin S, Truong O, Katz DR, Waterfield MD, Brickell PM, Gout I. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is a binding partner for c-Src family protein-tyrosine kinases. *Curr Biol*. 1996: 6(8):981-8.

- [61] Scott MP, Zappacosta F, Kim EY, Annan RS, Miller WT. Identification of novel SH3 domain ligands for the Src family kinase Hck. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), WASP-interacting protein (WIP), and ELMO1. *J Biol Chem*. 2002; 277(31):28238-46.
- [62] Schulte RJ, Sefton BM. Inhibition of the activity of SRC and Abl tyrosine protein kinases by the binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Biochemistry*. 2003; 42(31):9424-30.
- [63] Marin D, Milojkovic D, Olavarria E, Khorashad JS, de Lavallade H, Reid AG, et al. European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood*. 2008; 112(12):4437-44.
- [64] Roman J, Alvarez MA, Torres A. Molecular basis for therapeutic decisions in chronic myeloid leukemia patients after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica*. 2000; 85(10):1072-82.
- [65] Chavez-Gonzalez MA, Ayala-Sanchez M, Mayani H. [Chronic myeloid leukemia in the 21st century: biology and treatment]. *Rev de Invest Clin*. 2009; 61(3):221-32.
- [66] Park SJ, Kim MJ, Kim HB, Kang CD, Kim SH. Sensitization of imatinib-resistant CML cells to TRAIL-induced apoptosis is mediated through down-regulation of Bcr-Abl as well as c-FLIP. *Biochem J*. 2009; 420(1):73-81.
- [67] Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, Green DR. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene*. 1998; 16(11):1383-90.
- [68] De Carvalho DD, Binato R, Pereira WO, Leroy JM, Colassanti MD, Proto-Siqueira R, et al. BCR-ABL-mediated upregulation of PRAME is responsible for knocking down TRAIL in CML patients. *Oncogene*. 30(2):223-33.
- [69] Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL, Vujanovic NL. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol*. 1999; 163(10):5358-66.
- [70] Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, et al. NK cells and cancer. *J Immunol*. 2007; 178(7):4011-6.
- [71] Hamai A, Richon C, Meslin F, Faure F, Kauffmann A, Lecluse Y, et al. Imatinib enhances human melanoma cell susceptibility to TRAIL-induced cell death: Relationship to Bcl-2 family and caspase activation. *Oncogene*. 2006; 25(58):7618-34.
- [72] Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, et al. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer cell*. 2002; 1(5):479-92.
- [73] Okabe S, Fukuda S, Broxmeyer HE. Activation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and its association with other proteins by stromal cell-derived factor-1alpha is associated with cell migration in a T-lymphocyte line. *Exp Hematol*. 2002; 30(7):761-6.
- [74] Iqbal Ahmed CM, Johnson DE, Demers GW, Engler H, Howe JA, Wills KN, et al. Interferon alpha2b gene delivery using adenoviral vector causes inhibition of tumor growth in xenograft models from a variety of cancers. *Cancer Gene Therapy*. 2001; 8(10):788-95.

[75] Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E, Sasahara Y, Koopman L, Byrne M, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proceed Nat Acad Sciences*. 2002; 99(17):11351-6.

[76] Tsuboi S. A complex of Wiskott-Aldrich syndrome protein with mammalian verprolins plays an important role in monocyte chemotaxis. *J Immunol*. 2006; 176(11):6576-85.