UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão de microRNAs em células Bcr-Abl1 positivas: associação com a resistência à
apoptose e fisiopatologia da Leucemia Mielóide Crônica**

Aline Fernanda Ferreira

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão de microRNAs em células Bcr-Abl1 positivas: associação com a resistência à
apoptose e fisiopatologia da Leucemia Mielóide Crônica**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.**

**Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.**

**Orientada: Aline Fernanda Ferreira
Orientadora: Fabíola Attié de Castro**

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ferreira , Aline Fernanda

Expressão de microRNAs em células Bcr-Abl1 positivas: associação com a resistência à apoptose e fisiopatologia da Leucemia Mielóide Crônica. Ribeirão Preto, 2012.

79 p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Fabíola Attié de Castro

1. Leucemia Mielóide Crônica; 2. Bcr-Abl; 3. microRNA;
4. Apoptose, 5. Inibidores de tirosinoquinase

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Aline Fernanda Ferreira

Título do trabalho: Expressão de microRNAs em células Bcr-Abl1 positivas: associação com a resistência à apoptose e fisiopatologia da Leucemia Mielóide Crônica.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Fabíola Attié de Castro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta conquista...

Ao meu pai Waldyr (in memoriam) com amor, respeito, saudade e gratidão pelos ensinamentos a mim transmitidos no tempo em que vivemos juntos. Um homem honesto e solidário, certamente o meu maior mestre, com quem aprendi que ser é muito mais importante que ter. À minha mãe Ivone por ter dedicado sua vida à educação dos filhos, pelo incentivo aos estudos e por ter me ensinado os valores da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proteger todos os dias, pela luz que sempre guiou meu caminho, pela minha determinação e sabedoria, pelas minhas conquistas ao longo da vida, por estar comigo nos momentos de aflição e de alegria e, principalmente por mostrar-me que com fé tudo é possível.

Agradeço com muito carinho e profundo respeito aos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto que com esperança na ciência e olhos brilhantes em busca da cura, confiaram a mim a coleta de amostras de sangue para o desenvolvimento deste trabalho. Sem a colaboração e solidariedade destas pessoas, não seria possível finalizar este estudo.

Agradeço aos doadores de sangue do Hemocentro por doarem amostras para a formação do grupo controle, cuja análise é muito importante no presente trabalho.

Muito obrigada à minha orientadora Prof.Dra.Fabíola Attié de Castro pelos ensinamentos, amizade, disponibilidade, paciência, incentivo e por ajudar-me a traçar este caminho.

Obrigada Prof.Dra.Simone Kashima por me aceitar no laboratório de biologia molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela amizade, pelo incentivo diário e pelos ensinamentos ao longo do mestrado e doutorado.

Agradeço ao Prof.Dr.Dimas Tadeu Covas diretor-presidente do Hemocentro de Ribeirão Preto por permitir o desenvolvimento dos meus projetos de mestrado e doutorado dentro desta instituição.

Obrigada ao Prof.Dr.George Calin pela oportunidade concedida para que eu fizesse estágio em seu laboratório no MD Anderson Cancer Center – Houston – EUA.

Agradeço às amigas do laboratório de hematologia da FCFRP: Raquel, Elaine, Luciana, Natália e Sandra pela ajuda fornecida sempre que necessário. Muito obrigada, Livia, pela companhia e ajuda nos árduos dias de ambulatório no Hospital das Clínicas.

Obrigada às funcionárias do laboratório de biologia molecular do Hemocentro: Evandra e Virgínia, e a todos os alunos deste grupo de pesquisa pelos ensinamentos, amizade, companheirismo e bons momentos.

Obrigada a todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Hemocentro de Ribeirão Preto que de alguma forma participaram do desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada à minha mãe Ivone pela educação a mim concedida e por ter sido um espelho na formação do meu caráter e valores; à minha irmã Silvia pelo constante apoio e incentivo; por mostrar-me o lado positivo nos dias difíceis e por compartilhar meus dias alegres. Agradeço ao meu irmão Eduardo pelo carinho e por ajudar-me sempre que necessário.

Às minhas amigas Gislane, Fernanda, Paula, Lucila e Mariana muito obrigada pela amizade, cumplicidade e por compartilharem alegrias e angústias da vida de pós-graduação. Vocês fazem com que minha vida em Ribeirão seja leve e divertida.

"Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!"

Chico Xavier

RESUMO

FERREIRA, A. F. **Expressão de microRNAs em células Bcr-Abl1 positivas: associação com a resistência à apoptose e fisiopatologia da Leucemia Mielóide Crônica.** 2012. 79 folhas. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa resultante da expansão clonal da célula hematopoética precursora. Sua fisiopatologia está associada ao cromossomo (cr) Philadelphia (Ph) originado da t(9;22) e ao oncogene *bcr-abl1* que codifica a proteína Bcr-Abl1 com constitutiva atividade de tirosinoquinase (TK). A expressão de Bcr-Abl determina a leucemogênese por meio da alteração da adesão das células progenitoras leucêmicas ao estroma medular e resistência à apoptose. Os inibidores de TK, o mesilato de imatinibe, dasatinibe e nilotinibe são utilizados no tratamento da LMC, entretanto, casos de resistência têm sido relacionados à presença de mutações em Bcr-Abl1, duplicação do cr Ph e superexpressão do gene *bcr-abl1*. A resistência ou refratariedade de alguns pacientes ao tratamento com inibidores de TK impulsiona a realização de estudos para melhor conhecimento da fisiopatologia da LMC e descrição de novos alvos terapêuticos. Nesse contexto, o presente estudo investigou a participação de microRNAs na modulação da expressão de genes que regulam a apoptose. O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito de *bcr-abl1* e da atividade tirosinoquinase de Bcr-abl na expressão desses miRNAs em linhagens celulares e pacientes com LMC. O RNA das linhagens celulares, de pacientes e controles foram obtidos por meio da extração com Trizol[®] e o cDNA sintetizado com o *kit High Capacity cDNA reverse transcription*. A expressão dos microRNAs e dos genes alvos foi quantificada por PCR em tempo real utilizando o kit SYBR Green PCR Master Mix[®] e TaqMan Universal PCR Master Mix[®]. A inibição de Bcr-Abl1 na linhagem HL-60. Bcr-Abl1 tratada com o mesilato de imatinibe aumentou a expressão de miR-let-7d, miR-15a, miR-130a e miR-145 e diminuiu os níveis de miR-21. O tratamento com dasatinibe aumentou a expressão de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-30e, miR-130a e miR-142-3p. O nilotinibe aumentou a expressão de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-130a e miR-145 e, diminuiu os níveis de miR-let-7d e miR-21. Os resultados obtidos da análise entre os de pacientes com LMC em diferentes fases da doença mostraram elevados níveis de miR-15a, miR-130b e miR-145 em pacientes na fase crônica *versus* controles e baixos níveis de miR-16, miR-26a e miR-146a. Pacientes em fases avançadas *versus* controles apresentaram baixa expressão de miR-let-7d, miR-16, miR-142-3p, miR-145 e miR-146a. Baixos níveis de miR-let-7d, miR-15a, miR-16, miR-29c, miR-142-3p, miR-145 e miR-146a foram observados nas fases avançadas da LMC em relação a fase crônica. Os genes anti-apoptóticos *al*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1* e *ciap-2* estavam mais elevados na fase crônica do que nos controles. A expressão do gene *c-flip* estava diminuída e dos genes *al*, *ciap-1* e *mcl-1* aumentada nas fases avançadas em relação aos controles e a fase crônica. Pacientes com LMC resistentes ao MI apresentaram menores níveis de miR-26a, miR-29c, miR-130b, miR-146a e dos genes anti-apoptóticos *ciap-1* e *mcl-1*. Os dados obtidos sugerem que a TK Bcr-Abl modula a expressão de microRNAs que possuem como alvos genes que regulam a apoptose celular.

Palavras-chave: Leucemia Mielóide Crônica; Bcr-Abl; microRNA; Apoptose e Inibidores de tirosinoquinase.

ABSTRACT

FERREIRA, A. F. **MicroRNA expression in Bcr-Abl1 positive cells: association with apoptosis resistance and Chronic Myeloid Leukemia physiopathology.** 2012. 79 folhas. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disease resulting from clonal expansion of hematopoietic precursor cells. Its physiopathology is associated to Philadelphia (Ph) chromosome (cr) originated from the t(9;22) and *bcr-abl1* oncogene that encodes the Bcr-Abl protein with constitutive tyrosine kinase activity (TK). The Bcr-Abl1 expression determines leukemogenesis by altering the leukemic progenitor cells' adhesion by bone marrow stroma and apoptosis resistance. TK inhibitors imatinib mesylate, dasatinib and nilotinib are used to treat CML, however, cases of resistance have been linked to mutation in Bcr-Abl1, duplication of the cr Ph and overexpression of the *bcr-abl1*. The resistance or refractoriness of some patients to treatment with TK inhibitors drives the studies to better understand the CML physiopathology and description of new therapeutic targets. In this context, this study investigated the participation of microRNAs in modulating expression of the genes that regulate apoptosis. The aim of this study was to investigate the effect of Bcr-Abl1 and its kinase activity in the expression of miRNAs in cell lines and CML patients. The RNA from cell lines, patients and controls were obtained by extraction with Trizol[®] and cDNA was synthesized with the *kit High Capacity cDNA reverse transcription*. The expression of miRNAs and target genes was quantified by real time PCR using SYBR Green PCR Master Mix[®] kit and TaqMan Universal PCR Master Mix[®]. The Bcr-Abl1 inhibition in the cell line HL-60.Bcr-Abl1 treated with imatinib mesylate increased the expression of miR-let-7d, miR-15a, miR-130a and miR-145 and decreased miR-21 levels. Treatment with dasatinib increased the expression of miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-30e, miR-130a and miR-142-3p. Nilotinib increased the expression of miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-130a and miR-145 and, decreased miR-let-7d and miR-21 levels. The results of the analysis among patients with CML in different stages of disease showed high levels of miR-15a, miR-130b and miR-145 in chronic phase versus controls and low levels of miR-16, miR-26a and miR-146a. Patients in advanced phases versus controls showed low expression of miR-let-7d, miR-16, miR-142-3p, miR-145 and miR-146a. Low levels of miR-let-7d, miR-15a, miR-16, miR-29c, miR-142-3p, miR-145 and miR-146a were observed in CML advanced phases when compared with chronic phase. The antiapoptotic genes *a1*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1* and *ciap-2* were higher in chronic phase than in controls. The *c-flip* expression was decreased and *a1*, *ciap-1* and *mcl-1* expression was increased in advanced phases when compared to controls and chronic phase. CML patients resistant to imatinib mesylate presented low levels of miR-26a, miR-29c, miR-130b, miR-146a and *ciap-1* and *mcl-1* antiapoptotic genes. The data obtained suggest that Bcr-Abl1 TK modulates the miRNA expression which has target genes involved in the apoptosis' regulation.

Keywords: Chronic myeloid leukemia; Bcr-Abl; microRNA, Apoptosis and Tyrosine Kinase Inhibitors.

RESUMEN

FERREIRA, A. F. **Expresión de microARNs en células BCR-ABL1 positivas: asociación con la resistencia a la apoptosis y la fisiopatología de la leucemia mieloide crónica.** 2012. 79 hojas. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un trastorno mieloproliferativo que resulta de la expansión clonal de células precursoras hematopoyéticas. Su fisiopatología está ligada al cromosoma (cr) Filadelfia (Ph) originado de la t (9, 22) y del oncogén BCR-ABL, que codifica la proteína BCR-ABL1 con actividad constitutiva de tirosina cinasa (TC). La expresión de Bcr-Abl determina la leucemogénesis mediante la alteración en la adhesión de las células progenitoras leucémicas al estroma de la médula ósea y la resistencia a la apoptosis. Los inhibidores de TC, como el mesilato de imatinibe, dasatinibe y nilotinibe, se usan para tratar la LMC; sin embargo, los casos de resistencia se han relacionado con mutaciones en BCR-ABL1, la replicación del cr Ph y la superexpresión del gen BCR-ABL1. La resistencia o refractariedad de algunos pacientes al tratamiento con inhibidores de TC impulsa los estudios para comprender mejor la fisiopatología de la LMC y la descripción de nuevos blancos terapéuticos. En este contexto, este estudio investigó la participación de microARNs en la modulación de la expresión de los genes que regulan la apoptosis. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de BCR-ABL1 y la actividad de la tirosina cinasa Bcr-Abl en la expresión de estos microARNs en líneas celulares y en pacientes con LMC. El ARN de las líneas celulares, de los pacientes y de los controles se obtuvo por extracción con Trizol® y el cADN se sintetizó con el *kit High Capacity cDNA reverse transcription*. La expresión de los microARNs y los genes diana se cuantificó por PCR en tiempo real utilizando el *kit SYBR Green PCR Master Mix®* e *TaqMan Universal PCR Master Mix®*. La inhibición de la BCR-ABL1 en la línea HL-60.Bcr-Abl1 tratada con mesilato de imatinibe aumentó la expresión de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-130a e miR-145, y disminuyó los niveles de expresión de miR-let-7d y miR-21. El tratamiento con dasatinibe aumentó la expresión de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-30e, miR-130a e miR-142-3p. El nilotinibe aumentó la expresión de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-130a e miR-145, y disminuyó los niveles de expresión de miR-let-7d y miR-21. Los resultados del análisis entre los pacientes con LMC en diferentes etapas de la enfermedad mostraron expresión de altos niveles de miR-15a, miR-130b y miR-145 en la fase crónica en comparación con los controles, y bajos niveles de miR-16, miR-26a y miR-146a. Los pacientes en estadios avanzados, frente a los controles, mostraron una baja expresión de miR-let-7d, miR-16, miR-142-3p, miR-145 y miR-146a. Niveles bajos de miR-let-7d, miR-15a, miR-16, miR-29c, miR-142-3p, miR-145 y miR-146a fueron observados en las etapas avanzadas de la LMC en relación a la fase crónica. Los genes anti-apoptóticos *al*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1* y *ciap-2* fueron encontrados más elevados en la fase crónica que en los controles. La expresión del gen *c-flip* fue encontrada reducida y la de los genes *al*, *ciap-1* e *mcl-1* aumentada en estadios avanzados, en comparación con los controles y con la fase crónica. Los pacientes con LMC resistentes a IM tenían niveles más bajos de miR-26a, miR-29C, miR-130b, miR-146a y de los genes anti-apoptóticos *ciap-1* e *mcl-1*. Los datos obtenidos sugieren que la TC Bcr-Abl modula la expresión de microARNs que tienen por blanco genes que regulan la apoptosis.

Palabras clave: leucemia mieloide crónica, Bcr-Abl, microARN, inhibidores de la apoptosis y tirosina cinasa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de microRNAs hiperexpressos por cromossomo.	24
Figura 2. Distribuição de microRNAs hipoexpressos por cromossomo.	25
Figura 3. Expressão de microRNAs nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl.	28
Figura 4. Expressão de microRNAs na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 tratada com mesilato de imatinibe (MI), dasatinibe (DAS) e nilotinibe (AMN). As células foram incubadas por 4 e 8 horas com 10 μ M de MI e 5 nM de DAS e 5 nM de NIL.	31
Figura 5. Amostras 1, 2 e 3 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com MI nos tempos 0, 4h e 8h. Amostras 4, 5 e 6 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com dasatinibe nos tempos 0, 4h e 8h e amostras 7, 8 e 9 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com nilotinibe nos mesmos tempos. A proteína tubulina está representada pelas bandas de 48kDa. M = marcador de peso molecular.	34
Figura 6. Amostras 1, 2 e 3 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com MI nos tempos 0, 4h e 8h. Amostras 4, 5 e 6 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com dasatinibe nos tempos 0, 4h e 8h e amostras 7, 8 e 9 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com nilotinibe nos mesmos tempos. A proteína tubulina está representada pelas bandas de 48kDa. M = marcador de peso molecular.	34
Figura 7. Expressão de microRNAs no grupo controle e em pacientes com LMC em diferentes fases da doença. C=controle; FC=fase crônica; FA=fase avançada. A linha horizontal representa a mediana de expressão de microRNA de cada grupo.	36
Figura 8. Expressão de <i>a1</i> , <i>bcl-2</i> , <i>c-flip</i> , <i>ciap-1</i> , <i>ciap-2</i> e <i>mcl-1</i> no grupo controle e em pacientes com LMC nas diferentes fases da doença. A linha horizontal representa a mediana de expressão do microRNA de cada grupo.	38
Figura 9. Expressão de microRNAs em pacientes com leucemia mielóide crônica com resposta citogenética completa (RCC) e resistentes (R) ao mesilato de imatinibe. A linha horizontal representa a mediana de expressão do microRNA de cada grupo.	39
Figura 10. Expressão de <i>ciap-1</i> e <i>mcl-1</i> em pacientes com leucemia mielóide crônica com resposta citogenética completa (RCC) e resistentes (R) ao mesilato de imatinibe. A linha horizontal representa a mediana de expressão gênica de cada grupo.	40
Figura 11. Expressão dos genes anti-apoptóticos <i>a1</i> , <i>bcl-2</i> , <i>ciap-2</i> e <i>mcl-1</i> em relação ao perfil de expressão de miR-let7d, miR-16, miR-26a e miR-29c em pacientes com LMC. C= grupo controle; FC=pacientes em fase crônica; FA=pacientes em fase avançada.	42
Figura 12. Vias de sinalização da apoptose, miRNAs e genes alvos. As setas vermelhas para cima indicam genes hiperexpressos e as setas vermelhas que indicam para baixo, hipoexpressos.	43
Figura 13. Vias de sinalização da apoptose, miRNAs e genes alvos. As setas vermelhas para baixo indicam genes hipoexpressos.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos dos pacientes, fase da doença e resposta ao tratamento com MI.	13
Tabela 2. Dados demográficos do grupo controle.	15
Tabela 3. <i>Primers</i> e sondas presentes no painel de detecção de miRNAs.	18
Tabela 4. Seqüências dos oligonucleotídeos, temperatura de anelamento (TA) e tamanho do produto amplificado.	20
Tabela 5. microRNAs hiperexpressos na HL-60.Bcr-Abl1, respectivos genes alvos, <i>fold change</i> e localizações cromossômicas.	23
Tabela 6. microRNAs hipoexpressos na linhagem HL-60.Bcr-Abl1, genes alvos, <i>fold change</i> e localizações cromossômicas.	24
Tabela 7. Vias de sinalização e processos biológicos nos quais estão envolvidos os miRNAs diferencialmente expressos nas células Bcr-Abl1 ⁺	26
Tabela 8. Representação esquemática da alteração da expressão de microRNAs após o tratamento de HL-60.Bcr-Abl1 com os inibidores de TK IM, DAS e NIL.	33
Tabela 9. Representação esquemática da expressão de microRNAs no grupo controle e nas diferentes fases da LMC.	37
Tabela 10. Representação esquemática da expressão dos genes anti-apoptóticos no grupo controle e nas diferentes fases da LMC.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL: Abelson tirosinoquinase
 Akt: *AKT8 virus oncogene cellular homolog*
 APAF-1: *apoptotic protease activating factor 1*
 ATRA: ácido transretinóico
 A1, Bcl-x_L, c-flip, Mcl-1: proteínas anti-apoptóticas
 Bad, Bak, Bax, Bcl-w, Bid, Bim: proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2
 BCR: *break point cluster region*
 DAS: dasatinibe (BMS)
 BSA: *bovine serum albumin*, soro albumina bovina
 C: caucasiano
 Caspase: *cysteine proteases with aspartate specificity*
 cDNA: *complementary desoxyribonucleic acid*
 CD34⁺: *Cluster of Differentiation 34*
 c-Kit: CD117 – kit, *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*
 cr: cromossomo
 c-MYC: *avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog*
 Bcl-2: *B cell lymphoma-2*
 ciap-1 e ciap-2: *cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2*
 Diablo: *direct IAP binding protein with low pI*
 DNA: *deoxyribonucleic acid*
 E2F1-3: fator de transcrição E2F1-3
 F: sexo feminino
 FADD: *Fas-associated protein with death domain*
 Fas: *TNF superfamily receptor 6*
 FasL: *fas ligand*
 FA: fases avançadas da LMC (fase acelerada e crise blástica)
 FC: fase crônica da LMC
 fc: *fold change*
 HLA: *human leukocyte antigen*
 IAP: *inhibitor of apoptosis protein*
 GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
 GSK3β: *glycogen synthase kinase 3 beta*

HTLV-1: *human T-cell leukemia virus 1*

kCal/Mol: quilocaloria por mol

kDa: kiloDaltons

LLA-B Ph⁺: Leucemia Linfoide Aguda subtipo B Philadelphia positiva

LLC: Leucemia Linfoide Crônica

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

LMC: Leucemia Mieloide Crônica

LPS: lipopolissacarídeo

M: sexo masculino

mA: miliampère

MAPK: mitogen-activated protein kinase

Mcl-1: *mantle cell lymphoma 1*

Mfe: *minimum free energy*

MI: mesilato de imatinibe

mRNA: *messenger ribonucleic acid*

miRanda, microRNA.org, TargetScan, DIANA-microT, RNA22 e PITA: programas nos quais utilizamos os algoritmos de predição dos alvos de microRNAs

mTor: *mammalian Target of Rapamycin*

ng: nanograma

NC: não-caucasiano

NF- κ B: *fator nuclear KB*

NFI-A: *nuclear factor 1 A*

NIL: nilotinibe

NK: *natural killer*

PCR: *polymerase chain reaction*

PDGF: *platelet-derived growth factor receptors*

Ph: Philadelphia

pH: Potencial hidrogeniônico

PI3K/AKT: Fosfatidilinositol 3 quinase/AKT

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

PVDF: fluoreto de polivinílico

R: pacientes com LMC resistentes ao MI

RAS: *RAt Sarcoma virus*

RAS/RAF/MEK/ERK: *RAt sarcoma virus (RAS)/rapidly accelerated fibrosarcoma(RAF)/mitogen-activated protein kinase (MAP)-extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) kinase*

RCC: remissão citogenética completa

RHC: resposta hematológica completa

RISC: *death-inducing signaling complex*

RMM: resposta molecular maior

RNA: ácido ribonucleico

ROS: Reactive Oxygen Species

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

shRNA: *short hairpin*

SMAC: *second mitochondria-derived activator of caspase*

SMD: Síndrome Mielodisplásica

STAT: transdutor de sinal e ativador da transcrição

TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween-20)

TGF- β : *Transforming growth factor beta*

TIC: *tumor-initiating cells ou células iniciadoras de tumor*

TK: tirosinoquinase

TKI: *tyrosine kinase inhibitor*

TMO: transplante de medula óssea

TNFR1: *tumor necrosis factor receptor superfamily member 1*

TRAIL: *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas.....	vi
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Leucemia Mielóide Crônica	1
I.2. MicroRNAs	3
I.3. Apoptose, Leucemia Mielóide Crônica e miRNAs.....	6
I.4. Identificação Computacional de miRNA	10
II. OBJETIVOS	11
II.1. Objetivo Geral.....	11
II.2. Objetivos Específicos	11
III. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	12
III.1. Pacientes e Controles.....	12
III.2. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico dos pacientes e controles	16
III.3. Extração de RNA e síntese de cDNA das amostras	16
III.4. Linhagens Celulares	17
III.5. Expressão global de microRNAs nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl1	17
III.6. Caracterização funcional dos microRNAs	19
III.7. Seleção dos microRNAs para validação nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl e células de pacientes	19
III.8. Quantificação dos genes alvos por PCR em tempo real	20
III.9. <i>Western blot</i>	20
III.10. Análise estatística	22
IV. RESULTADOS.....	23
IV.1. Análise Global da expressão de microRNAs na linhagem HL-60.Bcr-Abl.....	23
IV.2. Caracterização funcional dos microRNAs por meio de análise de bioinformática.....	25
IV.3. Seleção dos miRNAs para análise de expressão por PCR em tempo real	27

IV.4. Análise da expressão de microRNAs selecionados nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl.....	27
IV.5. Expressão dos microRNAs em HL-60.Bcr-Abl1 tratada com os inibidores de tirosinoquinase.....	29
IV.6. Análise da expressão da proteínas fosfotirosinas e cABL na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 tratada com mesilato de imatinibe, dasatinibe e nilotinibe.....	33
IV.7. Expressão de microRNAs no grupo controle e em pacientes com LMC.....	35
IV.8. Expressão de genes apoptóticos no grupo controle e em pacientes com LMC.....	37
IV.9. Expressão de microRNAs em pacientes em RCC e resistentes ao MI.....	39
IV.10. Expressão de genes apoptóticos em pacientes em RCC e resistentes ao MI	40
IV.11. Relação da expressão gênica dos microRNAs e seus respectivos alvos	40
IV.12. Possível regulação da maquinaria apoptótica por microRNAs nos pacientes com LMC nas diferentes fases da doença	42
IV.13. Possível regulação da maquinaria apoptótica por microRNAs segundo resposta dos pacientes com LMC ao tratamento com mesilato de imatinibe	44
V. DISCUSSÃO	45
V.1. Oncoproteína Bcr-Abl1 modula a expressão de microRNAs.....	45
V.2. Perfil de expressão de microRNAs e genes alvos na LMC	48
V.3. Perfil de expressão de genes anti-apoptóticos na LMC.....	57
V.4. Perfil de expressão de microRNAs e genes anti-apoptóticos conforme resposta dos pacientes à terapia com mesilato de imatinibe	62
VI. CONCLUSÕES	66
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICES	78
APÊNDICE A: microRNAs igualmente expressos nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl.	78
APÊNDICE B: Resultados não-significantes da análise de genes anti-apoptóticos em pacientes tratados com mesilato de imatinibe (MI).....	79
ANEXOS	

I. INTRODUÇÃO

I.1. Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa, resultante da expansão clonal da célula hematopoética precursora (MELO et al., 2007). A LMC foi a primeira doença clonal maligna descrita relacionada a processo de leucemogênese associado a uma anormalidade citogenética característica, o cromossomo (cr) Philadelphia (Ph), descrito em 1960 por Nowel e Hungerford. Esse marcador citogenético origina-se de uma translocação recíproca entre os cr 9 e 22, culminando com o aparecimento do neogene *bcr-abl1* (DEININGER et al., 2000). O *bcr-abl1* codifica a proteína Bcr-Abl que apresenta elevada e constitutiva atividade enzimática de tirosina-quinase (TK). A expressão de Bcr-Abl determina a transformação da célula progenitora hematopoética normal em maligna, por meio de três mecanismos principais: alteração da adesão das células progenitoras ao estroma medular e à matriz extracelular, manutenção de sinal mitogênico constante e indução de resistência à apoptose (DEININGER et al., 2000). Dessa forma, a célula progenitora escapa da regulação de seu processo de proliferação, recebe sinal de ativação mitogênica constante por meio da via RAS e MAP-Kinases e torna-se resistente à apoptose. Estas alterações nos mecanismos reguladores da proliferação e morte da célula progenitora e diferenciadas culminam com o acúmulo de células leucêmicas Bcr-Abl positivas encontradas na LMC (PERROTI et al., 2007).

A LMC apresenta curso trifásico, possuindo estágios de evolução distintos: fases crônica, acelerada e blástica. Na fase crônica grande parte dos pacientes é assintomática ou apresenta sinais e sintomas inespecíficos, tais como fadiga, anorexia, cansaço e sudorese. A fase acelerada pode surgir em meses ou anos depois do diagnóstico da doença, dependendo da resposta do paciente ao tratamento instituído na fase crônica. A fase blástica caracteriza-se pelo aumento de blastos (>20%) na medula óssea e sangue periférico, leucocitose, anemia e trombocitopenia (FADERL et al., 1999; HEHLMANN et al., 2007). Nessa fase, ocorre falha na maturação dos precursores mielóides malignos, que freqüentemente possuem alterações citogenéticas adicionais, o que gera a agudização da LMC (HEANEY et al., 2007; COTTA e BUESO-RAMOS, 2007). Apesar dos conhecimentos sobre o papel de Bcr-Abl na transformação celular, os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelo aparecimento e progressão da doença para as fases acelerada e blástica ainda não foram elucidados (DEININGER et al., 2000), mas parecem estar ligados a eventos adicionais de

transformação celular como duplicação do cr Ph, trissomia do cr 8, mutações ou deleções em genes supressores de tumor, como o p53 (MICHOR, 2007).

O tratamento da LMC pode ser realizado com hidroxycarbamida, transplante de medula óssea (TMO) alogênico, infusão de linfócitos do doador (DLI) e inibidores da enzima Tirosina-quinase (TK) (FADERL et al., 1999; HEHLMANN et al., 2007). A terapia com hidroxycarbamida é paliativa e promove somente remissão hematológica dos pacientes, sua utilização está relacionada ao pior prognóstico da doença em comparação com os demais tratamentos (FADERL et al., 2000). Dentre as modalidades terapêuticas citadas, a única curativa é o TMO, cujo sucesso depende de múltiplos fatores como idade, fase da doença, compatibilidade HLA, tempo do diagnóstico ao transplante, ocorrência da reação do enxerto contra o hospedeiro e da reação do enxerto contra a leucemia (FADERL et al., 2000 e KALIDAS et al., 2001). Devido sua alta morbi-mortalidade, o TMO limita-se àqueles pacientes com menos de 55 anos e que possuem doadores HLA compatíveis (GOLDMAN, 2001 e HEHLMANN et al., 2007). Em caso de recidiva da doença pós-TMO, os pacientes são submetidos à infusão de linfócitos do doador (*donor lymphocyte infusion*) no receptor que induz a remissão da doença em 80% dos casos, porém, alguns pacientes não respondem ao DLI (ARCESE et al., 1993; LEVENGA et al., 2007).

Os inibidores de TK têm como alvo a atividade enzimática tirosina-quinase de Bcr-Abl e visam o reestabelecimento dos processos fisiológicos de proliferação, sobrevivência e maturação da célula progenitora dos pacientes com LMC (MELO et al., 2007; HEHLMANN et al., 2007; FERREIRA, dissertação de mestrado 2007). Eles foram desenvolvidos após o melhor entendimento das bases moleculares da LMC, dentre eles podemos citar o mesilato de imatinibe (MI), o dasatinibe (BMS-354825) e o nilotinibe (AMN-107).

O MI inibe proteínas tirosina-quinases, como a ABL e a Bcr-Abl e (BUCHDUNGER et al., 2000), coíbe a progressão da LMC para a fase acelerada ou blástica e induz remissão hematológica em 98% dos pacientes e citogenética completa em 76% dos casos após 12 meses de tratamento (DEININGER et al., 1997; KANTARJIAN et al., 2002; GOLDMAN, 2004). Contudo, segundo WEISBERG e colaboradores (2007), a expansão e seleção de células com *bcr-abl1* mutante é comum em pacientes tratados com MI o que pode ocasionar a recaída do paciente ou progressão da LMC. A persistência de células Bcr-Abl positivas nos pacientes em tratamento com o MI indica que a inibição da atividade de TK de Abl talvez não seja suficiente para erradicar as células leucêmicas. Além disso, apesar do MI induzir alta percentagem de remissão citogenética completa e molecular nos pacientes, esse medicamento não parece apresentar potencial curativo e a resistência das células leucêmicas a esse

medicamento foi descrita. As principais causas da resistência das células ao MI são: presença de mutações no sítio catalítico de Bcr-Abl, duplicação do cr Ph, *superexpressão* do gene *bcr-abl1* e expulsão do fármaco pela célula leucêmica com elevado número de glicoproteína P na membrana (DRUKER et al., 2000 e JOHN et al., 2004). De acordo com VAN-ETTEN (2004), a resistência a essa droga é frequentemente observada nas fases avançadas da LMC e em 7% dos pacientes na fase crônica. Sendo assim, a identificação de componentes celulares ou vias de sinalização ligada à patogênese da LMC e à resistência à apoptose seria necessária para o desenvolvimento de novos fármacos para utilização como única terapia ou que em associação ao MI fosse mais efetivo contra a TK Bcr-Abl. Assim as estratégias utilizadas para melhorar a sobrevida e prognóstico dos pacientes refratários ao MI são: o aumento da dose de MI administrada; associação com outros compostos ou emprego de inibidores de TK de segunda geração (dasatinibe ou nilotinibe) (JOHN et al., 2004).

O dasatinibe (Sprycel[®], BMS354825), inibidor de TK de segunda geração, é administrado em pacientes com LMC resistentes ao MI. SHAH e colaboradores (2004) avaliaram a atividade do dasatinibe contra 15 formas mutantes da proteína Bcr-Abl resistentes ao mesilato de imatinibe e verificaram que essa droga possuía ação eficaz para 14 isoformas de Bcr-Abl testadas, mas não contra a isoforma de Bcr-Abl com a mutação T315I, a qual acomete 15 a 20% pacientes resistentes ao MI.

O nilotinibe (Tasigna[®], AMN107) possui mecanismo de ação similar ao MI por se ligar na forma inativa da enzima e atuar em diversas formas mutantes da TK. Esse fármaco é 30 vezes mais potente do que o MI, contudo não atua nas células Bcr-Abl⁺ com a mutação T315I (OLAVARRIA et al., 2007).

Nilotinibe e dasatinibe são terapias inovadoras, mas como citado anteriormente não promovem a eliminação das células portadoras da mutação T315I no *bcr-abl1* (OLAVARRIA et al., 2007). A existência da resistência ou refratariedade de alguns pacientes com LMC ao tratamento realizado com os inibidores de tirosina-quinase supracitados aponta para a necessidade da realização de futuros estudos para melhor conhecimento da fisiopatologia da LMC e descrição de novos alvos terapêuticos.

I.2. MicroRNAs

MicroRNAs são moléculas de RNA endógenos não codificantes, filogeneticamente conservados, formados por em média, 21 a 23 nucleotídeos (SHIVDASANI et al., 2006) e que inibem a tradução do RNA mensageiro (RNAm) de proteínas ou desestabilizam os

transcritos alvo coibindo a expressão gênica. (LAMY et al., 2006; SHIVDASANI et al., 2006; YU et al., 2006; ZHANG et al., 2006; VENTURINI et al., 2007).

O mecanismo da regulação da expressão dos miRNAs é pouco conhecido, seus transcritos são gerados pela polimerase II, sofrem o capeamento na extremidade 5' da molécula e adenilação na extremidade 3' da mesma (ZHANG et al., 2006). O processo molecular de biogênese do microRNA inicia-se com a formação do miRNA precursor dupla-fita chamado pri-miRNA que se localiza em regiões de íntrons ou éxons. O pri-miRNA contém cerca de 2kb e um *loop*, que ao ser clivado pela enzima Drosha, forma em pre-miRNA, uma estrutura intermediária que contém aproximadamente 70 nucleotídeos e o *loop* original. Esse pre-miRNA é exportado para o citoplasma e processado pela enzima Dicer, perdendo o *loop* e formando um microRNA dupla-fita de 22 nucleotídeos. Uma das fitas desse duplex é degradada e a outra se incorpora ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC), o qual impede que o RNAm alvo seja traduzido (DI LEVA et al., 2006). Os miRNAs incorporados ao RISC atuam regulando a expressão gênica por meio da hibridização às seqüências de RNAm complementares localizadas na região 3' UTR (3' *untranslated region*) de transcritos codificantes (VENTURINI et al., 2007). A proteína Argonauta 2, molécula com função de endonuclease, compõe o complexo RISC e cliva o RNAm alvo dificultando sua tradução (ZHANG et al., 2006).

O *lin-4* e o *let-7*, foram os primeiros microRNAs descritos no verme *Caenorhabditis elegans* e participam de seu processo de desenvolvimento (VELLA e SLACK, 2005). Estudos posteriores mostraram que os microRNAs estão expressos em quase todos os seres eucariotos e que estão envolvidos no controle dos processos de desenvolvimento, proliferação celular, apoptose e tumorigênese (CALIN et al., 2004; LAMY et al., 2006). Os miRNAs estão diferencialmente expressos nos diversos tecidos e a maioria apresenta padrões expressão dependente do contexto celular, como observado em células hematopoéticas e pancreáticas (MATTICK et al., 2005). Segundo HE et al. (2006), o desafio quando se trata de explorar as funções dos miRNAs é prever os potenciais alvos. A maioria dos alvos dos miRNAs são fatores transcricionais que por sua vez são cruciais para o crescimento e desenvolvimento celular. Os miRNAs podem modificar a função ou a estrutura da cromatina celular e, dessa forma, regular a expressão gênica por meio do DNA, como na replicação, transcrição ou controle nuclear epigenético (metilação do DNA, modificação de histonas e silenciamento de RNA).

Embora os miRNAs exerçam importante papel nos processos de diferenciação, proliferação e sobrevivência das células (DI LEVA et al., 2006; SHIVDASANI et al., 2006), a expressão aberrante de microRNA específicos têm sido associada a uma variedade de

malignidades humanas incluindo a leucemia linfóide crônica, linfomas de células B, linfomas e câncer de pulmão (CIMMINO et al., 2005).

CALIN et al., (2002) encontraram nas células leucêmicas de 70% dos pacientes com LLC a deleção ou baixa expressão dos miRNA-15a e miRNA-16-1. Esses dois miRNAs estão expressos em níveis elevados em linfócitos normais, mas nos pacientes com LLC apresentaram baixa expressão a qual foi correlacionada aos altos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Esses achados nos pacientes com LLC podem explicar pelo menos em parte a resistência dos linfócitos leucêmicos à apoptose (CIMMINO et al., 2005). ZANETTE e colaboradores (2007), determinaram o perfil de expressão de miRNAs em LLC e leucemia linfóide aguda (LLA) e relataram o aumento de miR-331 em LLC associado à linfoproliferação e sobrevivência celular. A *superexpressão* de miR-17-92 também verificada nessa pesquisa foi relacionada à patogênese e resistência das células à apoptose na LLA. Outros dados que chamam a atenção para a relação dos microRNAs e neoplasias hematológicas são a descrição de que, em células B leucêmicas, os altos níveis de miR-142 induzem elevação de *c-myc* e intensa proliferação celular e o relato da elevada expressão de miR-155 em pacientes com Linfoma de Burkitt (METZLER et al., 2004).

O fato do *cluster* miR-17-92 estar superregulado em linhagens celulares Bcr-Abl positivas pode ser resultado da transativação induzida tanto pelo oncogene *abl* como pelo c-MYC. Particularmente, a expressão deste *cluster* pode ser induzida precocemente na fase crônica da doença pela via c-MYC-Bcr-Abl, mas não na crise blástica (VENTURINI et al., 2007). É interessante notar que este conjunto de genes de microRNAs pode regular membros de uma família de fatores de transcrição como, por exemplo, E2F1-3 enquanto que miR-17 e miR-20 têm como alvos E2F3. Assim, quando a molécula E2F3-ligada predomina na célula, miR-17-92 promoverá a proliferação celular em tecidos normais, enquanto que em células neoplásicas, E2F1-ligada pode induzir a apoptose (WOOD et al., 2007).

AGIRRE et al. (2008), avaliou a expressão de miRNAs em células CD34⁺ de pacientes com LMC e comparou com controles saudáveis. Foi detectada expressão diminuída de miR-10a, miR-150 e miR-151 ao passo que miR-96 apresentou expressão aumentada em pacientes. Estes autores sugeriram que a baixa expressão do miR-10a não está relacionada a atividade quinase de Bcr-Abl mas pode estar ligada à *superexpressão* do fator de transcrição USF2.

Na leucemia mielóide aguda (LMA), os microRNAs são correlacionados com os subtipos citogenéticos [t(8;21); t(15;17)] e moleculares da neoplasia. miRNAs específicos com funções supressora de tumor e oncogênica têm sido estabelecidos, como o miR-155 já citado acima em Linfoma de Burkitt, miR-21 e let-7e, moléculas estas que parecem estarem

associadas com subtipos particulares desse tipo de leucemia (revisado por ZHAO et al., 2010). Estes autores observaram a *superexpressão* de miR-15a, miR-15b, miR-16-1, let-7a-3, miR-223 e miR-107 entre outros e a baixa expressão de miR-181b em células de leucemia promielocítica aguda. Foi observado que miR-107 tem como alvo um fator nuclear denominado NFI-A, gene este que está envolvido na regulação do miR-223 e de C/EBP α durante a diferenciação granulocítica (revisado por ZHAO et al., 2010).

Ainda se tratando de leucemias, a leucemia linfóide aguda (LLA) é freqüente em crianças e foi avaliada por Lu e colaboradores (2005) quanto à expressão de miRNAs. Foi observada elevada expressão de miR-204, miR-218, miR-331 enquanto que os genes miR-100, miR-125b e miR-151-5p mostraram-se pouco expressos em amostras de medula óssea LLA positivas quando comparadas com células CD34⁺ normais.

Por meio dos estudos acima, é possível observar que a literatura infere que os miRNAs provavelmente atuam como genes supressores de tumor ou oncogenes. Tais achados moleculares envolvem a regulação da expressão gênica por miRNAs em neoplasias malignas, visando maior entendimento do papel dos miRNAs em neoplasias como, por exemplo, na LMC.

I.3. Apoptose, Leucemia Mielóide Crônica e miRNAs

A apoptose, processo fisiológico de morte celular programada, desempenha importante papel na homeostase dos diferentes tecidos, inclusive do sistema hematopoético. A resistência anormal a esse processo pode conduzir ao aparecimento de neoplasias e doenças auto-imunes, enquanto que sua exacerbação acarreta o surgimento de doenças neurodegenerativas (RATHMELL e THOMPSON, 2002). A apoptose quando iniciada, desencadeia diversos eventos moleculares, que culminam na ativação de membros de uma família de proteases, denominadas caspases (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999). A cascata de ativação das caspases pode ser desencadeada pelas vias extrínseca e intrínseca. A via intrínseca inicia-se pela ação de diferentes sinais de estresse intracelular, tais como irradiação, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento celular, os quais convergem para a mitocôndria. A ativação desta via depende da liberação de certos fatores mitocondriais para o citosol, como o citocromo-c que juntamente com a molécula APAF-1, promovem a ativação da caspase-9, que por sua vez, ativa as caspases-3, -6 e -7 gerando o fenótipo apoptótico. Algumas moléculas que atuam na mitocôndria são centrais no controle da apoptose pela via intrínseca, como as proteínas da família Bcl-2 composta por membros que inibem a apoptose (Bcl-x_L, Mcl-1, A1, Bcl-2 e Bcl-w) e que

promovem ou sensibilizam a célula à morte celular (Bad, Bax, Bak, Bid, etc) (BORNER, 2003). A via extrínseca é ativada pela interação de receptores localizados na superfície celular, denominados “Receptores de Morte” aos seus específicos ligantes. Esses receptores incluem o Fas, TNFR1, DR3-6. Esta via inicia-se pela trimerização dos receptores de morte, que, por exemplo, no caso de interação do Fas-FasL, permite o recrutamento de duas proteínas sinalizadoras, FADD e pró-caspase-8, formando o complexo DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*). A pró-caspase-8 ativa-se e então é liberada para o citoplasma, onde agirá na fase executora do processo ao acionar a caspase-3, ou promover o desencadeamento da via intrínseca pela clivagem da molécula Bid (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999). O recrutamento e ativação da caspase-8 são alvos de proteínas anti-apoptóticas, como c-Flip (IRMLER et al., 1997).

Sabe-se que na LMC, as células precursoras hematopoéticas malignas são mais resistentes à apoptose do que as normais devido à expressão da TK Bcr-Abl, que prolonga a sobrevivência da célula e é considerada uma molécula anti-apoptótica (BRUMATTI, 2003). A alta atividade enzimática de Bcr-Abl é essencial na indução do fenótipo das leucemias Bcr-Abl⁺, por estarem envolvidas na fosforilação de diversos substratos celulares e na ativação de diferentes vias de sinalização intracelular. A alteração das vias de sinalização conduz ao aparecimento do fenótipo maligno da célula, modificando processos biológicos celulares básicos, como o controle da proliferação, diferenciação, adesão e sobrevivência celular (PENDERGAST et al., 1993; CORTEZ et al., 1995; DEININGER et al., 2000; FRAZER et al., 2006). AMARANTE-MENDES et al. (1999), descreveram que a resistência à apoptose em células Bcr-Abl⁺ estava relacionada ao aumento da expressão da proteína Bcl-x_L e não da Bcl-2. GUTIERREZ-CASTELLANOS et al. (2004) também relataram que pacientes portadores de LMC apresentam altos níveis de *bcl-x_L*. Por outro lado, HANDA e colaboradores (1997), publicaram que, na LMC, a expressão da proteína Bcl-2 aumenta com a progressão da doença, o que suporta a hipótese de que seja a expressão dessa proteína em altos níveis que prolonga a sobrevivência da célula leucêmica e a torna resistente à apoptose. Assim, dados com relação à expressão de Bcl-2 em células Bcr-Abl⁺ são controversos. CASTRO e colaboradores (2004) demonstraram que a expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-x_L* e *c-flip* estava elevada em pacientes com LMC e que aumentava com a progressão da doença, contribuindo para a exacerbação da resistência das células leucêmicas à apoptose e refratariedade dos pacientes ao tratamento nas fases avançadas da LMC. Outros trabalhos utilizando linhagens celulares Bcr-Abl⁺ mostraram que essa oncoproteína interfere na sobrevivência da célula leucêmica por meio da desregulação de moléculas envolvidas no processo

de apoptose celular, como por exemplo, reduzindo a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bim, FasL, p53 e Bax e elevando a expressão das anti-apoptóticas como survivina e Mcl-1 (KEESHAN et al., 2001; KURIBARA et al., 2004; AICHBERGER et al., 2005).

Os mecanismos celulares e moleculares associados à propriedade de Bcr-Abl em induzir o aumento da expressão de genes anti-apoptóticos e a redução dos pró-apoptóticos, contribuindo para a patogênese da LMC ainda não foram totalmente elucidados. O aumento da expressão dos genes anti-apoptóticos pode contribuir, pelo menos em parte, com a vantagem seletiva dessas células malignas em relação às normais. Ainda nesse contexto, algumas modalidades de tratamento da LMC, como os inibidores de TK, parecem objetivar a potencialização ou o aumento da susceptibilidade das células leucêmicas à apoptose. Portanto, o melhor conhecimento do mecanismo pelo qual a proteína Bcr-Abl exerce seu +aumento da eficácia dos inibidores de TK, no tratamento da LMC.

Recentemente, VENTURINI e colaboradores (2007) descreveram a relação positiva entre a alta expressão dos miRNAs codificados dentro do *cluster* miR-17-92 policistrônico, a expressão de c-MYC e a proliferação celular das células Bcr-Abl⁺. No mesmo trabalho os autores relatam que a expressão diferencial desse *cluster* está associada às fases da LMC. Os miRNAs podem controlar centenas de genes alvos, o que ressalta o papel dessas moléculas sobre o perfil de expressão gênica e protéica nas células (ESQUELA-KERSCHER e SLACK 2006). Outras publicações têm mostrado que a presença de mutações em miRNAs estão correlacionadas ao desenvolvimento de neoplasias humanas, indicando a possibilidade dessas moléculas atuarem como genes supressores de tumor ou como proto-oncogenes (ESQUELA-KERSCHER e SLACK, 2006).

A relação entre a regulação da apoptose e miRNAs pode ser ilustrada por meio do trabalho de CIMMINO et al. (2005) os quais mostraram que miR-15a e miR-16-1 regulam negativamente o gene anti-apoptótico *bcl-2*, cuja expressão é elevada em linfomas e leucemias. Dessa forma, foi demonstrado que a deleção de miR-15a e miR-16-1 resulta no aumento da expressão de *bcl-2* promovendo resistência à apoptose celular que contribui para o fenótipo leucêmico (ESQUELA-KERSCHER e SLACK, 2006; ZHANG et al., 2006) na LLC. A expressão de um desses miRNAs em linhagens celulares com altos níveis de *bcl-2* causou diminuição dos níveis de Bcl-2 e acentuou a susceptibilidade da célula à apoptose, contudo, sem afetar os níveis de RNA mensageiro de *bcl-2*, o que indica uma regulação de expressão pós-transcricional por parte dos miRNAs.

Ainda na LLC, CARETA e colaboradores (2007) observaram que a *superexpressão* das moléculas *ezrin* e *c-flip* estavam ligadas a expressão de miR-96, miR-183 e miR-20.

CARETA sugere que, como os miRNAs apresentam importante função na regulação gênica, é possível que essas moléculas modulem *c-flip* e *ezrin*, interferindo na proliferação e apoptose dos linfócitos leucêmicos do tipo B de pacientes com LLC.

Como é conhecido pela comunidade científica e comprovado por nosso grupo de pesquisa, parte do efeito anti-apoptótico de Bcr-Abl nas células dos pacientes com LMC está relacionado ao aumento da expressão dos genes reguladores da apoptose (*a1*, *bcl-w*, *mcl-1*, *bcl-x_L* e *c-flip*) e diminuição dos níveis de RNA de *bcl-2* (CASTRO et al., 2004). Nesse sentido seria interessante checar nesses mesmos pacientes como estariam os níveis de miR-15a e miR-16-1, já que um de seus alvos é *bcl-2*. A causa da elevada ou baixa expressão desses genes nas células dos pacientes é parcialmente conhecida, parece ter relação com a atividade quinase de Bcr-Abl e com a ativação de diferentes vias de sinalização como PI3K/AKT, MAP-Kinase e STAT. Nossa hipótese é de que alguns miRNAs participem na modulação da expressão dessas moléculas e, portanto da indução do fenótipo de resistência dessas células à apoptose. Ainda no contexto de apoptose e miRNAs, a via da p53 também tem sido estudada por ser um potencial alvo de microRNAs. Sua ativação conduz a célula à apoptose mediada por Puma e Noxa, interrupção do ciclo celular, bloqueio da angiogênese e ativação do reparo do DNA. Os miR-34a, miR-34b e miR-34c são reguladores de via da proteína p53 e foram identificados como alvos dessa família em tumores pancreáticos e de pulmão (HE et al., 2007). O miRNA-34 é ativado pelo p53 em resposta a estímulos de estresse intracelular, dessa forma, esse miRNA induz a apoptose ou interrompe o ciclo celular por repressão pós-transcricional de genes alvos (HE et al., 2007). Estes achados sugerem que a via da p53 exerce um importante papel na modulação da expressão desses miRNAs e na condução das células à morte, uma vez que é p53 é uma proteína pró-apoptótica e pode ter sua expressão bastante alterada no câncer (RAVER-SHAPIRA et al., 2007).

STAMATOPOULOS e colaboradores (2009) avaliaram o perfil de expressão do miR-29c e miR-223 em células do sangue periférico de pacientes portadores de LLC. Foi observada baixa expressão desses genes nas células tumorais, o que pode ser associada com alta carga tumoral, doença agressiva e pobre prognóstico.

O fato do miR-34 e miR-29c estarem diferencialmente expressos em tumores sólidos como o pancreático e na LLC, respectivamente, desperta o interesse em desvendar seu papel em outras neoplasias e no controle da apoptose nas células Bcr-Abl⁺.

Além dos miRNAs acima citados, outra molécula que atua na via da p53 é o miR-125b, reprimindo sua tradução em humanos (LE et al., 2009). Como já é conhecido na

literatura, o gene *p53* é ativado em resposta ao dano ao DNA ou ativação oncogênica partindo para a interrupção do ciclo celular e apoptose.

O trabalho citado acima apresentou repressão de *p53* por *miR-125b* em células de neuroblastoma e fibroblastos pulmonares. Dessa forma, pode-se considerar que a inibição da via *p53* é um evento chave para a tumorigênese encontrada em 50% dos casos de câncer (LE et al., 2009). Estes autores sugerem que existe uma regulação pós-transcricional de *p53* durante a embriogênese e diferenciação celular por parte do *miR-125b* e que, além de *p53*, esse microRNA pode ter como alvo o gene *p21* e *bax* em camundongos.

Com base nestes achados, a avaliação da expressão de microRNAs em células de pacientes com LMC e no grupo controle se torna um ponto a ser investigado no presente trabalho a fim de identificar a expressão diferenciada entre essas amostras, o que poderia sugerir alteração no processo de apoptose dessas células.

1.4. Identificação Computacional de miRNA

O princípio básico das análises computacionais conta com características conhecidas do miRNA e com a pesquisa dos mesmos em outros organismos. A detecção de miRNA em animais é baseada na conservação dos miRNAs nos genomas de espécies relacionadas, na formação de um *stem-loop* estável do pré-miRNA e na presença de miRNAs maduros na haste e não no *loop* do pré-miR (CHAUDHURI & CHATTERJEE, 2007). O objetivo das análises utilizando ferramentas de bioinformática foi de encontrar miRNAs humanos que possuíssem potenciais genes alvos relacionados à apoptose. Dentre os inúmeros algoritmos disponíveis para análise *in silico*, foram escolhidos *miRanda*, *microRNA.org*, *TargetScan*, *DIANA-microT*, *RNA22* e *PITA*.

O algoritmo *miRanda* (ENRIGHT et al., 2003) faz a predição da análise *in silico* dos alvos dos miRNAs diferencialmente expressos na análise global e permite comparar as seqüências usando algoritmo de alinhamento, calcula a energia livre estimando a energética da interação física entre o miRNA e o RNAm alvo e filtra o resultado por meio de conservação evolutiva (CHAUDHURI & CHATTERJEE, 2007).

O algoritmo *miRanda* apresenta parâmetros pré-estabelecidos para as análises, os quais consistem de valores de *score* maiores que 100 e *Mfe* (*minimum free energy*) menores que -15 kCal/Mol. Este valor é inversamente proporcional à estabilidade da ligação entre miRNA e RNA mensageiro.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo Geral

Checar o efeito de *bcr-abl1* no perfil de expressão de miRNAs em linhagens celulares e pacientes com LMC.

II.2. Objetivos Específicos

- a) Determinar quais são os miRNAs diferencialmente expressos na linhagem HL-60.Bcr-Abl;
- b) Determinar potenciais alvos apoptóticos para os miRNAs selecionados no item anterior, por meio de bioinformática;
- c) Quantificar os microRNAs selecionados na linhagem HL-60.Bcr-Abl tratadas com inibidores de tirosinoquinase;
- d) Verificar se a expressão dos miRNAs selecionados é dependente da atividade TK de Bcr-Abl;
- e) Quantificar a expressão dos miRNAs selecionados no item a cujos alvos potenciais estejam relacionados à regulação do processo de apoptose celular em amostras de pacientes com LMC em diferentes fases da doença e grupo controle;
- f) Avaliar a expressão dos miRNAs selecionados em células de pacientes com LMC em remissão citogenética completa e refratários ao mesilato de imatinibe (MI);
- g) Quantificar os níveis de RNAm dos alvos apoptóticos nos pacientes com LMC nas diferentes fases da doença, no grupo controle e nos pacientes que alcançaram remissão citogenética completa e nos que são resistentes ao MI;
- h) Correlacionar os níveis de expressão dos miRNAs selecionados aos níveis de RNAm de genes anti-apoptóticos nas células dos pacientes com LMC.

III. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Pacientes e Controles

Foram estudados 75 pacientes com LMC, 61 são caucasianos e 14 não-caucasianos. Trinta e um pacientes eram do sexo feminino e 44 do sexo masculino. A mediana de idade do grupo de pacientes foi de 45 anos (faixa etária de 18 a 77 anos). Destes pacientes, 48 estavam na fase crônica da LMC e 27 nas fases avançadas doença (13 em fase acelerada e 14 em crise blástica).

Dentre os 75 pacientes, 32 apresentaram remissão citogenética completa (RCC) pós-tratamento com 400 mg/dia de mesilato de imatinibe (MI) e 43 foram resistentes (ausência de resposta citogenética após 12 meses de terapia com MI ou evolução para fase avançada da doença durante uso de medicação) (tabela 1). O grupo controle foi composto por 58 indivíduos saudáveis, sendo 49 caucasianos e nove não-caucasianos. Destes indivíduos, 31 eram do sexo feminino e 27 do sexo masculino. A mediana de idade do grupo controle foi de 41 anos (faixa etária de 17 a 77 anos) (tabela 2). Todos os sujeitos da pesquisa doaram sangue periférico após a assinatura do TCLE. Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (processo nº: 6421/2008) (anexo).

Os dados demográficos dos pacientes com LMC, fase da doença e resposta dos pacientes ao tratamento com o mesilato de imatinibe (MI) estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Dados demográficos dos pacientes, fase da doença e resposta ao tratamento com MI.

Amostra	Gênero	Idade (anos)	Fase da doença	Raça	Resposta ao MI
1	F	77	Acelerada	C	R
2	F	59	Blástica	C	R
3	F	40	Crônica	NC	RCC
4	F	42	Crônica	C	RCC
5	F	30	Crônica	C	RCC
6	M	45	Crônica	C	RCC
7	M	45	Crônica	NC	RCC
8	M	65	Crônica	NC	RCC
9	F	25	Crônica	C	RCC
10	M	54	Crônica	C	RCC
11	M	68	Acelerada	C	R
12	M	35	Crônica	C	R
13	F	30	Blástica	NC	R
14	M	57	Crônica	NC	RCC
15	M	44	Acelerada	C	R
16	M	30	Blástica	C	R
17	M	51	Crônica	C	RCC
18	F	54	Crônica	C	RCC
19	F	30	Crônica	C	R
20	F	31	Crônica	C	RCC
21	F	77	Crônica	C	R
22	F	36	Blástica	C	R
23	M	59	Crônica	C	R
24	M	57	Crônica	C	R
25	M	63	Acelerada	C	R
26	M	65	Crônica	NC	R
27	F	66	Crônica	C	R
28	M	68	Crônica	C	R
29	F	52	Crônica	C	R
30	M	52	Crônica	C	R
31	F	34	Crônica	C	R
32	M	53	Blástica	C	R
33	M	45	Crônica	NC	R
34	M	27	Crônica	C	RCC
35	M	48	Crônica	C	R
36	F	39	Crônica	C	RCC
37	F	33	Crônica	C	RCC
38	F	64	Acelerada	NC	R

Amostra	Gênero	Idade (anos)	Fase da doença	Raça	Resposta ao MI
39	M	26	Acelerada	C	R
40	F	18	Crônica	C	RCC
41	F	21	Crônica	NC	R
42	M	48	Crônica	C	RCC
43	M	26	Blástica	C	R
44	M	48	Crônica	NC	RCC
45	F	57	Crônica	C	RCC
46	F	35	Crônica	C	RCC
47	M	45	Crônica	C	RCC
48	F	56	Acelerada	NC	R
49	M	29	Blástica	C	R
50	F	27	Crônica	C	RCC
51	F	58	Acelerada	C	RCC
52	M	55	Acelerada	NC	R
53	M	52	Crônica	C	RCC
54	M	53	Crônica	NC	RCC
55	M	23	Crônica	C	RCC
56	F	53	Crônica	NC	R
57	M	38	Crônica	C	RCC
58	M	50	Crônica	C	RCC
59	M	21	Crônica	C	RCC
60	F	32	Crônica	C	R
61	F	50	Acelerada	C	R
62	M	35	Blástica	C	R
63	M	50	Crônica	C	R
64	M	36	Crônica	C	RCC
65	F	31	Crônica	C	R
66	M	31	Blástica	C	R
67	M	57	Crônica	C	RCC
68	M	28	Acelerada	C	R
69	M	36	Acelerada	C	R
70	M	48	Acelerada	C	RCC
71	M	52	Blástica	C	R
72	M	39	Blástica	C	R
73	F	30	Blástica	C	R
74	F	39	Blástica	C	R
75	M	65	Blástica	C	R

F: sexo feminino; M: sexo masculino; MI: mesilato de imatinibe; C: caucasiano; NC: não-caucasiano; RCC: remissão citogenética completa; R: resistentes ao MI.

Tabela 2. Dados demográficos do grupo controle.

Amostra	Gênero	Idade (anos)	Raça
1	F	21	C
2	M	38	C
3	M	48	C
4	F	52	C
5	M	51	C
6	M	28	C
7	M	23	C
8	F	31	C
9	F	43	C
10	F	31	C
11	F	55	NC
12	M	22	C
13	F	57	C
14	F	21	NC
15	F	28	C
16	F	50	C
17	M	53	C
18	F	53	C
19	F	35	C
20	F	58	C
21	F	56	C
22	M	24	C
23	M	53	C
24	F	50	NC
25	F	34	C
26	M	48	C
27	M	27	C
28	M	34	C
29	F	32	C
30	M	39	C
31	M	46	C
32	F	38	C
33	M	30	C
34	F	17	C
35	F	28	C
36	M	23	C
37	F	35	C
38	F	25	NC
39	M	52	C
40	M	59	C

Amostra	Gênero	Idade (anos)	Raça
41	F	44	C
42	M	53	C
43	F	35	C
44	F	24	C
45	F	33	NC
46	M	30	C
47	F	39	NC
48	M	57	C
49	F	54	C
50	M	47	NC
51	M	36	C
52	M	63	C
53	F	59	C
54	M	50	C
55	F	77	C
56	M	57	NC
57	M	65	NC
58	F	64	C

F: sexo feminino; M: sexo masculino; C: caucasiano; NC: não-caucasiano.

III.2. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico dos pacientes e controles

As células mononucleares do sangue periférico de pacientes e controles foram separadas por meio do método Ficoll-Hypaque[®] 1,077 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) segundo as especificações do fabricante. Após isolamento, as células foram lavadas com tampão salina-fosfato (pH=7.4), contadas e armazenadas em Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies[®], Carlsbad, EUA) para posterior extração de RNA e proteínas.

III.3. Extração de RNA e síntese de cDNA das amostras

Células mononucleares do sangue periférico de pacientes, controles e das linhagens celulares Bcr-Abl⁺ e negativas, na concentração de 5×10^6 , foram submetidas à extração de RNA pelo método de Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies[®], Carlsbad, EUA) segundo as especificações do fabricante. A concentração de RNA total obtida e a qualidade das amostras foram avaliadas por análise espectrofotométrica a 260 nm e a 280 nm e por meio de

eletroforese em gel de agarose 2% (figura 1). As reações de transcrição reversa foram realizadas com um micrograma de RNA por meio do *kit High Capacity cDNA reverse transcription*[®] (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, EUA).

III.4. Linhagens Celulares

A linhagem HL-60.Bcr-Abl⁺ foi obtida a partir de células HL-60 infectadas com retrovírus recombinante transfectados com (ψ 2 + PA 317) contendo o plasmídeo pSR MSV p185^{bcr-abl} tkneo (BUENO-DA-SILVA et al., 2003).

As linhagens celulares HL-60 (ATCC: CCL-240) e HL-60.Bcr-Abl foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies[®], Carlsbad, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de glutamina, 1% de penicilina e 1% de estreptomicina (Gibco[®], Nova York, EUA). As células HL-60 e HL-60.Bcr-Abl numa quantidade de 3×10^6 foram tratadas com mesilato de imatinibe (10 μ M/poço), dasatinibe (5nM/poço) e nilotinibe (5nM/poço) em placa de 24 poços pelos períodos de 4 e 8 horas. A linhagem HL-60.Bcr-Abl foi utilizada neste trabalho porque dados da literatura (BRUMATTI et al., 2003) mostraram que a expressão ectópica de Bcr-Abl em células HL-60 confere resistência à apoptose contra vários agentes apoptogênicos e que, Bcr-Abl é uma molécula anti-apoptótica mais potente do que Bcl-2 ou Bcl-x_L. Esses dados nos levou ao estudo do perfil de expressão de microRNAs em células Bcr-Abl positivas tratadas com inibidores de TK.

III.5. Expressão global de microRNAs nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl1

As células HL-60 e HL-60.Bcr-Abl1 na concentração de 5×10^6 foram submetidas à extração de RNA como descrito acima e transcritas reversamente com os *primers RT stem loop* específicos (Applied Biosystems[®], EUA) para cada miRNA. Estes iniciadores se anelam na região 3' do microRNA maduro formando uma alça, na qual será estendida a fita para a síntese de cDNA com o auxílio da enzima transcriptase reversa.

Na quantificação global dos miRNAs nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl1, as reações de amplificação foram conduzidas empregando-se um painel capaz de amplificar 160 microRNAs humanos concomitantemente (*TaqMan[®] MicroRNA Assays Human Panel Early Access Kit*-código 4365381/lote:0505001) segundo as especificações do fabricante no equipamento ABIPRISM 7500 *Real Time PCR* (Applied Biosystems[®], EUA) (Tabela 3).

Tabela 3. Primers e sondas presentes no painel de detecção de miRNAs.

Has-miR-9	Hsa-miR-95	Hsa-miR-141	Hsa-miR-197	Hsa-miR-302c
Has-miR-9	Hsa-miR-96	Hsa-miR-142-3p	Hsa-miR-198	Hsa-miR-302d
Hsa-miR-10a	Hsa-miR-98	Hsa-miR-142-5p	Hsa-miR-199a	Hsa-miR-320
Hsa-miR-15a	Hsa-miR-99a	Hsa-miR-144	Hsa-miR-199a	Hsa-miR-323
Hsa-miR-15b	Hsa-miR-100	Hsa-miR-145	Hsa-miR-199b	Hsa-miR-324-5p
Hsa-miR-16	Hsa-miR-103	Hsa-miR-146	Hsa-miR-199-s	Hsa-miR-325
Hsa-miR-17-3p	Hsa-miR-104	Hsa-miR-147	Hsa-miR-200a	Hsa-miR-326
Hsa-miR-17-5p	Hsa-miR-105	Hsa-miR-148a	Hsa-miR-200b	Hsa-miR-328
Hsa-miR-19a	Hsa-miR-106a	Hsa-miR-149	Hsa-miR-200c	Hsa-miR-330
Hsa-miR-20	Hsa-miR-107	Hsa-miR-150	Hsa-miR-203	Hsa-miR-331
Hsa-miR-21	Hsa-miR-122a	Hsa-miR-151	Hsa-miR-204	Hsa-miR-335
Hsa-miR-23a	Hsa-miR-124a	Hsa-miR-152	Hsa-miR-205	Hsa-miR-337
Hsa-miR-23b	Hsa-miR-124b	Hsa-let-7a	Hsa-miR-210	Hsa-miR-338
Hsa-miR-25	Hsa-miR-125a	Hsa-miR-154	Hsa-miR-211	Hsa-miR-339
Hsa-miR-26a	Hsa-miR-125b	Hsa-miR-154	Hsa-miR-213	Hsa-miR-340
Hsa-miR-26b	Hsa-miR-126	Hsa-miR-155	Hsa-miR-214	Hsa-miR-342
Hsa-miR-27a	Hsa-miR-127	Hsa-miR-181a	Hsa-miR-215	Hsa-miR-367
Hsa-miR-27b	Hsa-miR-128a	Hsa-miR-181b	Hsa-miR-216	Hsa-miR-368
Hsa-miR-28	Hsa-miR-128b	Hsa-miR-181c	Hsa-miR-218	Hsa-miR-370
Hsa-miR-29a	Hsa-miR-129	Hsa-miR-182	Hsa-miR-219	Hsa-miR-371
Hsa-miR-29b	Hsa-miR-130a	Hsa-miR-182	Hsa-miR-220	Hsa-miR-372
Hsa-miR-29c	Hsa-miR-130b	Hsa-miR-183	Hsa-miR-221	Hsa-miR-373
Hsa-miR-30a-3p	Hsa-miR-132	Hsa-miR-184	Hsa-miR-222	Hsa-miR-373
Hsa-miR-30b	Hsa-miR-133a	Hsa-miR-185	Hsa-miR-223	Hsa-miR-374
Hsa-miR-30c	Hsa-miR-133b	Hsa-miR-186	Hsa-miR-224	Hsa-let-7b
Hsa-miR-30d	Hsa-miR-134	Hsa-miR-187	Hsa-miR-296	Hsa-let-7d
Hsa-miR-30e	Hsa-miR-135a	Hsa-miR-189	Hsa-miR-299	Hsa-let-7e
Hsa-miR-31	Hsa-miR-135b	Hsa-miR-190	Hsa-miR-301	Hsa-let-7g
Hsa-miR-34a	Hsa-miR-137	Hsa-miR-191	Hsa-miR-302a	Hsa-let-7i
Hsa-miR-34b	Hsa-miR-138	Hsa-miR-193	Hsa-miR-302b	Hsa-let-7a
Hsa-miR-34c	Hsa-miR-139	Hsa-miR-194	Hsa-miR-302b	Hsa-miR-16
Hsa-miR-92	Hsa-miR-140	Hsa-miR-195	Hsa-miR-302c	Hsa-miR-16

Os controles endógenos utilizados nas reações foram o RNU-24 e o RNU48. Foram considerados diferencialmente expressos na HL-60.Bcr-Abl aqueles microRNAs cujos *fold change* foram superiores a 2,5 e inferiores a 0,4.

III.6. Caracterização funcional dos microRNAs

Os microRNAs diferencialmente expressos na HL-60.Bcr-Abl1 foram submetidos à análise funcional *in silico* a fim de identificar quais as vias de sinalização, processos biológicos dos genes alvos e localização cromossômica. A análise dos genes-alvo foi direcionada para aqueles envolvidos na regulação da apoptose. Esta informação foi obtida a partir do banco de dados Gene Ontology www.geneontology.org e miRGen (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html>). As informações sobre as vias de sinalização foram obtidas do catálogo público providas pelo kegg www.genome.jp/kegg/ e biocarta (www.cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways).

III.7. Seleção dos microRNAs para validação nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl e células de pacientes

Os critérios empregados para selecionar os microRNAs para validação foram: microRNAs hiperexpressos ou hipoexpressos na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 (*fold change* acima de 2,5 e inferior a 0,4) e que tivessem como alvo genes reguladores do processo de apoptose celular. Para realização dessa seleção de microRNAs houve colaboração do laboratório de bioinformática do Centro de Terapia Celular – hemocentro de Ribeirão Preto. Foram selecionados para um estudo em pacientes os miRNAs hiperexpressos (hsa-miR-145, hsa-let-7e, hsa-miR-16, hsa-miR-21, hsa-miR-26a, hsa-miR-130b, hsa-miR-130a, hsa-miR-30e, hsa-miR-15a e hsa-miR-29c) e hipoexpressos (hsa-miR-181c, hsa-miR-125b, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-200a, hsa-let-7d e hsa-miR-203). Além destes miRNAs, o hsa-miR-133b e o hsa-miR-146a foram escolhidos para serem avaliados com base na literatura (CRAWFORD et al., 2009 e FLAMANT et al., 2010; respectivamente). A expressão dos miRNAs foi avaliada por PCR em tempo real por meio do *kit* TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®, EUA). O valor da expressão de tais genes foi obtido pelo método de 2^{-dCt} . Como controles endógenos foram utilizados RNU24 e RNU44.

III.8. Quantificação dos genes alvos por PCR em tempo real

Os genes alvos relacionados ao processo de apoptose celular quantificados em todas as amostras foram: o *a1*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* e *mcl-1*. Estes genes foram escolhidos por estarem diferencialmente expressos entre pacientes com LMC e controles no trabalho de mestrado da aluna e por serem alvos preditos dos miRNAs diferencialmente expressos na linhagem HL-60.Bcr-Abl no painel avaliado. Como controle endógeno da reação foi utilizado o gene *beta-actina*. Para os ensaios de PCR em tempo real foi empregado o kit SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems®, EUA). A sequência dos *primers*, a temperatura de anelamento e o tamanho do fragmento amplificado estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Sequências dos oligonucleotídeos, temperatura de anelamento (TA) e tamanho do produto amplificado.

Gene	Sequências (5' – 3')	TA (°C)	Produto (pb)
<i>β-actina</i>	R: GGC CAT CTC TTG CTC GAA F: GTG GGC ATG GGT CAG AAG	58	192
<i>a1</i>	R: CCA GTT AAT GAT GCC GTC F: GGC TGG CTC AGG ACT ATC	50	227
<i>bcl-2</i>	R: GCG GTA GCG GCG GGA GAA GTC F: AGT TCG AGA CCC GCT TCC	67	241
<i>c-flip</i>	R: GCC CAG GGA AGT GAA GGT F: AGT CTT GCT CGT GCT GGT TT	54	464
<i>ciap-1</i>	R: ATG GAC AGT TGG GAA AAT GC F: AGT CTT GCT CGT GCT GGT TT	59	550
<i>ciap-2</i>	R: TGC TTT TGC CAG ATC TGT TG F: GCC CTG AGG CAC TCT TCC A	58	432
<i>mcl-1</i>	R: CC AGC TCC TAC TCC AGC AAC F: AGA AAG CTG CAT CGA ACC AT	56	183

F: *forward*; R: *reverse*; TA: temperatura de anelamento; pb: pares de base.

III.9. Western blot

A detecção de fosfotirosina, c-Abl e tubulina (controle endógeno) nas linhagens tratadas com os inibidores de tirosina quinase mesilato de imatinibe (10 µM/poço), dasatinibe (5 nM/poço) e nilotinibe (5 nM/poço) em placa de 24 poços pelos períodos de 4 e 8 horas foi realizada por meio de *western blot*. As amostras de proteínas foram obtidas a partir de 3x10⁶ células HL-60 e HL-60.Bcr-Abl1. Foi realizada eletroforese SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) em tampão Tris-glicina (pH 8.4) e gel de poli(acrilamida na concentração de 8% para a separação das proteínas a serem analisadas. As

amostras foram submetidas à eletroforese cuja corrente elétrica era de 100v e o tempo de 2h e 30min. Em seguida as proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de PVDF (*polyvinylidene fluoride*) hidratadas com metanol, em tampão Tris-glicina (pH 8.3), etapa esta que foi padronizada na voltagem de 350mA por 2h e 30 min.

Após a transferência das proteínas dos géis para as membranas, foi realizado o bloqueio das mesmas a fim de impedir as reações inespecíficas entre as proteínas das membranas e o anticorpo utilizado para detecção da proteína alvo. O bloqueio foi realizado com BSA (*bovine serum albumin*) por duas horas e trinta minutos. Após o bloqueio, a membrana foi submetida à marcação com o anticorpo primário anti-cABL (mouse anti cABL monoclonal, Millipore, New York, NY, EUA) diluído em BSA 1:1000 por 16 horas. O ensaio de *western blot* foi realizado também para verificar as fosfotirosinas nas mesmas amostras citadas anteriormente. O anticorpo utilizado neste caso foi monoclonal (anti-fosfotirosina - purificado no laboratório do Dr. Gustavo Amarante Mendes a partir do sobrenadante do hibridoma 4G10) diluído 1:100 em BSA e o tempo de incubação foi de 16 horas. Como proteína de referência foi utilizada a tubulina e o anticorpo primário foi o anti- γ -tubulina (AK-15) (rabbit anti gama tubulina policlonal, Sigma, St Louis, MO, EUA) diluído em leite desnatado 1:500 e o tempo de incubação foi de 16 horas.

As marcações com os anticorpos secundários foram realizadas após lavar as membranas com TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween-20) por três vezes durante 10 minutos. O anticorpo secundário utilizado na marcação da proteína cABL foi o anticorpo anti-mouse IgG ligado à peroxidase (Amersham Biosciences, Foster City, Califórnia, EUA) diluído 1:2000 em BSA por uma hora. O anticorpo anti Mouse (IgG ligado à peroxidase (Amersham Biosciences, Foster City, Califórnia, EUA) diluído 1:5000 em BSA foi utilizado na marcação secundária da fosfotirosina. A marcação da proteína tubulina foi realizada com o anticorpo anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences, Foster City, Califórnia, EUA) diluído 1:5000 para a em leite desnatado com tempo de incubação de 50 minutos. Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas com TBS-T por três vezes durante 10 minutos e submetidas a revelação.

A revelação de todas as membranas foi realizada por meio de quimioluminescência com a adição de substrato quimioluminescente *Amersham™ ECL Plus Western blotting Detection Reagents ECL* (GE Healthcare, New Jersey, EUA) conforme as recomendações do fabricante. O excesso da solução contendo substrato foi removido e as membranas foram expostas e fotografadas no aparelho ImageQuant™ 350 (GE Healthcare, Allendale, New Jersey, EUA).

III.10. Análise estatística

Para as análises comparativas da expressão dos microRNAs e de seus genes alvos entre o grupo controle e os pacientes nas diferentes fases da doença (fases crônica e avançadas) e entre o grupo de pacientes em remissão citogenética completa (RCC) e pacientes resistentes (R) ao MI foi aplicado o teste de Mann-Whitney.

As correlações entre a expressão dos microRNAs e genes alvos foram realizadas por meio do teste de Spearman.

Foram considerados significantes os resultados cujo valor foi igual a $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV.1. Análise Global da expressão de microRNAs na linhagem HL-60.Bcr-Abl

A expressão global de miRNAs nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl1 foi determinada por meio de um painel contendo oligonucleotídeos e sondas específicas para 160 microRNAs humanos (*TaqMan[®] MicroRNA Assays Human Panel Early Access Kit*, Applied Biosystems, EUA).

Na análise dos dados da expressão global de miRNAs obtidos foram observados que dos 160 microRNAs, 15 estavam hiperexpressos na linhagem celular HL-60.Bcr-Abl1. A análise por bioinformática mostrou que pelo menos um de seus alvos estava associado à regulação da apoptose celular (tabela 5).

Tabela 5. microRNAs hiperexpressos na HL-60.Bcr-Abl, respectivos genes alvos, *fold change* e localizações cromossômicas.

microRNA	Gene Alvo	* <i>Fold Change</i>	Localização cromossômica
hsa-miR-222	<i>bmf, bcl-w</i>	366,6	Xp11.3
hsa-miR-145	<i>bcl-2, ciap-1, noxa, bax</i>	325,96	5q32
hsa-miR-96	<i>ciap-1</i>	165,94	7q32.2
hsa-let-7e	<i>bax</i>	91,59	19q13.41
hsa-miR-16	<i>bid, bik, bcl-2</i>	41,14	13q14.2
hsa-miR-21	<i>ciap-2, fasL</i>	37,01	17q23.1
hsa-miR-26a	<i>bcl-2, bid, c-flip, ciap-2</i>	22,55	3p22.2
hsa-miR-130b	<i>ciap-2</i>	18,07	22q11.21
hsa-miR-132	<i>bim_{EL}</i>	14,19	17p13.3
hsa-miR-324-5p	<i>bik</i>	11,45	17p13.1
hsa-miR-130a	<i>c-flip, ciap-2</i>	8,01	11q12.1
hsa-miR-15b	<i>bik</i>	7,99	3q25.33
hsa-miR-30e	<i>fas</i>	5,80	1p34.2
hsa-miR-26b	<i>c-flip, ciap-2, bid</i>	2,91	2q35
hsa-miR-326	<i>puma</i>	2,66	11q13.4

*HL-60.Bcr-Abl1/HL-60

A partir dos resultados obtidos na análise da expressão global de miRNAs e da seleção das moléculas hiperreguladas, foi realizada a análise da localização cromossômica destes miRNAs (tabela 5). Foi possível observar que 66.6% dos miRNAs hiperexpressos no presente trabalho estavam localizados nos braços longos e 33.4% dessas moléculas se encontram nos braços curtos dos cromossomos. O cromossomo 17 é o que apresenta maior

representatividade nesse tipo de análise (três miRNAs hiperexpressos). A quantidade de miRNA por cromossomo citada na tabela acima está ilustrada na figura 1.

Figura 1. Distribuição de microRNAs hiperexpressos por cromossomo.

A tabela 6 mostra os microRNAs hipoexpressos na linhagem HL-60.Bcr-Abl, seus respectivos alvos, *fold change* e a localização cromossômica.

Tabela 6. microRNAs hipoexpressos na linhagem HL-60.Bcr-Abl1, genes alvos, *fold change* e localizações cromossômicas.

microRNA	Gene Alvo	* <i>Fold Change</i>	Localização cromossômica
hsa-miR-133a	<i>bid</i>	0,83	18q11.2
hsa-miR-106a	<i>c-flip, bim_{EL}, bax</i>	0,73	Xq26.2
hsa-miR-181c	<i>fas</i>	0,42	19p13.13
hsa-miR-141	<i>ciap-2</i>	0,36	12p13.31
hsa-miR-150	<i>bax, c-flip</i>	0,33	19q13.33
hsa-miR-98	<i>fasL</i>	0,22	Xp11.22
hsa-miR-125b	<i>bak, bik, puma, c-flip,</i>	0,17	11q24.1
hsa-miR-142-3p	<i>bik, ciap-2, c-flip</i>	0,16	17q22
hsa-miR-200a	<i>nox</i>	0,15	1p36.33
hsa-miR-155	<i>ciap-2</i>	0,15	21q21.3
hsa-let-7d	<i>a1, bcl-2, bak, fas</i>	0,11	9q22.32
hsa-miR-302d	<i>bad, c-flip</i>	0,08	4q25
hsa-miR-204	<i>ciap-1</i>	0,05	9q22.12
hsa-miR-99a	<i>bim_{EL}</i>	0,03	21q21.1
hsa-miR-203	<i>ciap-1</i>	0,03	14q32.33

*HL-60.Bcr-Abl1/HL-60

Foi detectado que 73.3% dos microRNAs hipoexpressos estão localizados nos braços longos dos cromossomos humanos e 26.7% nos braços curtos. Os microRNAs localizam-se nos cromossomos 1, 3, 5, 7, 13, 17, 18, 19 e X (figura 2). Os microRNAs que não apresentaram diferença de expressão nas linhagens analisadas podem ser vistos no apêndice A desta tese.

Figura 2. Distribuição de microRNAs hipoexpressos por cromossomo.

IV.2. Caracterização funcional dos microRNAs por meio de análise de bioinformática

A partir da análise global da expressão dos microRNAs e a seleção das moléculas diferencialmente expressas, foram selecionados para validação nas células de pacientes e para estudos detalhados de alvo os miRNAs cuja análise funcional por bioinformática demonstrou envolvimento em processos biológicos e funções celulares importantes, como proliferação e apoptose.

A tabela abaixo mostra os miRNAs diferencialmente expressos na análise global por PCR em tempo real e as respectivas vias de sinalização celular e processos biológicos em que estas moléculas estão envolvidas.

Tabela 7. Vias de sinalização e processos biológicos nos quais estão envolvidos os miRNAs diferencialmente expressos nas células Bcr-Abl1⁺.

miRNA	Vias de Sinalização/Processos Biológicos
hsa-miR-145	Indução da apoptose
hsa-miR-96	Regulação da apoptose
hsa-let-7e	Sinalização em resposta aos danos no DNA; fosforilação de <i>bad</i> , via de MAPK
hsa-miR-16	Apoptose, citotoxicidade de células NK
hsa-miR-21	Citotoxicidade de células NK, apoptose, via de sinalização de AKT, via Fas-FasL
hsa-miR-26a	Sistema Fas-FasL; apoptose
hsa-miR-130b	Induz apoptose por sinais extracelulares; sistema Fas-FasL
hsa-miR-132	Apoptose
hsa-miR-324-5p	Apoptose; via mitocondrial da apoptose
hsa-miR-130a	Induz apoptose por sinais extracelulares
hsa-miR-15b	Apoptose
hsa-miR-30e	Apoptose; via de sinalização de MAPK; sistema Fas-FasL
hsa-miR-26b	Indução da apoptose via domínio morte
hsa-miR-326	Apoptose, transdução de sinal via p53
hsa-miR-15a	Apoptose
hsa-miR-29c	Citotoxicidade de células NK; apoptose
hsa-miR-103	Induz apoptose por sinais extracelulares; sistema Fas-FasL
hsa-miR-23a	Citotoxicidade de células NK; apoptose
hsa-miR-198	Apoptose; vias de sinalização JAK-STAT; LMC; RAS
hsa-miR-214	Apoptose; citotoxicidade de células NK
hsa-miR-133a	Citotoxicidade de células NK; apoptose
hsa-miR-106a	Apoptose; via de p53
hsa-miR-181c	Via de MAPK; apoptose, células NK
hsa-miR-141	Via mitocondrial da apoptose
hsa-miR-150	Apoptose; transdução de sinal via p53
hsa-miR-98	MAPK; apoptose; via de AKT; sistema Fas-FasL
hsa-miR-125b	Apoptose; transdução de sinal via p53
hsa-miR-142-3p	Apoptose; sistema Fas-FasL; cascata das caspases
hsa-miR-200a	Apoptose
hsa-miR-155	Apoptose; cascata das caspases
hsa-let-7d	Apoptose; p53
hsa-miR-302d	Apoptose; via de sinalização VEGF
hsa-miR-204	Apoptose; cascata das caspases
hsa-miR-99a	Apoptose
hsa-miR-203	Apoptose; cascata das caspases
hsa-miR-221	Apoptose

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*; JAK-STAT: *Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*; LMC: Leucemia Mielóide Crônica; RAS: *RAt Sarcoma vírus*

IV.3. Seleção dos miRNAs para análise de expressão por PCR em tempo real

Alguns microRNAs diferencialmente expressos foram selecionados para análise da expressão por PCR em tempo real. Tal seleção foi baseada nos processos biológicos nos quais essas moléculas estão envolvidas e *fold change*. Dessa forma, foram escolhidos para realização de PCR em tempo real miRNAs potencialmente associados à regulação do processo de apoptose celular. Foram selecionados os miRNAs hsa-let-7d, hsa-miR-15a, hsa-miR-16, hsa-miR-26a, hsa-miR-29c, hsa-miR-130b, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-145 e hsa-miR-146a.

IV.4. Análise da expressão de microRNAs selecionados nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl

Para avaliar a diferença de expressão dos miRNAs na linhagem HL-60 e HL-60.Bcr-Abl1 foi realizado ensaios de PCR em tempo real. Foram avaliadas as expressões de let-7d, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-29c, miR-30e, miR-130a, miR-130b, let-7e, miR-133b, miR-142-3p, miR-145 e miR-146a. Calculando-se o *fold change* entre HL-60.Bcr-Abl1 e HL-60, foi possível observar que o let-7d apresentou expressão praticamente nula em HL-60.Bcr-Abl enquanto que os miR-29c e miR-142-3p estavam pouco expressos nessa linhagem (figuras 3A, 3F e 3L). As moléculas miR-15a, miR-16 e miR-30e apresentaram menor nível de expressão na linhagem transfectada enquanto que miR-21 foi duas vezes mais expresso na mesma (figuras 3B, 3C, 3G e 3D). O miR-26a apresentou uma expressão três vezes maior na linhagem Bcr-Abl1⁺ e os miR-130a e miR-133b estavam quatro vezes mais expressos nessa linhagem (figuras 3E, 3H e 3K). O let-7e, miR-130b e miR-146a apresentaram-se 45, 15 e 10 vezes mais expressos em HL-60.Bcr-Abl, respectivamente (figuras 3J, 3I e 3N) em relação a HL-60. O miR-145 também apresentou maiores níveis de expressão na linhagem transfectada, na ordem de 15 vezes mais expresso em relação a HL-60 (figura 3M).

Figura 3. Expressão de microRNAs nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl.

IV.5. Expressão dos microRNAs em HL-60.Bcr-Abl1 tratada com os inibidores de tirosinoquinase

Foram avaliadas as expressões de let-7d, let-7e, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-26a, miR-30e, miR-130a, miR-142-3p e miR-145 na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 após 4 e 8 horas de tratamento com os inibidores de TK imatinibe (IM), dasatinibe (DAS) e nilotinibe (NIL).

Ao calcularmos o *fold change* (fc) entre HL-60.Bcr-Abl1 tratadas e não-tratadas foi possível observar que a inibição da atividade quinase de Bcr-Abl1 por MI pode ter causado o aumento de 4,67 vezes na expressão de let-7d enquanto a inibição por DAS não modificou a expressão dessa molécula. Foi observado que a expressão de let-7d diminuiu após o tratamento das células nos tempos de 4 horas e 8 horas (fc=0.26 e 0.01, respectivamente) (figura 4A).

Com relação ao miR-let-7e, a inibição da atividade quinase de Bcr-Abl1 por MI parece não ter exercido efeito sobre a expressão desse microRNA (fc=1.3 e 0.71). Quando a linhagem HL-60.Bcr-Abl1 foi tratada com DAS por 8 horas, foi observado maior expressão de miR-let-7e (fc=2.74) e, o mesmo efeito foi obtido após a linhagem ser tratada por 8 horas com NIL (fc=2.89) (figura 4B).

A expressão de miR-15a foi 3.13 vezes maior após 8 horas de tratamento com MI em relação às células não-tratadas. Após 4 horas de inibição por DAS, miR-15a apresentou-se 4.18 vezes mais expresso do que a linhagem sem tratamento e após 8 horas, o valor de *fold change* foi de 2.59. A inibição de TK por NIL modulou a expressão do miR-15a, pois no tempo de 4 horas de tratamento com esse inibidor, o *fold change* foi de 3.97 e após 8 horas foi de 2.91 (figura 4C).

Com relação à expressão de miR-16, a inibição da atividade quinase de Bcr-Abl1 por MI parece não ter modulado a expressão dessa molécula. Entretanto, após 4 horas de tratamento com DAS e NIL, o *fold change* foi de 2.72 e 2.5, respectivamente (figura 4D).

A inibição da atividade quinase de Bcr-Abl1 por DAS parece ter sido importante na elevada expressão de miR-21. Os níveis deste microRNA foi 6 vezes maior após 4 horas de tratamento e 11.7 vezes maior após 8 horas de tratamento com dasatinibe. A inibição de TK por imatinibe e nilotinibe parece não ter exercido grandes efeitos sobre a expressão de miR-21 (figura 4E).

A expressão de miR-26a e miR-30e não foi alterada após o tratamento da linhagem HL-60.Bcr-Abl1 com os três inibidores de TK (figura 4F e 4G).

A expressão de miR-130a sofreu uma modulação após a inibição da atividade quinase de Bcr-Abl1 na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 pelos três inibidores de TK. Após 4 e 8 horas de tratamento com MI, os níveis desse microRNA foram 7 vezes mais elevados do que a linhagem sem tratamento e após 4 e 8 horas de tratamento com DAS, a expressão de miR-130a foi 3.77 e 6.93, respectivamente. O inibidor NIL alterou os níveis de miR-130a após 8 horas de tratamento com *fold change* de 2.69 (figura 4H).

A inibição da TK Bcr-Abl1 por IM e NIL não exerceu efeito sobre a expressão de miR-142-3p, entretanto, quando a quinase foi inibida por DAS após 4 e 8 horas, os níveis desta molécula foram elevados (fc=2.68 e 7.12, respectivamente) (figura 4I). Diferentemente do que foi observado com miR-142-3p, a inibição da TK Bcr-Abl1 por NIL após 4 horas de tratamento modulou a expressão de miR-145 (fc=11.97). Contudo, a expressão desta molécula não foi modulada por IM e DAS (figura 4J).

Figura 4. Expressão de microRNAs na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 tratada com mesilato de imatinibe (MI), dasatinibe (DAS) e nilotinibe (AMN). As células foram incubadas por 4 e 8 horas com 10 μ M de MI e 5 nM de DAS e 5 nM de NIL.

Figura 4. Expressão de microRNAs na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 tratada com mesilato de imatinibe (MI), dasatinibe (DAS) e nilotinibe (AMN). As células foram incubadas por 4 e 8 horas com 10 μ M de MI e 5 nM de DAS e NIL.

A tabela abaixo mostra um resumo dos níveis de expressão dos microRNAs na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 após o tratamento com os inibidores de TK.

Tabela 8. Representação esquemática da alteração da expressão de microRNAs após o tratamento de HL-60.Bcr-Abl1 com os inibidores de TK IM, DAS e NIL.

microRNA	4 horas (MI)	8 horas (MI)	4 horas (DAS)	8 horas (DAS)	4 horas (NIL)	8 horas (NIL)
miR-let-7d	↑	-	-	-	↓	↓
miR-let-7e	-	-	↑	-	-	↑
miR-15a	-	↑	↑	↑	↑	↑
miR-16	-	-	↑	-	↑	-
miR-21	-	↓	↑	↑	↓	-
miR-26a	-	-	-	-	-	-
miR-30e	-	-	↑	-	-	-
miR-130a	↑	-	↑	↑	-	↑
miR-142-3p	-	-	↑	↑	-	-
miR-145	↓	-	-	-	↑	-

MI: mesilato de imatinibe; DAS: dasatinibe; NIL: nilotinibe.

IV.6. Análise da expressão da proteínas fosfotirosinas e cABL na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 tratada com mesilato de imatinibe, dasatinibe e nilotinibe

Para investigar o potencial efeito da atividade quinase de Bcr-Abl1 sobre a expressão dos microRNAs selecionados, as células HL-60.Bcr-Abl1 foram tratadas com os inibidores de tirosinoquinase mesilato de imatinibe (MI), dasatinibe (BMS-354825) e nilotinibe (AMN-107).

A figura 5 mostra os resultados obtidos por meio da técnica de *western blot* para verificar a inibição das proteínas fosfotirosinas na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 não-tratada (tempo zero) e tratadas com os inibidores de TK imatinibe, dasatinibe e nilotinibe após 4 e 8 horas de incubação. Esta figura mostra que na linhagem não-tratada (poços 1, 4 e 7), a atividade das fosfotirosinas foi maior em relação às linhagens tratadas com os inibidores.

Figura 5. Amostras 1, 2 e 3 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com MI nos tempos 0, 4h e 8h. Amostras 4, 5 e 6 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com dasatinibe nos tempos 0, 4h e 8h e amostras 7, 8 e 9 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com nilotinibe nos mesmos tempos. A proteína tubulina está representada pelas bandas de 48kDa. M = marcador de peso molecular.

A figura 6 mostra os resultados obtidos por meio da técnica de *western blot* para verificar a inibição da proteína c-Abl na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 não-tratada (tempo zero) e tratadas com os inibidores de TK imatinibe, dasatinibe e nilotinibe após 4 e 8 horas de incubação.

Figura 6. Amostras 1, 2 e 3 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com MI nos tempos 0, 4h e 8h. Amostras 4, 5 e 6 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com dasatinibe nos tempos 0, 4h e 8h e amostras 7, 8 e 9 = HL-60.Bcr-Abl1 tratada com nilotinibe nos mesmos tempos. A proteína tubulina está representada pelas bandas de 48kDa. M = marcador de peso molecular.

IV.7. Expressão de microRNAs no grupo controle e em pacientes com LMC

Os microRNAs let-7d, hsa-miR-15a, hsa-miR-16, hsa-miR-26a, hsa-miR-29c, hsa-miR-130b, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-145 e hsa-miR-146a apresentaram expressão diferencial nos pacientes com LMC em fase crônica (FC) e/ou avançadas (FA) em relação aos controles.

Os microRNAs miR-15a, miR-130b e miR-145 foram mais expressos no grupo de pacientes com LMC em fase crônica (medianas=2238; 1588 e 5101, respectivamente) quando comparados com o grupo controle (m=1397; 993.4 e 578.6, respectivamente) (figuras 7B, 7F e 7H).

Ao compararmos pacientes em fase crônica e avançada, foram observados que os let-7d (m=506), miR-15a (m=1069), miR-16 (m=26759), miR-29c (m=2864), miR-142-3p (73703), miR-145 (m=241.4) e miR-146a (m=5611) estão menos expressos na fase avançada da LMC do que na fase crônica (medianas=1791; 2238; 43169; 6261; 234323; 5101; 16536, respectivamente) (figuras 7A-7D; 7G-7I).

O let-7d, miR-16, miR-142-3p, miR-145 e miR-146a (medianas=2229; 87285; 174074; 578.6; 23609) foram detectados em maiores níveis no grupo controle quando comparados aos pacientes em FA (medianas=506; 26759; 73703; 241.4; 5611, respectivamente) (figuras 7A, 7C, 7G-7I).

Sendo assim, foi possível observar um padrão de expressão de microRNAs nos pacientes analisados, ou seja, pacientes em fase crônica apresentam maiores níveis de miR-let-7d, miR-15a, miR-16, miR-29c, miR-142-3p, miR-145 e miR-146a do que aqueles que se encontram nas fases avançadas da LMC.

Pacientes com LMC também possuem perfil de expressão de microRNAs distinto de controles, visto que expressam mais miR-15a, miR-130b e miR-145 do que o grupo controle.

Figura 7. Expressão de microRNAs no grupo controle e em pacientes com LMC em diferentes fases da doença. C=controle; FC=fase crônica; FA=fase avançada. A linha horizontal representa a mediana de expressão de microRNA de cada grupo.

Tabela 9. Representação esquemática da expressão de microRNAs no grupo controle e nas diferentes fases da LMC.

microRNA	CxFC		CxFA		FCxFA	
miR-let-7d	-	-	-	↓	-	↓
miR-15a	-	↑	-		-	↓
miR-16	-	↓	-	↓	-	↓
miR-26a	-	↓	-	-	-	-
miR-29c	-	-	-	-	-	↓
miR-130b	-	↑	-	-	-	-
miR-142-3p	-	-	-	↓	-	↓
miR-145	-	↑	-	↓	-	↓
miR-146a	-	↓	-	↓	-	↓

C: grupo controle; FC: fase crônica; FA: fases avançadas

IV.8. Expressão de genes apoptóticos no grupo controle e em pacientes com LMC

Os genes anti-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* e *mcl-1* apresentaram expressão diferencial nos pacientes com LMC em fase crônica (FC) e/ou avançadas (FA) em relação aos controles e/ou quando comparamos a expressão dessas moléculas em pacientes nas diferentes fases dessa neoplasia.

Os pacientes em fase crônica apresentaram expressão elevada de RNAm dos genes *a1*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1* e *ciap-2* (medianas=71.89; 2.78; 55.24; 10.79 e 118.4, respectivamente) quando comparados ao grupo controle (m=20.50; 1.05; 9.28; 3.44 e 23.30, respectivamente) (figuras 7A-7E).

A análise da expressão destes genes anti-apoptóticos entre fase crônica e fases avançadas da LMC mostrou que *c-flip* e *ciap-2* foram menos expressos nas fases avançadas (m=4.76 e 32.98, respectivamente) enquanto que na fase crônica os níveis de RNAm de *c-flip* e *ciap-2* eram elevados (m=55.24 e 118.4, respectivamente) (figuras 8C e 8E). O gene *mcl-1* também apresentou diferença de expressão entre as fases da doença, entretanto a expressão dessa molécula foi maior na fase avançada (m=1162) quando comparada à sua expressão na fase crônica da LMC (m=60.11) (figura 8F).

A diferença de expressão entre pacientes nas fases avançadas da LMC e o grupo controle foi observada quando avaliamos *a1*, *c-flip*, *ciap-1* e *mcl-1*. Os genes *a1*, *ciap-1* e *mcl-1* foram mais expressos nas fases avançadas (m=92.91; 36.76 e 1162, respectivamente)

quando comparamos com o grupo de indivíduos saudáveis ($m=20.50$; 3.44 e 525.5, respectivamente) (8A, 8D e 8F). Dentre os genes que apresentaram diferença de expressão entre o grupo controle e o grupo de pacientes em fases avançadas, a única molécula anti-apoptótica que apresentou baixa expressão nos níveis de RNAm nas fases tardias da LMC foi *c-flip* ($m=4.76$) enquanto que no grupo controle o valor da mediana foi de 9.28 (figura 8C).

Esses resultados mostram que os pacientes com LMC estudados no presente trabalho apresentam desregulação de genes anti-apoptóticos em qualquer fase da doença.

Figura 8. Expressão de *a1*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* e *mcl-1* no grupo controle e em pacientes com LMC nas diferentes fases da doença. A linha horizontal representa a mediana de expressão do microRNA de cada grupo.

Tabela 10. Representação esquemática da expressão dos genes anti-apoptóticos no grupo controle e nas diferentes fases da LMC.

Gene	CxFC		CxFA		FCxFA	
<i>a1</i>	-	↑	-	↑	-	-
<i>bcl-2</i>	-	↑	-	-	-	-
<i>c-flip</i>	-	↑	-	↓	-	↓
<i>ciap-1</i>	-	↑	-	↑	-	↑
<i>ciap-2</i>	-	↑	-	-	-	↓
<i>mcl-1</i>	-	-	-	↑	-	↑

C: grupo controle; FC: fase crônica; FA: fases avançadas

IV.9. Expressão de microRNAs em pacientes em RCC e resistentes ao MI

Para determinação do perfil de expressão de miRNAs conforme resposta terapêutica foi analisada a expressão de microRNAs nos pacientes em remissão citogenética completa e resistentes ao MI.

Os microRNAs miR-26a, miR-29c, miR-130b e miR-146a estavam menos expressos em pacientes resistentes ao MI (figuras 9A-9D).

As medianas da expressão dessas moléculas em pacientes em RCC são: miR-26a (86939); miR-29c (12226); miR-130b (2535) e miR-146a (17898). Pacientes resistentes ao MI apresentam as seguintes medianas para esses microRNAs: miR-26a (22483); miR-29c (4105); miR-130b (1320) e miR-146a (7671).

Figura 9. Expressão de microRNAs em pacientes com leucemia mielóide crônica com resposta citogenética completa (RCC) e resistentes (R) ao mesilato de imatinibe. A linha horizontal representa a mediana de expressão do microRNA de cada grupo.

IV.10. Expressão de genes apoptóticos em pacientes em RCC e resistentes ao MI

A expressão de genes anti-apoptóticos também foi estudada nas amostras de pacientes com LMC que alcançaram remissão citogenética completa (RCC) e em pacientes que se mostraram resistentes (R) ao tratamento com mesilato de imatinibe.

Foram avaliados os genes *a1*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* e *mcl-1*. Dentre esses genes, somente *ciap-1* e *mcl-1* apresentaram diferença de expressão entre os grupos RCC e R. Os genes anti-apoptóticos *ciap-1* e *mcl-1* estavam mais expressos no grupo de pacientes em remissão citogenética ($m=53.55$ e 1397 , respectivamente) enquanto que o grupo de pacientes que eram resistentes ao mesilato de imatinibe apresentou expressão menor de ambos os genes ($m=7.84$ e 700.4 , respectivamente) (figura 10A e B). Os resultados não-significantes ($p>0.05$) estão no apêndice B desta tese.

Figura 10. Expressão de *ciap-1* e *mcl-1* em pacientes com leucemia mielóide crônica com resposta citogenética completa (RCC) e resistentes (R) ao mesilato de imatinibe. A linha horizontal representa a mediana de expressão gênica de cada grupo.

IV.11. Relação da expressão gênica dos microRNAs e seus respectivos alvos

Para verificar os resultados da predição dos alvos obtidos na análise *in silico* realizada por bioinformática por meio dos algoritmos computacionais, foram realizados ensaios de PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para a amplificação dos genes preditos como alvo dos miRNAs de interesse.

De acordo com a predição dos alvos *in silico* foi possível observar que o miR-let7d provavelmente regula a expressão do gene anti-apoptótico *a1*. Pacientes tratados com MI que estavam nas fases avançadas (acelerada e blástica) da LMC apresentaram menor expressão de

miR-let7d (m=506) em relação ao grupo controle (m=2229) enquanto que seu alvo predito *al* apresentou maior expressão na fase avançada da LMC (m=92.91) em relação ao grupo saudável (m=20.50) (figura 11A). miR-16 provavelmente possui o gene anti-apoptótico *bcl-2* como seu alvo na LMC. Baixos níveis de miR-16 foram observados em pacientes com LMC nas fases avançadas da doença (m=26759) em relação ao grupo controle (m=87285) enquanto que a expressão de *bcl-2* estava aumentada nas fases avançadas da LMC (m=1.84) quando comparada ao grupo controle (m=1,05) (figura 11B).

A molécula miR-26a também pode regular a expressão de *bcl-2* uma vez que pacientes com LMC em fase crônica apresentam baixos níveis de miR-26a (m=29650) em relação ao grupo controle (m=58941) enquanto que a expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* nesses pacientes é elevada (m=2785) em relação aos controles (m=1.05) (figura 11C).

Além de ter como alvo predito *bcl-2*, miR-26a parece também ter como alvo o gene anti-apoptótico *ciap-2*. Pacientes com LMC em fase crônica apresentaram baixa expressão de miR-26a (m=29650) em relação aos controle (m=58941) enquanto que a expressão de *ciap-2* estava maior no grupo de pacientes em fase crônica (m=118.4) em relação aos controles (m=23.30) (figura 11D).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a expressão do gene anti-apoptótico *mcl-1* pode ser regulada tanto pelo miR-29c. Baixos níveis de miR-29c foram observados em pacientes nas fases avançadas da LMC (m=2864) em relação aos pacientes em fase crônica da LMC (m=6261) enquanto que esses pacientes apresentavam expressão elevada de *ciap-2* (1162) nas fases avançadas e baixa expressão (m=60.11) na fase crônica da LMC (figura 11E).

Figura 11. Expressão dos genes anti-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *ciap-2* e *mcl-1* em relação ao perfil de expressão de miR-let7d, miR-16, miR-26a e miR-29c em pacientes com LMC. C= grupo controle; FC=pacientes em fase crônica; FA=pacientes em fase avançada.

IV.12. Possível regulação da maquinaria apoptótica por microRNAs nos pacientes com LMC nas diferentes fases da doença

A figura 12 compila os dados mais relevantes do presente estudo. A mesma foi elaborada na tentativa de visualizar as possíveis interações dos microRNAs e de seus alvos nas vias de sinalização do processo de apoptose celular. Essa figura permite a ilustração do possível efeito da alteração da expressão de microRNAs e seus genes-alvo no processo de apoptose celular em pacientes com LMC.

Uma vez que o genes anti-apoptóticos *a1* e *mcl-1* estão envolvidos no controle da morte celular, a *hiperregulação* dessas moléculas por miR-let-7d e miR-29c, respectivamente,

poderia ocasionar aumento da atividade de *a1* e *mcl-1* e, conseqüentemente maior potencial inibitório favorecendo assim a resistência da célula tumoral à morte.

Bcl-2 possui um papel anti-apoptótico na regulação da via mitocondrial da apoptose e de acordo com nossos resultados, pode ser que haja uma modulação dessa proteína por miR-16 e pelo miR-26a nas células estudadas. Uma vez que miR-16 e miR-26a estão diminuídos, podemos especular que o gene *bcl-2*, predito como seus alvos, esteja *hiperregulado*, dessa forma, haveria um aumento de sua atividade sobre a mitocôndria e menor liberação de fatores como citocromo c, fazendo com que a célula fosse resistente à apoptose por meio da via intrínseca de ativação.

A figura 12 também mostra que miR-26a pode *superregular* os níveis de expressão do gene anti-apoptótico *ciap-2* em em pacientes nas fases avançadas da LMC, uma vez que miR-26a se apresenta em baixos níveis nesses pacientes. As proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) são conhecidas por inibir a ativação da caspase-3. Sendo assim, podemos especular que o aumento de *ciap-2* nas células dos nossos pacientes pode ser resultado de uma modulação desse gene por miR-26a e dessa forma, *ciap-2* poderá potencializar seu efeito anti-apopótico sobre a pró-caspase-3, ou seja, menores níveis de caspase-3 serão ativados e como conseqüência, essa proteína não exercerá seu papel efetor sobre a clivagem de substratos apoptóticos, o que culminaria com maior resistência dessas células à morte.

Figura 12. Vias de sinalização da apoptose, miRNAs e genes alvos. As setas vermelhas para cima indicam genes hiperexpressos e as setas vermelhas que indicam para baixo, hipoexpressos. Figura adaptada de www.people.bath.ac.uk/pr1cemb/apoptosis.htm.

IV.13. Possível regulação da maquinaria apoptótica por microRNAs segundo resposta dos pacientes com LMC ao tratamento com mesilato de imatinibe

Conforme modelo acima e resultados obtidos, podemos especular que a regulação da apoptose em pacientes com LMC é potencialmente modulada pela expressão dos microRNAs miR-16, miR-26a, miR-let-7d e miR-29c. A participação desses microRNAs na regulação da apoptose celular estaria associada ao controle da expressão dos seus alvos anti-apoptóticos *al*, *bcl-2*, *ciap-2* e *mcl-1*.

A figura 13 compila os dados mais relevantes do estudo entre pacientes com LMC que alcançaram remissão citogenética completa após o tratamento com mesilato de imatinibe e aqueles resistentes a esse inibidor de TK. Essa figura ilustra o possível efeito da alteração da expressão de microRNAs e seus genes alvos no processo de apoptose celular em pacientes com LMC resistentes ao MI. Por meio desse esquema é possível observar que microRNAs e alvos tiveram o mesmo comportamento de expressão em pacientes que foram resistentes a esse medicamento. Os genes alvos anti-apoptóticos *bcl-2*, *ciap-1* e *mcl-1* estavam diminuídos nesses pacientes bem como os microRNAs miR-26a e miR-29c.

Figura 13. Vias de sinalização da apoptose, miRNAs e genes alvos. As setas vermelhas para baixo indicam genes hipoexpressos. Figura adaptada de www.people.bath.ac.uk/pr1cemb/apoptosis.htm.

V. DISCUSSÃO

V.1. Oncoproteína Bcr-Abl1 modula a expressão de microRNAs

Neste estudo foi avaliado o perfil de expressão global de microRNAs nas linhagens celulares HL-60 e HL-60.Bcr-Abl1. Os miRNAs hiperexpressos e os hipoexpressos que possuíam como alvo genes que regulam o processo de apoptose foram selecionados para análise detalhada.

Uma questão fundamental foi delimitar a importância da variação de expressão dos miRNAs de nossos dados, ou seja, qual a modificação do nível de microRNA que seria necessária para alterar significativamente a expressão proteica. Por exemplo, HE e colaboradores (2005) observaram aumento de 10 a 20 vezes na expressão de miR-146, miR-221 e miR-222 nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais. Esses autores observaram ainda que essa alteração de expressão correlacionava-se à ausência de expressão da proteína c-Kit.

CALIN et al. (2004) demonstrou que menores variações dos níveis de expressão dos miRNAs, por exemplo, da ordem de duas vezes, causariam também diminuição da expressão proteica. Com base na literatura optamos, portanto, por considerar como relevantes os valores de *fold change* acima de 2,5 e abaixo de 0,4.

Priorizamos as análises de microRNAs e genes-alvo importantes para o processo de regulação da apoptose celular e fisiopatologia da LMC, isto porque, é sabido que as células Bcr-Abl⁺ são resistentes à apoptose e que esse fenótipo de resistência contribui para a fisiopatologia da LMC (BUENO-DA-SILVA et al., 2003; BRUMATTI et al., 2003; FERREIRA, 2007). A resistência à apoptose está associada à indução de *bcl-x_L* por Bcr-Abl1 por meio da ativação de STAT5 e PI3K/Akt (AMARANTE-MENDES et al., 2003). Outra molécula potencialmente envolvida na proteção celular contra a apoptose é o fator de transcrição NF- κ B, que induz aumento dos níveis dos inibidores de caspases (IAPs) (MUNZERT et al., 2002). Essas observações da literatura sugerem que as vias de sinalização STAT5, PI3K/Akt e NF- κ B podem estar alteradas nas linhagens Bcr-Abl⁺.

A expressão dos miRNAs, cujos alvos são moléculas que regulam a apoptose celular, foi determinada na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 pós-tratamento com mesilato de imatinibe (MI, Glivec[®]), dasatinibe (BMS-354825, Sprycel[®]) e nilotinibe (AMN-107, Tasigna[®]) por quatro e oito horas. O intuito desse teste foi avaliar se a expressão de miRNAs seria dependente da atividade quinase de Bcr-Abl1 nessa linhagem.

BUENO-DA-SILVA e colaboradores (2003) utilizaram inibidores de tirosinoquinase (herbimicina A, genisteína e MI) para investigar o papel da atividade tirosina-quinase (TK) na resistência da HL-60.Bcr-Abl1 à apoptose. Estes autores relataram que células Bcr-Abl⁺ na

presença dos inibidores de TK permaneciam resistentes aos estímulos apoptogênicos. Esses dados sugerem que o fenótipo de resistência das células à morte celular não é totalmente dependente da atividade quinase de Bcr-abl1 e que provavelmente essa molécula induz por si a resistência das células à apoptose. Nesse contexto, nosso trabalho avaliou se a atividade quinase de Bcr-Abl1 modula a expressão de microRNAs.

A expressão de miR-let7d, miR-15a e miR-130a aumentaram e a expressão de miR-21 e miR-145 diminuiu após a inibição da atividade quinase de Bcr-Abl1 pelo MI, enquanto que a inibição da atividade quinase dessa oncoproteína pelo MI não apresentou efeito sobre a expressão de miR-let-7e, miR-16, miR-26a, miR-30e e miR-142-3p. Dessa forma inferimos que pelo menos parte dos miRNAs estudados teve sua expressão alterada por um mecanismo dependente da atividade quinase de Bcr-Abl.

BUENO-DA-SILVA e cols. (2003) mostraram que o MI inibe proteínas que contêm tirosina nas células HL-60.Bcr-Abl1 após 2 horas de cultivo sem interferir com os níveis da proteína Bcr-Abl1. A detecção de moléculas não reguladas pela atividade quinase de Bcr-Abl1 se torna importante quando se trata de resistência ao MI, pois os dados podem sugerir alvos terapêuticos secundários na LMC que sejam independentes da atividade quinase de Bcr-Abl1.

Esses dados sugerem que a modulação dos microRNAs supracitados observada na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 tratadas com MI está associada a um mecanismo independente da atividade quinase de Bcr-Abl1.

Experimentos nos quais foram utilizadas linhagens Bcr-Abl positivas tratadas com os inibidores de TK, como mesilato de imatinibe (IM), dasatinibe (DAS) e nilotinibe (NIL) estão presentes na literatura. SALIH e cols. (2010) avaliaram o efeito desses três medicamentos na reatividade das células *natural killers* (NK). As células NK possuem um papel importante na resposta imune antitumoral por exercer citotoxicidade e pela capacidade de iniciar resposta imune adaptativa por meio da liberação de citocinas como IFN- γ . As células NK apresentam um ligante denominado NKG2DL expresso em células malignas; molécula esta que pode ser controlada pela expressão de Bcr-Abl. SALIH e cols. (2010) analisaram o efeito de MI, DAS e NIL na expressão de NKG2DL em células Bcr-Abl positivas (K562 e MEG-01) e observaram diminuição da expressão desse ligante nas células NK co-cultivadas com K562 e MEG-01 tratadas com TKIs. Os resultados obtidos com K562 foram confirmados na linhagem MEG-01, ou seja, baixa expressão de NKG2DL e diminuição da citotoxicidade das células NK e da produção de IFN- γ . Estes autores demonstraram a influência dos inibidores de TK na expressão de NKG2DL bem como na produção de citocinas pelas células sugerindo ser efeito colateral inevitável do tratamento da LMC com os TKIs em questão.

O presente estudo bem como o trabalho acima citado mostra a importância de ensaios em linhagens celulares Bcr-Abl⁺ tratadas com inibidores de tirosina-quinase a fim de melhor conhecer a dinâmica das células leucêmicas, a influência do sistema imune, a presença de doença residual mínima e estratégias terapêuticas que envolvem a combinação de TKIs com imunoterapia ou transplantes de células-tronco.

Como citado anteriormente, o presente trabalho mostrou que a expressão de miR-let7d, miR-15a, miR-21, miR-130a e miR-145 parece ter sido modulada por um mecanismo independente da atividade quinase de Bcr-Abl. Os microRNAs podem ser regulados por diversos mecanismos como a ligação com as proteínas argonautas ou até mesmo pelo sequestro por parte de RNAm, o que regularia sua atividade (TREIBER et al., 2012). As proteínas argonautas parecem ser limitadas pela atividade da via de processamento de miRNA, o que resulta na atenuação do silenciamento gênico guiado por essas moléculas. Segundo TREIBER et al. (2012) ainda não é conhecido como os microRNAs são incorporados na rede de sinalização celular e é possível que quinases e fosfatases estejam envolvidas na interação dos miRNAs e moléculas sinalizadoras. Dessa forma podemos sugerir que a modulação de miR-let7d, miR-15a, miR-21, miR-130a e miR-145 pode envolver proteínas argonautas e ou mecanismos e proteínas sinalizadoras que não foram avaliadas no presente estudo, uma vez que esta modulação provavelmente não foi dependente da atividade quinase de Bcr-Abl.

Ainda no contexto de regulação da transcrição de microRNAs, BREVING e cols. (2010) descrevem que o mecanismo de transcrição dessas moléculas bem como seus elementos promotores ainda não são compreendidos. Esses autores comentam que a transcrição de miRNAs parece ser um complexo como aquele presente na transcrição de genes que codificam proteínas, e entretanto, promotores de microRNAs estão relacionados a fatores de transcrição, elementos silenciadores e modificações na cromatina, como a metilação do DNA (BREVING et al., 2010).

Fatores de transcrição como c-Myc e p53 podem se ligar a elementos promotores e modular a expressão de microRNAs. Certos loci de microRNAs estão sob controle epigenético e são metilados por DNA metiltransferases (DNMT13b) nas ilhas CpG em determinado tipo celular ou condição específica (BREVING et al., 2010).

Devido a natureza intrigante dos miRNAs, muito estudo é necessário para o melhor entendimento de sua superexpressão ou inibição funcional na clínica do câncer, onde é muito importante regular de forma clara as vias que envolvem oncogenes ou genes supressores de tumor.

A expressão de miRNAs tem sido investigada na leucemia linfóide aguda do tipo B Ph⁺ (LLA-B Ph⁺). Análises de células de pacientes com LLA-B Ph⁺ e linhagens Bcr-Abl1⁺ mostram que miR-203 está localizado numa região metilada em células Bcr-Abl⁺, processo este que indica

uma *hiporregulação* de miR-203, sugerindo que na presença de Bcr-Abl⁺, miR-203 pode ser *hiporregulado* BUENO et al. (2008).

Este mesmo grupo de pesquisadores mostrou que a expressão ectópica de miR-203 nas linhagens Bcr-Abl positivas, K562 e KCL-22, resultou em menores níveis de Bcr-Abl e, conseqüentemente, na diminuição da proliferação celular e aumento de apoptose.

Esses dados sugerem que a expressão de microRNAs pode exercer um efeito importante na expressão de Bcr-Abl e alterar a expressão dessa oncoproteína, dessa forma, podemos sugerir que a desregulação de miR-let7d, miR-15a, miR-21, miR-130a e miR-145 pode ter alterado os níveis de Bcr-Abl nas células HL-60.Bcr-Abl aqui estudadas.

Segundo PERROTTI e HARB (2010), após o tratamento de K562 com imatinibe e com RNA de interferência para Bcr-Abl os níveis de expressão do policistron miR-17-92 diminuíram e a expressão de miR-328 aumentou. Esses autores demonstraram que *in vivo* os níveis de miR-328 estavam muito menores em linhagens Bcr-Abl negativas e que células mononucleares da medula óssea de pacientes resistentes ao imatinibe apresentaram menores níveis de miR-26a e miR-29c. Esses resultados, assim como aqueles obtidos em nosso estudo, indicam que em linhagens celulares Bcr-Abl positivas, a expressão de miRNAs pode ser regulada por Bcr-Abl pela atividade quinase e pelos seus níveis de expressão.

A inibição da atividade quinase de Bcr-Abl por dasatinibe e nilotinibe também alterou a expressão de microRNAs. Após o tratamento de HL-60.Bcr-Abl com dasatinibe, let-7e, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-30e, miR-130a e miR-142-3p apresentaram aumento de expressão. A inibição de TK por nilotinibe diminuiu a expressão de let-7d e aumentou os níveis de let-7e, miR-15a e miR-130a. O miR-26a não foi modulado por nenhum dos inibidores de TK. A literatura é escassa em relação aos trabalhos o tratamento de culturas celulares Bcr-Abl⁺ por dasatinibe e nilotinibe.

Com base nos nossos achados e nos estudos da literatura, podemos dizer que ensaios que envolvem linhagens celulares positivas para o oncogene *bcr-abl* são importantes porque mimetizam o comportamento de células leucêmicas de pacientes com LMC e favorecem dessa forma o entendimento da fisiopatologia da doença.

V.2. Perfil de expressão de microRNAs e genes alvos na LMC

Após os ensaios realizados com linhagens celulares, foi realizada a análise de expressão de microRNAs em células mononucleares de pacientes com LMC a fim de verificar se os resultados obtidos com as linhagens seriam reprodutíveis nos pacientes.

Sete microRNAs (let-7d, miR-16, miR-26a, miR-130b, miR-142-3p, miR-145 e miR-146a) foram escolhidos para estudo em células de pacientes com LMC e controles por estarem diferencialmente expressos na linhagem HL-60.Bcr-Abl em relação a HL-60. Destes sete, os microRNAs miR-130b e miR-145 estavam mais expressos em pacientes com LMC do que no grupo controle.

Os dados obtidos pela análise global de miR-let7d e miR-142-3p coincidiram com os resultados obtidos na análise dos pacientes com LMC, ambas as moléculas estão hipoexpressas. Da mesma forma, miR-130b e miR-145 apresentaram o mesmo perfil de expressão tanto na análise do painel quanto nos pacientes com LMC, uma vez que essas duas moléculas apresentaram elevada expressão nas células Bcr-Abl positivas.

A análise do painel de miRNAs mostrou que a linhagem HL-60.Bcr-Abl1 apresenta *superexpressão* de miR-16, miR-26a, miR-130b e miR-145 enquanto que miR-let-7d e miR-142-3p estavam hipoexpressos nessa linhagem em relação a HL-60.

Os miR-15a e miR-29c não estavam diferencialmente expressos entre HL-60 e HL-60.Bcr-Abl, mas foram selecionados para o presente estudo porque interessantes trabalhos da literatura associam estas moléculas ao genes *bcl-2* e *mcl-1* envolvidos na apoptose (GARZON et al., 2007 e MOTT et al., 2007) e diferencialmente expressos nas diferentes fases da LMC.

A literatura é escassa no que diz respeito ao perfil de let-7d em células leucêmicas e na relação do mesmo com os alvos-relacionados à apoptose (*al*, *bcl-2*, *bak* e *fas*). SHAO e cols. (2011) descrevem que o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) reprime a expressão de let-7d em células de câncer de ovário. É descrito na literatura que o receptor de PDGF pode ser modulado pelo MI (WALLER, 2010). Como no presente trabalho não dosamos PDGF, é impossível relacionarmos a repressão dos níveis de let-7d por esse fator de crescimento na LMC.

Segundo JOHNSON et al. (2005), a família de microRNAs let-7 regula a expressão do oncogene *RAS* por meio da repressão pós-transcricional e este oncogene pode ter seu metabolismo alterado por Bcr-Abl, o que contribui para a progressão da LMC (PERROTI e HARB 2010).

JOHNSON et al. (2005), investigou a expressão do gene e da proteína *RAS* em linhagem proveniente de leucemia promielocítica aguda pós-tratamento com ácido transretinóico (ATRA). Foi observado que os níveis de RNAm de *RAS* aumentaram e a proteína diminuiu. Foi notado que os níveis protéicos de *RAS* eram inversamente proporcionais aos níveis de let-7, sugerindo que let-7 interfere na modulação negativa de ATRA sobre o gene *RAS*. Outros experimentos demonstraram que a expressão ectópica do precursor de let-7d nas células de leucemia promielocítica aguda não resulta em diferenças nos níveis de RNAm de *RAS*, entretanto, os níveis da proteína *RAS* diminuíram após 48 horas de transfecção. Esses resultados sugerem que a modulação de *RAS* pelo ATRA pode ser mediada por let-7d.

Esses dados evidenciam a importância da regulação de oncogenes por microRNAs. Dessa forma, células leucêmicas podem sofrer alteração na expressão de oncogenes e protooncogenes, o que as tornam mais ou menos predispostas à evolução para fases mais graves da doença.

Em nosso trabalho, a expressão de let-7d estava aumentada no grupo controle e diminuída em pacientes em fases avançadas. Esse dado sugere que let-7d pode ser modulado por Bcr-Abl presente nos pacientes com LMC. O alvo predito para let-7d e que foram avaliados no presente estudo são *a1* e *bcl-2*. A expressão desses genes anti-apoptóticos estava aumentada na LMC na fase crônica. Com bases nos achados referentes ao let-7d e aos genes *a1* e *bcl-2* podemos inferir que let-7d pode regular a expressão dos genes apoptóticos em células Bcr-Abl⁺, entretanto, a expressão de let-7d estava baixa nas fases avançadas e os altos níveis de *a1* e *bcl-2* foram observados na fase crônica da doença.

O aumento da expressão de miR-15a observado em pacientes com LMC no presente trabalho foi detectado por GARZON et al. (2007) em pacientes com leucemia promielocítica aguda. O gene anti-apoptótico *bcl-2* é um alvo predito de miR-15a e miR-16 e se apresenta altamente expresso nos pacientes aqui estudados, dessa forma, o aumento paralelo de miR-15a e *bcl-2* em nossos pacientes sugere que na LMC, o gene *bcl-2* não é regulado miR-15a e/ou que o microRNA em questão pode atuar na modulação da expressão de outros alvos nessa neoplasia.

O resultado obtido por meio da análise de miR-16 nos pacientes com LMC foi discordante daquele obtido pela análise global da expressão de microRNAs em células HL-60.Bcr-Abl. Nossos resultados mostraram baixos níveis de miR-16 em pacientes com LMC em diferentes fases da doença em relação aos controles. Em contraste, no presente trabalho, os pacientes tanto na fase crônica quanto nas fases avançadas apresentaram elevados níveis de *bcl-2*. Esse dado sugere que na LMC o gene *bcl-2* pode ser alvo de miR-16. Nossos resultados apontam para o fato de que a diminuição de miR-16 e o aumento de *bcl-2* estão relacionados a fisiopatologia e fases da LMC.

A desregulação de miR-16 em doenças neoplásicas hematológicas como a leucemia linfóide crônica (LLC) e leucemia linfóide aguda (LLA) (HANLON et al., 2009 e SLAVOV et al., 2010) tem sido descrita. Nesses estudos da literatura o gene anti-apoptótico *bcl-2*, alvo predito de miR-16, também apresentou elevada expressão nos pacientes cujos níveis de miR-16 estavam diminuídos. Em geral, altos níveis de miR-16 estão associados ao melhor prognóstico enquanto que sua baixa expressão está relacionada ao mau prognóstico da LLA (SLAVOV et al., 2010). O aumento da expressão *bcl-2* modulado pela baixa expressão de miR-16 na LLA pode exacerbar a proliferação celular neste tipo de leucemia (SLAVOV et al., 2010).

Nosso achado sobre a expressão do gene *bcl-2* diverge do relatado por outros autores que avaliaram a expressão de moléculas envolvidas na regulação da apoptose em linhagens Bcr-Abl⁺.

BUENO-DA-SILVA et al. (2003) mostraram em linhagens Bcr-Abl⁺ que os níveis proteicos e de RNAm da molécula Bcl-2 estão diminuídos. Esses autores relataram que a expressão de *bcl-2* não é importante para resistência da HL-60.Bcr-Abl aos quimioterápicos. A diferença de relatos sobre a expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* entre a literatura e nosso estudo pode ser atribuída ao fato de que nosso trabalho utilizou células de pacientes com LMC enquanto que o trabalho de BUENO-DA-SILVA et al. (2003) mostrou a expressão de *bcl-2* em linhagens celulares Bcr-Abl⁺.

Com relação ao miR-26a, os dados obtidos em células de pacientes com LMC foram divergentes daqueles obtidos na análise do painel, cujas amostras foram as linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl. O painel demonstrou uma *superexpressão* dessa molécula na linhagem Bcr-Abl⁺ enquanto pacientes em fases avançadas mostraram menor expressão de miR-26a em relação ao grupo controle e fase crônica. A análise *in silico* dos alvos mostrou que o gene anti-apoptótico *ciap-2* é um alvo predito para miR-26a. Em nossas análises, pacientes com LMC em diferentes fases da doença apresentaram altos níveis de *ciap-2* em relação ao grupo controle.

ZHANG et al. (2011) observaram baixa expressão de miR-26a em células de câncer de mama. Estes pesquisadores mostraram que a transfecção de miR-26a nessas células promovia a apoptose por meio da via da proteína p53 (ZHANG et al. 2011).

Assim como os autores acima, LU e colaboradores (2011) relataram que a baixa expressão de miR-26a em carcinoma nasofaríngeo está associada a menor proliferação celular.

Ainda nesse contexto, CHEN et al. (2011) investigaram se miR-26a regulado pela α -fetoproteína (hAFP) poderia suprimir a proliferação de células tumorais de fígado por meio da via p53. CHEN et al. (2011) mostraram que miR-26a atua como supressor tumoral *in vivo* e *in vitro*, diminuindo a proliferação e o crescimento das células do carcinoma hepatocelular. Sendo assim, miR-26a exerce potente atividade antitumoral o que proporcionaria nova abordagem para o tratamento de vários tipos de neoplasias CHEN et al. (2011).

De acordo com os dados publicados nos artigos supracitados e nossos resultados, especulamos que na LMC o miR-26a participa da fisiopatologia da doença, ou seja, de sua progressão e leucemogênese por meio de sua associação com o seu alvo predito *ciap-2*, que está elevado na LMC. Nossos dados indicam que na LMC o miR-26a regula positivamente a expressão do gene anti-apoptótico *ciap-2*, o que contribuiria para o fenótipo de resistência das células leucêmicas da LMC à apoptose.

O miR-29c nos pacientes com LMC analisados apresentou elevada expressão na fase crônica baixos níveis nas fases avançadas. Esse resultado diverge daquele obtido na análise do painel, quando miR-29c apresentou expressão similar entre as linhagens avaliadas. Em nosso trabalho, foi observado aumento tanto de *bcl-2* (alvo predito) quanto de miR-29c nos pacientes com LMC quando comparados aos níveis de expressão no grupo controle. Com relação aos seus

alvos, XIONG et al. (2010) demonstrou evidências de que em hepatocarcinoma, o gene anti-apoptótico *bcl-2* é alvo de miR-29. Recentemente foi mostrado que miR-29a/b/c é capaz de superregular p53 e induzir a apoptose em câncer de mama (FABBRI et al., 2007). O aumento paralelo dessas moléculas no nosso trabalho pode indicar que na LMC, miR-29c pode ter outros alvos e/ou que *bcl-2* pode ser regulado por outros microRNAs.

A análise *in silico* por bioinformática mostrou que o gene anti-apoptótico *mcl-1* também é potencial alvo de miR-29c. Nossos resultados mostram que miR-29c está mais expresso em fase crônica do que em fases avançadas e *mcl-1* que o gene está mais expresso em fases avançadas do que em fase crônica da LMC. Esse resultado sugere que na LMC o gene *mcl-1* pode ser alvo de miR-29c e que a expressão elevada de *mcl-1* nos pacientes em fases avançadas pode estar relacionada à maior resistência das células nessa fase da LMC à apoptose.

MOTT et al. (2007) observaram que a expressão de miR-29b reduz os níveis da proteína Mcl-1, induzindo a célula à apoptose em colangiocarcinoma. LONGO et al. (2008) demonstraram que a *hiporregulação* de Mcl-1 por siRNA induz rápida apoptose em LLC. Esses autores descreveram que Mcl-1 é fator de sobrevivência essencial para linfócitos e que camundongos transgênicos para esse gene desenvolveram linfoma de células B. O aumento da viabilidade das células leucêmicas observada pela superexpressão de *mcl-1* é consequência da ativação da via de sinalização do gene anti-apoptótico receptor de célula B (*bcr*) associado com a ativação prolongada da via PI3K/AKT quinases. Esses dados sugerem que o alvo de miR-29c, o *mcl-1*, é importante componente das vias de apoptose ativadas nas leucemias (MOTT et al. 2007).

PETERSON et al. (2011) observaram diminuição de *mcl-1* e aumento da atividade das caspases em células provenientes de LMC em crise blástica após o tratamento dessas células com MI-219, inibidor da proteína HDM-2, proteína supressora de p53. Estes autores concluíram que a inibição de HDM-2 por essa droga efetivamente induz a apoptose na maioria das células de LMC em crise blástica com ou sem mutações no domínio Bcr-Abl. Trabalhos que envolvem o cultivo celular como modelo experimental mostram a importância do uso de linhagens celulares e do tratamento das mesmas *in vitro* na tentativa de elucidar o papel das moléculas envolvidas na regulação da apoptose na LMC.

MRAZ et al. (2009) estudaram a expressão de *TP53* como alvo para miR-29c. Esses pesquisadores avaliaram a expressão de miR-29c em células de LLC com deleção e/ou mutação no gene *TP53* e identificaram padrões de expressão desregulados nessas amostras quando comparados àqueles observados em células *TP53* normais. Esse grupo de pesquisa concluiu que miR-29c está hiporregulado em LLC de subtipo agressivo com anormalidades no gene *TP53*.

Todos esses dados da literatura bem como os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o gene anti-apoptótico *mcl-1* pode ser alvo de miR-29c na LMC. Além disso, são

moléculas de suma importância por estarem envolvidas na regulação da apoptose em células leucêmicas e também por serem reguladas por vias de sinalização como PI3K/AKT, cuja desregulação implicaria em diversas alterações no metabolismo celular como aumento da proliferação e resistência à morte. O fato de *mcl-1* estar aumentado em pacientes em fases avançadas quando comparado aos seus níveis na fase crônica da LMC é interessante uma vez que fases mais evoluídas da doença sugerem maior resistência das células à morte, duplicação do cromossomo Ph e maior resistência à apoptose (DRUKER et al., 2000 e JOHN et al., 2004). É possível sugerir que a elevada expressão de miR-29c observada na fase crônica seja responsável pela menor expressão de *mcl-1* nesses pacientes, o que manteria as células da fase crônica com maiores índices de apoptose e melhor resposta dos pacientes com LMC à terapia com inibidores de tirosinoquinase.

Os resultados referentes à expressão do miR-130b nos pacientes com LMC estão de acordo com os observados no painel de microRNAs, ou seja, tanto na linhagem HL-60.Bcr-Abl positiva quanto nas células obtidas de pacientes com LMC em fase crônica, o miR-130b está *superexpresso* em relação ao grupo controle.

Com relação aos alvos preditos para essas moléculas, o aumento de miR-130b aqui observado foi paralelo ao aumento dos níveis de RNAm de seu alvo *ciap-2*, sugerindo que na LMC esse gene pode ser regulado por outros RNAs não-codificantes ou por diferentes sistemas multiproteicos complexos que *in vivo* regulam os processos de transcrição e tradução.

KREN e cols. (2009) descreveram que miR-130b está relacionado à regulação da função mitocondrial e parece regular apoptose, proliferação e diferenciação celular. A mitocôndria representa o ponto de checagem do controle de apoptose e pode ser ativada por meio da perda do potencial de membrana e aumento da permeabilidade para moléculas pequenas como os miRNAs (KROEMER et al., 2007). O rompimento da mitocôndria pode resultar na inibição da tradução, um dos mecanismos pelos quais os miRNAs modulam a expressão gênica pós-transcricionalmente (GAGLIARDI et al., 2004).

Não é possível dizer o papel que miR-130b exerceu sobre a mitocôndria nas células leucêmicas estudadas, entretanto, podemos especular que na LMC esse miRNA pode ter outros alvos e que *ciap-2* provavelmente não é regulado por essa molécula neste tipo de neoplasia.

Estudos da literatura relatam que o papel de miR-130b na mitocôndria pode ser atribuído à regulação de células iniciadoras de tumor (TIC) por meio do silenciamento de proteína indutora de p53 e que esse microRNA é capaz de aumentar a viabilidade celular, reduzir a apoptose e diminuir a expressão da proteína pró-apoptótica Bim em tumores gástricos, nos quais a expressão de miR-130b foi elevada quando comparada aos tecidos normais [(MA et al. e LAI et al. (2010)].

Outro trabalho da literatura também relacionou miR-130b com p53. YEUNG et al. (2008) mostraram elevada expressão de miR-130b e baixa expressão de p53 em linfócitos de pacientes portadores de HTLV-1 (vírus T-linfotrópicos humanos). Além disso, quando utilizaram antagonistas de miR-130b, a expressão de p53 aumentou, sugerindo que este gene é regulado por miR-130b nessas células. Segundo esses autores, p53 induz a apoptose e dessa forma os achados miR-130b/p53 afetam a proliferação e a sobrevivência de linfócitos infectados pelo HTLV-1. O nosso trabalho não investigou a expressão de p53, sendo assim, não podemos inferir que na LMC esta proteína seja regulada por miR-130b.

A análise do painel de microRNAs mostrou que miR-142-3p está *hipoexpresso* na linhagem HL-60.Bcr-Abl. Este resultado corrobora com o resultado obtido a partir da análise da expressão dessa molécula nas células de pacientes com LMC e grupo controle, uma vez que baixos níveis de miR-142-3p foram observados nas fases avançadas em relação ao grupo controle.

A predição de alvos para miR-142-3p mostrou que o gene anti-apoptóticos *ciap-2* pode ser regulado por esse microRNA. Os nossos resultados foram interessantes porque mostraram que miR-142-3p está diminuído na LMC enquanto *ciap-2* está aumentado, sugerindo que nesse tipo de leucemia miR-142-3p mesmo em baixos níveis pode induzir a transcrição desse gene anti-apoptótico.

CHEN e colaboradores (2004) mostraram que a expressão ectópica de miR-142-3p em células progenitoras hematopoéticas está envolvida na diferenciação de células T, porém sem alterar a produção e diferenciação dos linfócitos B. A diminuição de miR-142-3p observado nas fases avançadas no presente trabalho corrobora com RAMKISSOON e cols. (2006) que demonstraram que miR-142 estava hipoexpresso nas linhagens hematopoéticas tumorais indicando um papel importante desse gene nas doenças hematopoéticas. Nossos dados, entretanto, também corroboram com FLAMANT e cols. (2010) que descreveram uma expressão reduzida de miR-142-3p em pacientes com LMC recém diagnosticados após duas semanas de tratamento com MI. Os resultados de nosso estudo indicam que a baixa expressão de miR-142-3p está associada às fases avançadas da LMC, o que sugere sua participação na progressão da doença.

Dados obtidos após a avaliação da expressão de miR-145 em pacientes com LMC estão de acordo com aqueles resultantes do painel de microRNAs que avaliou a expressão dessas moléculas nas linhagens HL-60.Bcr-Abl e HL-60. No presente estudo, foi observado que a expressão de miR-145 está elevada em pacientes na fase crônica da LMC em relação ao grupo controle, porém baixos níveis dessa molécula foram obtidos no grupo de pacientes nas fases avançadas quando comparada à fase crônica. Os genes apoptóticos *bax*, *nox*, *bcl-2* e *ciap-1* foram dados como alvos preditos de miR-145.

CHO et al. (2011) observaram a hipoexpressão dessa molécula em adenocarcinoma pulmonar e que seu aumento de expressão era capaz de inibir a proliferação celular nesse tumor. Além disso, esse trabalho mostrou que a alteração na proliferação celular não é acompanhada de mudanças no fenótipo de resistência à apoptose nesse tipo de tumor. PONS et al. (2009) descreveram diminuição da expressão de miR-145 em estágios precoces de câncer de mama e cólon, sugerindo a perda desse microRNA na tumorigênese.

Na LMC esse microRNA pode não atuar no desenvolvimento desta neoplasia, uma vez que os níveis de miR-145 em pacientes na fase inicial da LMC estavam aumentados em relação aos indivíduos saudáveis, evento contrário ao que foi descrito por PONS e colaboradores (2009) em outros tipos de câncer.

STARCZYNOWSKI et al. (2011) observaram que a depleção de miR-145 e miR-146a resulta em evolução clonal e aumento da sobrevivência de progenitores hematopoéticos. A deleção dessas duas moléculas resultou em uma doença longa e latente em camundongos. Dessa forma, a reintrodução de miR-145 e miR-146a nas células de LMA induziu a morte celular e preveniu o crescimento celular *in vitro*. Esses pesquisadores confirmaram que esses dois microRNAs são *hiporregulados* em amostras de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) e são potencialmente suprimidos por mecanismos epigenéticos. Além da LMA, estudos prévios do mesmo grupo citado acima mostrou hipoexpressão de miR-145 em pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) com del(5q).

Com base nos achados da literatura, podemos sugerir que a baixa expressão de miR-145 em pacientes nas fases avançadas da LMC sugere vantagem proliferativa e contribui para o fenótipo de resistência dessas células à apoptose.

HAVELANGE et al. (2011) estudaram a integração de miRNA e perfil de expressão de RNAm em pacientes com LMA recém-diagnosticados. Baseado na análise de integração entre essas moléculas, perceberam que miR-145 e miR-26a foram relacionados com genes apoptóticos como, por exemplo, *bim*, sugerindo que estes microRNAs podem induzir apoptose na LMA. Para confirmar esta hipótese, este grupo de pesquisadores transfectaram as linhagem mieloide K562 com os precursores de miR-145 e miR-26a e então avaliaram a apoptose por citometria de fluxo. miR-145 e miR-26a aumentaram a apoptose das células K562 em 1.9 e 2.0 vezes.

O grupo de pesquisa citado acima também avaliou a expressão do gene *bim* nessa linhagem e observaram que a superexpressão de miR-145 resultou numa maior expressão da proteína Bim nas células K562, entretanto, nenhuma alteração foi observada nos níveis de Bim nas células que foram transfectadas com miR-26a (HAVELANGE et al. 2011).

No presente trabalho, a expressão do gene pró-apoptótico *bim* não foi avaliada, entretanto, observamos aumento de miR-26a em pacientes na fase crônica, resultado este que talvez colabore

com a indução da apoptose na LMC uma vez que em células mielóides, este microRNA hiperregula *bim*. Com relação aos achados no trabalho de HAVELANGE et al. (2011) sobre miR-145, podemos inferir que esse microRNA pode regular a expressão de *bim* em células mielóides que estão presentes não somente na LMA como também na LMC, podendo regular *bim* e alterar a apoptose também na leucemia mielóide crônica. OSTENFELD et al. (2010) relata que miR-145 pode ser considerado um indutor de apoptose por ativar as caspases e, dessa forma, atuar como supressor tumoral em câncer de bexiga baseado na indução da morte celular. Estes dados sugerem que o aumento de miR-145 observado no grupo de pacientes com LMC em fase crônica em relação a fase blástica pode ser relacionado ao melhor prognóstico da LMC quando os pacientes são diagnosticados na fase inicial da doença.

O gene *bcl-2* apresentou-se diminuído em pacientes com LMC em fase crônica quando comparado aos níveis de RNAm no grupo controle. Como miR-145 também apresentou esse padrão de expressão, pode ser que na LMC, miR-145 regule a expressão de outros genes ou que *bcl-2* seja regulado por outros microRNAs nesse tipo de leucemia (miR-16, miR-26a e miR-let-7d).

Os níveis de expressão de miR-146a na linhagem Bcr-Abl⁺ estavam 10 vezes mais elevados do que na linhagem HL-60. Este resultado é discrepante com aquele obtido nas análises do perfil de miR-146a nos pacientes com LMC, cuja expressão apresentou-se baixa nos pacientes nas fases avançadas da doença quando comparada com os níveis desse microRNA no grupo controle. Considerando que a linhagem HL-60.Bcr-Abl em questão não foi tratada com inibidores de TK, tal diferença de expressão pode ser devido à presença dos inibidores de TK nas células de pacientes com LMC nas fases tardias, pois a inibição da TK por esse medicamento pode interferir na expressão de miR-146a.

A predição de alvos para miR-146a *in silico* não apresentou genes relacionados à regulação da morte celular, entretanto, essa molécula foi estudada devido aos interessantes achados na literatura que relacionaram o miR-146a com a resposta de pacientes com LMC ao MI.

A expressão de miR-146a tem sido avaliada em leucemias agudas e crônicas (WANG et al., 2010 e FLAMANT et al., 2010). Em leucemias agudas, tanto linfóide como mielóide, a expressão de miR-146a é inversamente relacionada à sobrevida global dos pacientes, o que sugere que os níveis de expressão dessa molécula possui valor prognóstico nessas neoplasias. WANG e cols. (2010) obtiveram dados *in silico* sobre processos biológicos nos quais miR-146a está envolvido e encontraram que esse miRNA está associado à regulação negativa da apoptose e ciclo celular, o que explicaria sua ligação com a pior sobrevida dos pacientes leucêmicos.

A avaliação dos níveis de miR-146a em pacientes com LMC em fase crônica pós-tratamento com mesilato de imatinibe em trabalho recente mostrou que a expressão dessa

molécula aumenta após duas semanas de tratamento com MI (FLAMANT et al., 2010). Considerando os resultados obtidos no presente estudo pela comparação entre fase crônica e fases avançadas da LMC, foi possível observar que miR-146a estava mais expresso no primeiro grupo, o que corrobora com o trabalho da literatura supracitado, uma vez que nossos pacientes são tratados com mesilato de imatinibe.

É importante ressaltar aqui que não foi possível checarmos a expressão proteica dos alvos preditos para confirmarmos a relação entre microRNA e seu gene alvo. Assim sendo, observamos apenas a expressão do RNAm dos genes preditos como alvos, o que implica nos resultados que mostram apenas a regulação parcial dos alvos apoptóticos pelos microRNAs estudados.

Os achados do presente estudo e da literatura sugerem que os microRNAs são novos alvos epigenéticos no desenvolvimento do câncer e que a desregulação dessas moléculas por proteínas oncogênicas e de fusão expressas durante o curso das doenças hematopoéticas como a LMC é potencialmente relevante na patogênese das leucemias (SLAVOV et al., 2010).

V.3. Perfil de expressão de genes anti-apoptóticos na LMC

Os genes anti-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* e *mcl-1* apresentaram expressão diferencial nos pacientes com LMC em fase crônica (FC) e/ou avançadas (FA) em relação aos controles e/ou quando comparamos a expressão dessas moléculas em pacientes nas diferentes fases dessa neoplasia.

O gene anti-apoptótico *a1* estava elevado nos pacientes com LMC em relação ao grupo controle. Uma característica comum das proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 é o seqüestro de proteínas pró-apoptóticas da mesma família como, por exemplo, o seqüestro de Bax e Bak pela proteína A1 (TAO et al., 1997).

Além de atuar no seqüestro de Bax e Bak, parece que A1 interage também com outras proteínas pró-apoptóticas como Bid, Bim e Puma (CERTO et al., 2006). De acordo com esses dados da literatura podemos inferir que o aumento de *a1* na LMC favoreça o seqüestro de proteínas pró-morte culminando com a resistência das células Bcr-Abl⁺ à apoptose.

A transcrição de *a1* é regulada por GM-CSF, LPS, NF-κB e por linfócitos B que expressam CD40. É conhecido na literatura que CD40 e as vias de sinalização PI3K e ERK, induzem NF-κB e consequentemente a transcrição de *a1* (MORGAN et al., 2004). Os níveis de expressão dos fatores transcricionais citados acima não foram verificados no presente trabalho, entretanto, podemos sugerir que a elevada expressão de *a1* em nossos pacientes esteja relacionada ao aumento dessas moléculas nas células Bcr-Abl1 positivas.

Altos níveis de *a1* já foram descritos em outros tipos de doenças hematopoéticas. Na LLC, elevada expressão de *a1* foi correlacionada com casos mais severos da doença, indicando que esta molécula tem um papel no prognóstico desse tipo de leucemia (NAGY et al., 2003). Dados da literatura também mostram que altos níveis de RNAm de *a1* estão presentes em células do linfoma do manto (NAGY e cols., 2003) e no linfoma de células-B (PIVA et al., 2006).

Outros tipos de neoplasias malignas como câncer de estômago, cólon, mama, pulmão, ovário, próstata, carcinomas (hepatocelular e oral) e melanoma apresentaram altos níveis de *a1* em amostras de tumores avançados sugerindo a associação desta molécula com o avanço e metástase das doenças supracitadas (VOGLER 2012).

Com base nos achados da literatura, é possível inferir que o aumento de *a1* em pacientes com LMC pode ser associado ao mau prognóstico e evolução da doença, uma vez que pacientes nas fases avançadas apresentaram maiores índices de expressão dessa molécula. Além disso, a elevada expressão de *a1* pode ser responsável pela resistência das células leucêmicas da LMC à morte.

O gene anti-apoptótico *bcl-2* também se apresentou mais expresso na LMC quando comparamos com o grupo controle. Um estudo da literatura revela que além de bloquear a apoptose pela via intrínseca ou mitocondrial, a proteína Bcl-2 mantém o status redox intracelular, ou seja, pode regular a respiração mitocondrial por meio da interação com a via COX Va (uma subunidade da enzima citocromo c oxidase). Sendo assim, Bcl-2 modula os níveis de ROS (espécies reativas do oxigênio), o que é diferente de sua função convencional de sequestrar proteínas pró-apoptóticas (CHEN e PERVAIZ 2009). É importante ressaltar que o papel de Bcl-2 na mitocôndria independe da atividade inibitória de Bax/Bak e de sua prevenção da permeabilização da membrana mitocondrial (KRISHNA et al., 2011).

A regulação dos níveis de ROS intracelulares por Bcl-2 pode determinar o destino da célula. A molécula ROS tem sido considerada um agente de morte por desencadear o dano oxidativo dos ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, induzindo a célula à apoptose (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Por outro lado, baixos níveis de ROS não possuem efeito deletério às células, entretanto, favorece um microambiente de sobrevivência e proliferação.

Com base nos relatos da literatura, é possível inferir que o aumento de *bcl-2* observado nos nossos pacientes com LMC pode aumentar o sequestro de proteínas pró-apotóticas como Bak/Bax e alterar a respiração mitocondrial nas células leucêmicas, culminando com o aumento da proliferação celular observado em neoplasias malignas e com a resistência das células Bcr-Abl1 positivas à morte.

Segundo NAUGHTON e cols. (2009), ROS possui um papel anti-apoptótico e segundo esses autores, a quinase Bcr-Abl ativa a sinalização celular anti-apoptótica dependente de ROS,

ou seja, desencadeia a ativação de Akt e GSK3 β e seus efetores *downstream*, beta-catenina e Mcl-1. Com base nessa observação, sugerimos que na LMC a quinase Bcr-Abl pode induzir a resistência das células leucêmicas à morte por meio de ROS e da indução de moléculas como Akt e Mcl-1.

O conhecimento sobre o papel não-canônico de Bcl-2, ou seja, a regulação da respiração mitocondrial por esse molécula é bastante relevante na clínica devido à relação que ROS possui com a instabilidade genômica e transformação celular. Dessa forma, estratégias terapêuticas que envolvam antagonistas de Bcl-2 podem ser úteis no tratamento de malignidades.

De acordo com HUANG et al. (1997), a proteína Bcl-2 possui um papel na manutenção das células em estado quiescente. Este dado corrobora com o trabalho de WILLIMOTT e cols. (2007), cujo estudo mostrou uma superexpressão de Bcl-2 em células de LLC quiescentes, baixos níveis de Bcl-2 e substituição dessa molécula por Bcl-x_L, Mcl-1 e A1 em células que estavam em fase de proliferação. Esses dados sugerem que assim como na LLC, as células Bcr-Abl1⁺ podem depender de baixos níveis de Bcl-2 para que se proliferem. Dessa forma, podemos inferir que a alta expressão de *bcl-2* observada no nosso trabalho contribui para a manutenção de células quiescentes na LMC culminando com um pior prognóstico dos pacientes.

AMARANTE-MENDES et al. (1998) observaram uma regulação negativa de *bcl-2* nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl, resultado este que mostra que Bcr-Abl é uma molécula anti-apoptótica potente e que atua independentemente de Bcl-2. Esses dados da literatura sugerem que o aumento de *bcl-2* obtido na LMC no presente estudo não esteja relacionado com a expressão do oncogene *bcr-abl1* nos pacientes estudados.

Os pacientes com LMC em fase crônica apresentaram elevada expressão do gene anti-apoptótico *c-flip*, entretanto a expressão dessa molécula foi menor em pacientes nas fases avançadas da doença. O aumento dos níveis de c-Flip foi relatado na LLC por LAGNEAUX et al. (2007). Estes pesquisadores associaram a resistência das células à apoptose induzida por TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) à baixa expressão de receptores de morte e à elevada expressão de *c-flip*, o que resulta na prevenção da ativação da caspase-8.

De acordo com a literatura, podemos inferir que o aumento de *c-flip* no pacientes com LMC e por ventura baixos níveis de receptores de morte de superfície podem estar relacionados ao aumento da sobrevivência das células leucêmicas quando a apoptose for induzida por TRAIL.

O aumento de *c-flip* observado no nosso trabalho corrobora com o estudo de DAVIDS e STEENSMA (2010). Este grupo avaliou pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD), um grupo de doenças neoplásicas da medula óssea que se caracteriza pela morfologia celular anormal e defeitos na diferenciação e proliferação das células hematopoéticas precursoras. O estudo revela que pacientes com SMD em estágio precoce apresentam altos níveis das proteínas pró-apoptóticas

Bax e Bad em suas células CD34⁺ enquanto que pacientes que progrediram para leucemia mieloide aguda (LMA) têm aumento dos níveis de proteínas anti-apoptóticas como c-Flip e Bcl-2. A progressão para LMA tem sido relacionada também ao aumento do fator de transcrição NFκB, o qual contribui para a inibição da apoptose e induz a proliferação celular.

Estes dados sugerem e permite-nos especular que na LMC a desregulação dos genes *c-flip* e *bcl-2* pode estar relacionada à progressão da doença para a fase acelerada e crise blástica e que o fator de transcrição NFκB pode ser responsável pelo aumento dos níveis dessas moléculas culminando com a inibição da morte celular e aumento da proliferação das células leucêmicas.

O nosso trabalho mostrou aumento dos genes anti-apoptóticos *ciap-1* e *ciap-2* nas fases avançadas e crônica da LMC, respectivamente. MUNZERT et al. (2002) avaliou a expressão de moléculas inibidoras da apoptose (IAPs) em LLC. Esses autores verificaram os níveis de *xiap*, *survivina*, *naip*, *ciap-1* e *ciap-2* em linfócitos B de pacientes com LLC e em linhagens celulares de linfoma. Os resultados obtidos neste trabalho da literatura corroboram com os dados do nosso estudo, uma vez que MUNZERT e colaboradores observaram níveis maiores de *ciap-1* e *ciap-2* nas células B de LLC e nas linhagens obtidas de linfoma em relação ao grupo controle.

Um estudo recente da literatura avaliou o efeito de uma nova droga (ABT-737) inibidora de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-x_L sobre a apoptose de células K562 (AIRIAU et al., 2012). Estes autores mostraram que essa droga aumenta a apoptose induzida por mesilato de imatinibe (MI) por meio da hiporregulação de IAPs e sensibilização das células CD34⁺. Relevante achado, visto que se sabe que o MI é incapaz de induzir a apoptose na população de células-tronco leucêmicas, apesar de inibir a atividade quinase no mesmo grupo de células (CORBIN et al., 2011). A atividade das proteínas inibidoras da apoptose exerce papel importante na sensibilidade de células Bcr-Abl⁺ aos TKIs. Membros dessa família de proteínas são conhecidos pela sua atividade anti-caspase, ou seja, essas proteínas se ligam às pró-caspases 3 ou 7 e assim inibem a clivagem e a ativação dessas moléculas (WALSH et al., 2008).

AIRIAU et al. (2012) descrevem que a diminuição das proteínas inibidoras da apoptose em células Ph⁺ induzida por MI está relacionada à inibição do fator de transcrição das IAPs (NFκB), cuja ativação pode ser por meio de Bcr-Abl.

Com base nos relatos da literatura, podemos sugerir que o aumento de *ciap-1* e *ciap-2* nas diferentes fases da LMC podem inibir a ativação das caspases e aumentar a resistência das células Ph⁺ à apoptose. No presente trabalho, não foram realizados ensaios para verificar a apoptose, contudo, é possível inferir por meio da elevada expressão dessas moléculas que o mesilato de imatinibe pode não ter sido suficiente para induzir a apoptose nas células dos nossos pacientes.

Com base em todos esses dados, é possível sugerir que a combinação de MI com o inibidor ABT-373 pode ser interessante para aumentar a apoptose induzida por TKIs em

neoplasias onde o mecanismo de morte celular é consequência de modificações das proteínas da família Bcl-2 como é o caso da LMC.

O gene anti-apoptótico *mcl-1* é um membro bem caracterizado da família Bcl-2 que tem sido implicado na patogênese de várias neoplasias mielóides (KOZOPAS et al., 1993). No presente estudo esta molécula está *hiperexpressa* nos pacientes com LMC em fases avançadas em relação ao grupo controle e ao grupo de pacientes na fase crônica da doença. Este dado contradiz os resultados obtidos por AICHBERGER e colaboradores (2005). Este grupo de pesquisadores investigou a expressão de *mcl-1* em células de LMC e em linhagens Bcr-Abl⁺. Os resultados mostraram que independente da fase da doença, as células expressaram altos níveis de *mcl-1* e que após o tratamento das células com mesilato de imatinibe, a expressão dessa molécula diminuiu.

AICHBERGER et al. (2005) observaram que após tratar as células leucêmicas com um oligonucleotídeo antagonista de Mcl-1, a sensibilidade dessas células ao mesilato de imatinibe aumentou, dado este que sugere um papel importante de Mcl-1 na sobrevivência celular e a torna um interessante alvo na LMC. Sendo assim, o aumento de *mcl-1* em nossos pacientes pode interferir na sensibilidade das células ao tratamento com MI e conferir resistência das células à morte.

A expressão constitutiva de Mcl-1 nas células leucêmicas primárias é de particular interesse, pois esta molécula é inicialmente alterada na presença de neoplasias mielóides (KOZOPAS et al., 1993). Nosso resultado corrobora com AICHBERGER et al. (2005) no sentido de que *mcl-1* está mais expresso em LMC independente da fase da doença, sugerindo que este gene seja superregulado na fase inicial da leucemogênese do clone leucêmico.

AICHBERGER e colaboradores (2005) investigaram o papel de *bcr-abl1* na expressão de *mcl-1* e encontraram que mesilato de imatinibe hiporregula a expressão do gene anti-apoptótico nas células de LMC em fase crônica. Esse achado pode explicar a baixa expressão de *mcl-1* nos nossos pacientes em fase crônica e a elevada expressão desse gene nas fases avançadas da doença, dessa forma podemos inferir que Bcr-Abl promove a expressão de *mcl-1* nas células leucêmicas.

As vias de sinalização celular como STAT5, PI3K/Akt e RAS/RAF/MEK/ERK são importantes por regularem a hiperexpressão de *mcl-1* induzida por GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) em linhagens celulares de leucemias. AICHBERGER et al. (2005) mostraram que as vias de sinalização dependentes de MEK e STAT5 podem contribuir para a expressão de *mcl-1* dependente de Bcr-Abl nas células leucêmicas. A alta expressão de *mcl-1* nos pacientes com LMC aqui estudados pode estar relacionada à ativação das vias de sinalização supracitadas pela oncoproteína Bcr-Abl e pelo fator estimulador de colônia GM-CSF.

AICHBERGER et al. (2005) investigaram o papel de Mcl-1 na LMC e a hipótese de esta molécula se um potencial alvo terapêutico. Após a inibição quase completa de Mcl-1 depois da transfecção de células K562 com seu antagonista, esses pesquisadores observaram que tais células

foram menos viáveis e morreram por apoptose em níveis mais elevados do que o ensaio controle. Esses dados sugerem que Mcl-1 é importante na sobrevivência das células Ph⁺ e um interessante alvo na LMC.

Em resumo, a elevada expressão dos genes anti-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* e *mcl-1* nos grupos de pacientes com LMC contribui para a resistência à apoptose das células leucêmicas e sugere que essas moléculas são potenciais alvos terapêuticos e fatores prognósticos dessa doença.

V.4. Perfil de expressão de microRNAs e genes anti-apoptóticos conforme resposta dos pacientes à terapia com mesilato de imatinibe

Para associar a expressão de microRNAs com a resposta ao MI e a resistência à apoptose, foi quantificada a expressão dessas moléculas em pacientes com LMC que alcançaram RCC e resistentes ao MI.

O mesilato de imatinibe (MI) apresenta mecanismo de ação específico por atuar diretamente no alvo molecular, a enzima Bcr-Abl, e é utilizado como primeira linha de tratamento da LMC. O MI é capaz de induzir resposta hematológica completa (RHC) em 96% dos pacientes com LMC, resposta molecular maior (RMM) em 87% e RCC em 76% dos casos após 19 meses de tratamento (AN et al., 2010). Apesar do tratamento com MI induzir resposta citogenética completa na maioria dos pacientes e baixas taxas de recaída da doença, alguns pacientes apresentam resistência e/ou intolerância a esse fármaco (AN et al., 2010). Os pacientes incluídos no presente estudo apresentam resistência primária (definida como ausência de resposta ou a perda de resposta durante o tratamento ou não remissão citogenética completa em 12 meses de tratamento com MI) ao mesilato de imatinibe, o que é tido como o maior problema da terapia com MI, particularmente nas fases mais avançadas da LMC. A resistência ao MI pode ser resultado de pontos de mutação na quinase Bcr-Abl, prejudicando a ligação do MI no domínio Abl da quinase. Um exemplo clássico de mutação é a T315I, resultante da substituição do aminoácido treonina por uma isoleucina na posição 315 da porção Abl da proteína Bcr-Abl1 (MANCINI et al., 2011). É conhecido que a resistência clínica ao MI está associada à presença de mutações pontuais no domínio quinase de Bcr-Abl e amplificação do oncogene *bcr-abl1* (AN et al., 2010). Os níveis plasmáticos inadequados do fármaco, aderência incompleta do paciente ao tratamento e aumento do efluxo da droga de dentro da célula são fatores independentes de Bcr-Abl1 que contribuem para a resistência ao MI (AN et al., 2010).

O presente trabalho associa a alteração da expressão de genes envolvidos na apoptose com a expressão de miRNAs e a resistência ao MI. Nesse estudo foi observado que 32 pacientes com

LMC tratados com mesilato de imatinibe apresentaram RCC e 43 foram resistentes ao medicamento. Este mesmo grupo de pesquisa, em 2007, observou que genes anti-apoptóticos como *bcl-x_L*, *c-flip* e *mcl-1* estão mais expressos em LMC em relação ao grupo controle. Considerando que miRNAs regulam a expressão gênica, podemos inferir que a elevada expressão de *a1*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-2* e *mcl-1* e a baixa expressão de *let-7d*, *miR-16*, *miR-26a*, *miR-29c* e *miR-142-3p* observada neste estudo seja um indício de que esses microRNAs regulam os genes anti-apoptóticos supracitados. Dessa forma, sugerimos que na LMC, a alteração da expressão desses microRNAs pode estar relacionada à regulação da morte celular, culminando com a resistência das células leucêmicas mielóides à apoptose.

Um fator importante a ser considerado no contexto de resistência ao MI é o fato de que essa droga não mata a célula-tronco leucêmica e 95% dos pacientes que alcançaram RCC após serem tratados com MI retém níveis detectáveis de Bcr-Abl (STUART et al., 2009). Os eventos celulares que levam à evolução da LMC da fase crônica para a blástica e/ou a rápida evolução clonal de células resistentes ao MI ainda não foram completamente elucidados. Contudo, parece provável que durante a fase crônica prolongada, ocorre um acúmulo de mutações genéticas que auxiliam na seleção natural de uma população celular com maior potencial de malignidade (STUART et al., 2009). Esses eventos nos levam a crer que a aquisição do potencial de autorrenovação pela célula progenitora granulocítica e sua habilidade de funcionar como uma célula-tronco leucêmica podem ser aspectos importantes na progressão da LMC e na maior resistência dos blastos ao MI. Apesar das alterações genéticas responsáveis por essa transformação da célula progenitora granulocítica não serem bem explicadas na literatura, há a hipótese de que seja resultado do aumento de beta-catenina (β -catenina) nessas células (STUART et al., 2009).

Esta proteína atua como um fator importante para a autorrenovação da célula progenitora granulocítica e sua inibição diminui o potencial de renovação dessas células, induzindo a progressão de doenças mieloproliferativas.

STUART e cols. (2009) relatam que a via da β -catenina é uma das mais desreguladas na crise blástica da LMC e, sendo assim, é possível especular sobre o envolvimento dessa proteína na progressão da LMC e sugerir que o papel dessa molécula seja relacionado à propriedade de autorrenovação conferidas pela β -catenina à célula progenitora granulocítica durante os estágios avançados da doença. Apesar de não ter sido avaliado o perfil de β -catenina no presente estudo, pode ser que pacientes com LMC apresentem elevados níveis dessa proteína, colaborando para a evolução de pacientes da fase crônica para a crise blástica e à aquisição de resistência ao MI.

Um trabalho recente mostrou que além de mutações na quinase Bcr-Abl1 e/ou a sua superexpressão serem fatores importantes na resistência de células Ph positivas ao MI, o nível de

expressão do fator de transcrição STAT5 é outro parâmetro determinante da sensibilidade de células Bcr-Abl⁺ aos TKIs (WARSCH et al., 2011). Segundo esses autores, essas células expressaram níveis elevados de STAT5 e apresentaram menor sensibilidade à morte celular induzida por MI tanto *in vitro* quanto *in vivo*. WARSCH et al. (2011) relataram que o RNAm de STAT5 e os níveis protéicos aumentam em pacientes com LMC tratados com MI que estão evoluindo para fases avançadas da doença. Sendo assim, esses pesquisadores sugerem que a progressão da LMC induz à *superregulação* de STAT5, o que pode ser explicado em partes pela seleção clonal de células com elevada expressão de STAT5.

O presente estudo não avaliou a expressão de STAT5 nos pacientes com LMC, porém, é possível que a resistência dos pacientes ao MI seja resultado do aumento da transcrição de STAT5 nas células Bcr-Abl⁺ dos pacientes nas fases acelerada e blástica. Esses aspectos sugerem que STAT5 pode ser um alvo importante na superação da resistência de células Bcr-Abl⁺ ao MI.

Nesse contexto de resistência ao MI, a expressão de microRNAs e genes anti-apoptóticos foi avaliada no grupo de pacientes que alcançaram RCC após o tratamento com MI bem como naqueles que foram resistentes a esse inibidor de TK. Ao avaliarmos a expressão de *ciap-1* e *mcl-1*, observamos que em pacientes resistente ao MI, os níveis dessas moléculas estavam baixos. Foi possível notar que os níveis dos microRNAs hsa-miR-26a, hsa-miR-29c, hsa-miR-130b e hsa-miR-146a estavam menos expressos nas células de pacientes resistentes ao MI quando comparados ao grupo de pacientes que alcançaram RCC após o tratamento com esse TKI. Considerando que miR-26a tem como alvo predito *bcl-2* e *c-flip* e miR130b possui *ciap-2* como alvo obtido pela análise *in silico* e que estes genes alvos preditos não apresentaram diferença significativa quando comparamos o grupo de pacientes que alcançaram RCC com o grupo resistente ao MI, inferimos que nos pacientes resistentes, a expressão de *bcl-2*, *c-flip* e *ciap-2* pode ser regulada por outros miRNAs. A baixa expressão dos genes anti-apoptóticos *ciap-1* e *mcl-1* nos pacientes resistentes ao MI sugere que pelo menos nesse grupo de pacientes, estes genes não sejam responsáveis pela resistência das células leucêmicas da LMC à apoptose. O gene *mcl-1* é tido como alvo predito para miR-29c. Sendo assim, a baixa expressão de ambas as moléculas nos pacientes resistentes sugere que neste grupo de pacientes *mcl-1* pode ser regulado por outro miRNA e que miR-29c pode atuar na regulação de outros genes alvos.

Nossos ensaios mostraram que os genes alvos de miR-26a e miR-29c (*bcl-2*, *ciap-2* e *mcl-1*) preditos *in silico* estavam mais expressos em LMC quando comparados ao grupo controle. Estes resultados sugerem que a diminuição desses microRNAs em pacientes resistentes ao MI e a elevada expressão dos genes alvos anti-apoptóticos de forma geral na LMC pode ter um efeito inibitório da apoptose e na leucemogênese, uma vez que esse processo é modulado por essas moléculas.

BURCHERT e cols. (2005) mostraram que a via de sinalização PI3k/Akt/mTor se torna ativada na linhagem LAMA84 (Bcr-Abl⁺) quando tratadas com MI, induzindo nessas células uma resistência ao MI independente de Bcr-Abl. A via fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K)-Akt está envolvida na transformação maligna das células Bcr-Abl positivas e sua resistência ao MI, dessa forma, esses autores sugerem que o bloqueio de PI3k/Akt pode ter efeito sinérgico ao MI na inibição de Bcr-Abl1. Essa resistência ao MI pode resultar da atividade das vias *downstream* de Bcr-Abl, conferindo às células uma sobrevivência aumentada após a inibição da tirosinoquinase. É possível especular que uma ativação da via Akt ou mTor pode contribuir para a resistência ao MI independentemente da ativação de Bcr-Abl1. Sendo assim, a persistência das células Bcr-Abl positivas nos pacientes resistentes ao MI aqui avaliados pode ser resultado da inibição da via PI3k/Akt/mTor por esse medicamento, o que proporciona a evolução da LMC. Dessa forma, podemos sugerir que o uso de inibidores de mTor em combinação com MI parece ser uma alternativa adequada para o tratamento da LMC antes do aparecimento de resistência dependente de Bcr-Abl.

Em conjunto, esses dados levantam a hipótese de que a tirosinoquinase Bcr-Abl pode modular a expressão de microRNAs e que essas moléculas parecem participar da fisiopatologia da LMC alterando a expressão de genes reguladores da apoptose celular.

VI. CONCLUSÕES

- A análise global dos microRNAs na linhagem HL-60.Bcr-Abl mostrou que 30 microRNAs foram diferencialmente expressos. Quinze microRNAs (miR-222, miR-145, miR-96, miR-let-7e, miR-16, miR-21, miR-26a, miR-130b, miR-132, miR-324-5p, miR-130a, miR-15b, miR-30, miR-26b e miR-326) estavam hiperexpressos e quinze estavam hipoexpressos. São eles: miR-133a, miR-106, miR-181c, miR-141, miR-150, miR-98, miR-125b, miR-142-3, miR-200a, miR-155, miR-let-7d, miR-302d, miR-204, miR-99a e miR-203.
- A análise *in silico* para predição de alvos de microRNA relacionados à apoptose mostrou que os microRNAs diferencialmente expressos na linhagem HL-60.Bcr-Abl possuem alvos pró-apoptóticos e anti-apoptóticos como alvos preditos. A predição para pró-apoptóticos inclui: *bmf*, *bcl-w*, *bax*, *nox*, *bid*, *bik*, *fasL*, *bim_{EL}*, *fas*, *puma*, *bak* e *bad*. Os genes alvos anti-apoptóticos preditos são: *bcl-2*, *ciap-1*, *ciap-1* e *c-flip*.
- O tratamento da linhagem HL-60.Bcr-Abl com mesilato de imatinibe (MI) interferiu na expressão de miR-145e por aumentar seus níveis e diminuiu os níveis de miR-21.
- O tratamento das células HL-60.Bcr-Abl com dasatinibe (DAS) modulou a expressão de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-30e, miR-130a e miR-142-3p.
- Nilotinibe (NIL) modulou de forma positiva a expressão de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-130a e miR-145 e de forma negativa os níveis de miR-let-7d e miR-21.
- Os inibidores de tirosinoquinase MI, DAS e NIL modularam a expressão de miR-let-7d, miR-15a, miR-130a, miR-145, miR-let-7e, miR-16, miR-21, miR-30e, miR-142-3p, miR-130a e miR-145. A atividade quinase de Bcr-Abl parece ser importante na regulação expressão desses microRNAs.
- Pacientes com LMC apresentaram elevada expressão de miR-15a, miR-130b e miR-145 e baixos níveis de miR-16, miR-26a e miR-146a.
- Pacientes com LMC nas fases avançadas da doença apresentam baixos níveis de miR-let-7d, miR-16, miR-142-3p, miR-145 e miR-146a quando comparados com o grupo controle.
- Baixa expressão de miR-let-7d, miR-15a, miR-16, miR-29c, miR-142-3p, miR-145 e miR-146a foram observadas em pacientes com LMC nas fases avançadas quando comparados com o grupo de pacientes na fase crônica da doença.
- Pacientes com LMC resistentes ao tratamento com MI apresentaram baixa expressão de miR-26a, miR-29c, miR-130b e miR-146a.

- Os genes anti-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1* e *ciap-2* apresentaram elevada expressão nos pacientes com LMC em fase crônica quando comparados com o grupo controle.
- Pacientes com LMC em fases avançadas apresentaram baixa expressão de *c-flip* e elevada expressão de *a1*, *ciap-1* e *mcl-1* quando comparados com o grupo controle e de pacientes em fase crônica.
- Pacientes resistentes ao MI apresentaram baixos níveis de RNAm dos genes anti-apoptóticos *ciap-1* e *mcl-1* quando comparados com o grupo de pacientes que alcançou remissão citogenética completa.
- O microRNA-let-7d parece regular a expressão do gene anti-apoptótico *a1* em pacientes com LMC em fases avançadas.
- A expressão do gene *bcl-2* parece ser regulada pelo miR-16 nas células de pacientes com LMC na fase crônica.
- O miR-26a parece regular os níveis de RNAm de *bcl-2* e *ciap-2* nas células de pacientes com LMC na fase crônica.
- Pacientes com LMC em fases avançadas parecem ter a expressão de *mcl-1* regulada pelo miR-29c.
- A elevada expressão dos genes anti-apoptóticos *a1*, *bcl-2*, *c-flip*, *ciap-1*, *ciap-2* e *mcl-1* na LMC pode estar relacionada à resistência das células leucêmicas presentes na leucemia mielóide crônica à apoptose.
- Os dados obtidos sugerem que a tirosinoquinase Bcr-Abl1 modula a expressão de microRNAs que possuem como genes alvos moléculas envolvidas na regulação da apoptose de linhagens celulares Bcr-Abl positivas e em células de pacientes com LMC.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Jun; 7(6):441-53.
- [2] Deininger MW, Vieira S, Mendiola R et al. BCR-ABL1 tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2000 Apr; 60(7):2049-55.
- [3] Perrotti D, Neviani P. From mRNA metabolism to cancer therapy: chronic myelogenous leukemia shows the way. *Clin Cancer Res*. 2007 Mar; 13(6):1638-42.
- [4] Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. *Oncology*. 1999 Feb; 13(2):169-80.
- [5] Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *The lancet*. 2007 Jul; 370 (9584):342-50.
- [6] Heaney NB, Holyoake TL. Therapeutic targets in chronic myeloid leukaemia. *Hematol Oncol*. 2007 Jun; 25(2):66-75.
- [6] Cotta CV, Bueso-Ramos CE. New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Diagn Pathol*. 2007 Feb; 11(1):68-78.
- [7] Michor F. Chronic myeloid leukemia blast crisis arises from progenitors. *Stem Cells*. 2007 May; 25(5):1114-8.
- [8] Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S. New treatment approaches for chronic myelogenous leukemia. *Semin Oncol*. 2000 Oct; 27(5):578-86.
- [9] Kalidas M, Kantarjian H, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia. *JAMA*. 2001 Aug; 286(8):895-8.
- [10] Goldman J. Implications of imatinib mesylate for hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Hematol*. 2001 Jul; 38 (3 Suppl 8):28-34.
- [11] Arcese W, Iori AP, Di Nucci G et al. What does one do for the chronic myelogenous leukemia patient in relapse after allogeneic bone marrow transplantation? *Leuk Lymph*. 1993. 11 Suppl 1:213-9.
- [12] Levenga H, Woestenenk R, Schattenberg AV et al. Dynamics in chimerism of T cells and dendritic cells in relapsed CML patients and the influence on the induction of alloreactivity following donor lymphocyte infusion. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Sep; 40(6):585-92.

- [13] Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Jun; 7(6):441-53.
- [14] Ferreira AF. Efeitos dos inibidores de TK na maquinaria apoptótica na LMC, Dissertação de mestrado, DACTB, FCFRP-USP, 98p, 2007.
- [15] Buchdunger E, Cioffi CL, Law N et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits *in vitro* signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol Exp Ther*. 2000 Oct; 295(1):139-45.
- [16] Deininger MWN, Goldman JM, Lydon N et al The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood*. 1997 Nov; 90(9):3691-8.
- [17] Kantarjian HM, Talpaz M, O'BRIEN S et al. Imatinib mesylate for Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon-alpha: follow-up results. *Clin Cancer Res*. 2002 Jul; 8(7):2177-87.
- [18] Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: still a few questions. *Exp Hematol*, 2004 Jan; 32(1):2-10.
- [19] Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW et al. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2007 May; 7(5):345-56.
- [20] Druker BJ, Lydon N.B. Lessons learned from the development of abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest*. 2000 Jan;105(1):3-7.
- [21] John AM, Thomas NSB, Mufti GJ et al. Target therapies in myeloid leukemia. *Semin Cancer Biol*. 2004 Feb;14(1):41-62.
- [22] Van Etten RA. Mechanisms of transformation by the *BCR-ABL* oncogene: new perspectives in the post-imatinib era. *Leuk Res*. 2004 May; 28 Suppl 1:S21-8.
- [23] Olavarria E & Apperley JF. Haematology education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association, Haematology education. v.1, p.230-238, Vienna, 2007.
- [24] Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood*. 2006 Dec; 108(12):3646-53.
- [25] Lamy P, Andersen CL, Dyrskjot L et al. Are microRNAs located in genomic regions associated with cancer? *Br J Cancer*. 2006 Nov; 95(10):1415-8.

- [26] Yu J, Wang F, Yang GH. et al. Human microRNA clusters: Genomic organization and expression profile in leukemia cells lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Oct; 349(1):59-68.
- [27] Zhang L, Huang J, Yang N et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun; 103(24):9136-41.
- [28] Venturini L, Battmer K, Castoldi M et al. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia CD34⁺ cells. *Blood*. 2007 May; 109(10):4399-405.
- [29] Di Leva G, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006 Jun; 78(2):180-9.
- [30] Vella MC, Slack FJ. C. elegans microRNAs. *WormBook*. 2005 Sep; 21:1-9.
- [31] Calin GA, Liu CG, Sevignani C et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug; 101(32):11755-60.
- [32] Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet*. 2005 Apr; 14 Spec No 1:R121-32.
- [33] He H, Cai L, Skogerbø G et al. Profiling *Caenorhabditis elegans* non-coding RNA expression with a combined microarray. *Nucleic Acids Res*. 2006 May; 34(10):2976-83.
- [34] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M et al. MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb; 103(7):2464.
- [35] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov; 99(24):15524-9.
- [36] Zanette DL, Rivadavia R, Molfetta GA. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res*. 2007 Nov; 40(11):1435-40.
- [37] Metzler M, Wilda M, Busch K et al. High expression of precursor microRNA-155/BIC in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004 Feb; 39(2):167-9.
- [38] Agirre X, Jiménez-Velasco A, San José-Enériz E et al. Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34⁺ cells increases USF2-mediated cell growth. *Mol Cancer Res*. 2008 Dec; 6(12):1830-40.

- [39] Zhao H, Wang D, Du W et al. MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010 Jun; 74(3):149-55.
- [40] Rathmell JC, Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*. 2002 Apr; 109 Suppl:S97-107.
- [41] Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res*. 1999 Sep; 32(9):1053-61.
- [42] Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 2003 Jan; 39(11):615-47.
- [43] Irmeler I, Thome M, Hahne M et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997 Jul; 388(6638):190-5.
- [44] Brumatti G, Weinlich R, Chehab CF et al. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. *FEBS Lett*. 2003 Apr; 541(1-3):57-63.
- [45] Pendergast AM, Gishizky ML, Havlik MH et al. SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Mol Cell Biol*. 1993 Mar; 13(3):1728-36.
- [46] Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1995 Oct; 15(10):5531-41.
- [47] Deininger M, Goldman J, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Nov; 96(10):3343-56.
- [48] Frazer R, Irvine AE, McMullin MF. Chronic Myeloid Leukaemia in the 21st century. *Ulster Med J*. 2007 Jan; 76(1):8-17.
- [49] Gutierrez-Castellanos S, Cruz M, Rabelo L et al. Differences in BCL-X(L) expression and STAT5 phosphorylation in chronic myeloid leukaemia patients. *Eur J Haematol*. 2004 Apr; 72(4):231-8
- [50] Handa H, Hegde UP, Kotelnikov VM et al. Bcl-2 and c-myc expression, cell cycle kinetics and apoptosis during the progression of chronic myelogenous leukemia from diagnosis to blastic phase. *Leuk Res*. 1997 Jun; 21(6):479-89.

- [51] Castro FA, Jacysyn JF, Ulbrich AG et al. Upregulation of c-flip and *bcl-x_L* mRNA in chronic myelogenous leukemia patients. *Rev Bras Hematol Hemoter.* v.26, p.123, 2004.
- [52] Keeshan K, Mills KI, Cotter TG et al. Elevated Bcr-Abl expression levels are sufficient for a haematopoietic cell line to acquire a drug-resistant phenotype. *Leukemia.* 2001 Dec; 15(12):1823-33.
- [53] Kuribara R, Honda H, Matsui H et al. Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol.* 2004 Jul; 24(14):6172-83.
- [54] Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth MT et al. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia: evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood.* 2005 Apr; 105(8):3303-11.
- [55] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs, microRNAs with a role in cancer. *Nature.* 2006 Apr; 6(4):259-69.
- [56] Careta FP. Expressão de genes envolvidos na proliferação celular e apoptose na leucemia linfocítica crônica. Dissertação de Mestrado em clínica médica, FMRP-USP, 75p, 2007.
- [57] He X, He L, Hannon GJ. The Guardian's Little Helper: MicroRNAs in the p53 Tumor Suppressor Network. *Cancer Res.* 2007 Dec; 67(23):11099-101.
- [58] Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell.* 2007 Jun; 26(5):731-43.
- [59] Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood.* 2009 May; 113(21):5237-45.
- [60] Le MT, Teh C, Shyh-Chang N et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev.* 2009 Apr; 23(7):862-76.
- [61] Chaudhuri K, Chatterjee R. MicroRNA detection and target prediction: integration of computational and experimental approaches. *DNA Cell Biol.* 2007 May; 26(5):321-37.
- [62] Enright AJ, John B, Gaul U et al. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* 2003; 5(1):R1.
- [63] He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec; 102(52):19075-80.

- [64] Bueno-da-Silva AE, Brumatti G, Russo Fo et al. Bcr-Abl1-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity. *Cell Death Differ.* 2003 May; 10(5):592-8.
- [65] Munzert G, Kirchner D, Stobbe H et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood.* 2002 Nov; 100(10):3749-56.
- [66] Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell.* 2008 Jun; 13(6):496-506.
- [67] Salih J, Hilpert J, Placke T et al. The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect NK cell reactivity. *Int J Cancer.* 2010 Nov; 127(9):2119-28.
- [68] Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb Haemost.* 2012 Feb; 107(4).
- [69] Breving K, Esquela-Kerscher A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Aug; 42(8):1316-29.
- [70] Perrotti D, Harb JG. BCR-ABL1 kinase-dependent alteration of mRNA metabolism: potential alternatives for therapeutic intervention. *Leuk Lymphoma.* 2011 Feb; 52 Suppl 1:30-44.
- [71] Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T et al. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene.* 2007 Jun; 26(28):4148-57.
- [72] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF et al. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene.* 2007 Sep; 26:6133–6140.
- [73] Shao M, Rossi S, Chelladurai B et al. PDGF induced microRNA alterations in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2011 May; 39(10):4035-47.
- [74] Waller CF, Imatinib mesylate. *Recent Results Cancer Res.* 2010;184:3-20.
- [75] Johnson SM, Grosshans H, Shingara et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005 Mar; 120(5):635-47.
- [76] Hanlon K, Rudin CE, Harries LW. Investigating the targets miR-15a and miR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *PLoS One.* 2009 Sep; 4(9):e7169.

- [77] Slavov SN, Gimenes Teixeira HK, Rego EM. The role of micro-ribonucleic acids in normal hematopoiesis and leukemic T-lymphogenesis. *Braz J Med*. 2010 Jul; 43(7):619-26.
- [78] Zhang B, Liu XX, He JR et al. Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2011 Jan; 32(1):2-9.
- [79] Lu J, He ML, Wang L et al. MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2. *Cancer Res*. 2011 Jan; 71(1):225-33.
- [80] Chen L, Zheng J, Zhang Y et al. Tumor-specific expression of microRNA-26a suppresses human hepatocellular carcinoma growth via cyclin-dependent and -independent pathways. *Mol Ther*. 2011 Aug; 19(8):1521-8.
- [81] Xiong Y, Frang JH, Yun JP et al. Effects of miRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010 Mar; 51(3):836-45.
- [82] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct; 104(40):15805-10.
- [83] Longo PG, Laurenti L, Gobessi S et al. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2008 Jan; 111:846–855.
- [84] Peterson LF, Mitrikeska E, Giannola D et al. p53 stabilization induces apoptosis in chronic myeloid leukemia blast crisis cells. *Leukemia*. 2011 May; 25(5):761-9.
- [85] Mraz M, Pospisilova S, Malinova K et al. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes. *Leuk Lymphoma*. 2009 Mar; 50(3):506-9.
- [86] Kren BT, Wong PYP, Sarver A et al. microRNAs identified in highly liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. *RNA Biol*. 2009 Jan-Mar; 6(1):65-72.
- [87] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, *Physiol Rev*. 2007 Jan; 87(1):99-163.
- [88] Gagliardi D, Stepien PP, Temperley RJ et al. Messenger RNA stability in mitochondria: different means to an end. *Trends Genet*. 2004 Jun; 20(6):260-7.

- [89] Ma S, Tang KH, Chan YP et al. miR-130b Promotes CD133(+) liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Cell Stem Cell*. 2010 Dec; 7(6):694-707.
- [90] Lai KW, Koh KX, Loh M et al. MicroRNA-130b regulates the tumour suppressor RUNX3 in gastric cancer. *Eur J Cancer*. 2010 May; 46(8):1456-63.
- [91] Yeung ML, Yasunaga J, Bennasser Y et al. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res*. 2008 Nov; 68(21):8976-85.
- [92] Chen A, Luo M, Yuan G et al. Complementary analysis of microRNA and mRNA expression during phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)-induced differentiation of HL-60 cells. *Biotechnol Lett*. 2008 Dec; 30(12):2045-52.
- [93] Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y et al. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res*. 2006 May; 30(5):643-7.
- [94] Flamant S, Ritchie W, Guilhot J et al. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2010 Aug; 95(8):1325-33.
- [95] Cho WC, Chow AS, Au JS. MiR-145 inhibits cell proliferation of human lung adenocarcinoma by targeting EGFR and NUDT1. *RNA Biol*. 2011 Jan-Feb; 8(1):125-31.
- [96] Pons A, Nomdedeu B, Navarro A et al. Hematopoiesis-related microRNA expression in myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2009 Nov; 50(11):1854-9.
- [97] Starczynowski DT, Morin R, McPherson A et al. Genome-wide identification of human microRNAs located in leukemia-associated genomic alterations. *Blood*. 2011 Jan; 117(2):595-607.
- [98] Havelange V, Stauffer N, Heaphy CC et al. Functional implications of microRNAs in acute myeloid leukemia by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling. *Cancer*. 2011 Mar 31.
- [99] Ostenfeld MS, Bramsen JB, Lamy P et al. miR-145 induces caspases-dependent and – independent cell death in urothelial cancer cell lines with targeting of an expression signature present in Ta bladder tumors. *Oncogene*. 2010 Feb; 29(7):1073-84.
- [100] Wang Y, Li Z, He C et al. MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias. *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Mar; 44(3):191-7.

- [101] Tao W, Kurschner C, Morgan JJ. Modulation of cell death in yeast by the Bcl-2 family of proteins. *J Biol Chem*. 1997 Jun; 272(24):15547-52.
- [102] Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*. 2006 May; 9(5):351-65.
- [103] Morgan RK, Kingham PJ, Walsh MT et al. Eosinophil adhesion to cholinergic IMR-32 cells protects against induced neuronal apoptosis. *J Immunol*. 2004 Nov; 173(10):5963-70. Erratum in: *J Immunol*. 2008 Jul; 181(2):1582.
- [104] Nagy B, Lundán T, Larramendy ML et al. Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2003 Feb; 120(3):434-41.
- [105] Piva R, Pellegrino E, Mattioli M et al. Functional validation of the anaplastic lymphoma kinase signature identifies CEBPB and BCL2A1 as critical target genes. *J Clin Invest*. 2006 Dec; 116(12):3171-82.
- [106] Vogler M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ*. 2012 Jan; 19(1):67-74.
- [107] Chen ZX, Pervaiz S. BCL-2: pro-or anti-oxidant? *Front Biosci (Elite Ed)*. 2009 Jun; 1:263-8.
- [108] Krishna S, Low IC, Pervaiz S. Regulation of mitochondrial metabolism: yet another facet in the biology of the oncoprotein Bcl-2. *Biochem J*. 2011 May; 435(3):545-51.
- [109] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. 2007, Oxford.
- [110] Naughton R, Quiney C, Turner SD et al. Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. *Leukemia*. 2009 Aug; 23(8):1432-40.
- [111] Huang DC, O'Reilly LA, Strasser A et al. The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J*. 1997 Aug; 16(15):4628-38.
- [112] Willmott S, Baou M, Naresh K et al. CD154 induces a switch in pro-survival Bcl-2 family members in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2007 Sep; 138(6):721-32.
- [113] Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK et al. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-x_L. *Oncogene*. 1998 Mar; 16(11):1383-90.

- [114] Lagneaux L, Gillet N, Stamatopoulos B et al. Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response. *Exp Hematol*. 2007 Oct; 35(10):1527-37.
- [115] Davids MS, Steensma DP. The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biol Ther*. 2010 Aug; 10(4):309-19.
- [116] Airiau K, Mahon FX, Josselin M et al. ABT-737 increases tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells through XIAP downregulation and sensitizes CD34(+) CD38(-) population to imatinib. *Exp Hematol*. 2012 Jan.
- [117] Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest*. 2011 Jan; 121(1):396-409. Erratum in: *J Clin Invest*. 2011 Mar; 121(3):1222.
- [118] Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C et al. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Sep; 105(35):12815-9.
- [119] Kozopas KM, Yang T, Buchan HL et al. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Apr; 90(8):3516-20.
- [120] An X, Tiwari AK, Sun Y et al. BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. *Leuk Res*. 2010 Oct; 4(10):1255-68.
- [121] Mancini M, Corradi V, Petta S et al. A new nonpeptidic inhibitor of 14-3-3 induces apoptotic cell death in chronic myeloid leukemia sensitive or resistant to imatinib. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Mar; 336(3):596-604.
- [122] Stuart SA, Minami Y, Wang JYJ. The CML stem cell: Evolution of the progenitor. *Cell Cycle*. 2009 May; 8(9):1338-43.
- [123] Warsch W, Kollmann K, Eckelhart E et al. High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2011 Mar; 117(12):3409-20.
- [124] McLaughlin J, Cheng D, Singer O et al. Sustained suppression of Bcr-Abl1 –driven lymphoid leukemia by microRNA mimics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Dec; 104(51):20501-6.
- [125] Burchert A, Wang Y, Cai D et al. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia*. 2005 Oct; 19(10):1774-82.

APÊNDICES

APÊNDICE A: microRNAs igualmente expressos nas linhagens HL-60 e HL-60.Bcr-Abl.

microRNA	Gene Alvo	*Fold Change	Localização cromossômica
hsa-miR-15a	<i>bik, bcl-2, bid</i>	1,69	13q14.2
hsa-miR-29c	<i>bcl-2, ciap-1, mcl-1</i>	1,57	1q32.2
hsa-miR-152	<i>puma, bim_{EL}</i>	1,51	17q21.32
hsa-miR-29a	<i>bid, ciap-1</i>	1,37	7q32.3
hsa-miR-103	<i>c-flip</i>	1,32	5q34
hsa-miR-23a	<i>bid</i>	1,28	19p13.13
hsa-miR-198	<i>bcl-x_L, bax</i>	1,25	3q13.33
hsa-miR-214	<i>bid, bik</i>	1,22	1q24.3
hsa-miR-133a	<i>bid</i>	0,83	18q11.2
hsa-miR-106a	<i>c-flip, bim_{EL}, bax</i>	0,73	Xq26.2
hsa-miR-181c	<i>fas</i>	0,42	19p13.13

*HL-60.Bcr-Abl/HL-60

APÊNDICE B: Resultados não-significantes da análise de genes anti-apoptóticos em pacientes tratados com mesilato de imatinibe (MI).

Gene	RCC	R
<i>a1</i>	40.65	27.83
<i>bcl-2</i>	3.02	2.26
<i>c-flip</i>	41.87	30.16
<i>ciap-2</i>	11.08	7.42

RCC: resposta citogenética completa

R: resistentes ao MI