



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

THIAGO CEZAR FUJITA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO CXCL12 RS1801157 E
ENVOLVIMENTO DOS INIBIDORES DE TIROSINA
QUINASE NA EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA HUMANA
CXCL12 E DO SEU RECEPTOR CXCR4 EM LEUCEMIA
MIELÓIDE CRÔNICA.**

THIAGO CEZAR FUJITA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO CXCL12 RS1801157 E
ENVOLVIMENTO DOS INIBIDORES DE TIROSINA
QUINASE NA EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA HUMANA
CXCL12 E DO SEU RECEPTOR CXCR4 EM LEUCEMIA
MIELÓIDE CRÔNICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia Experimental

Orientadora: Maria Angelica Ehara Watanabe

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais De Catalogação-Na-Publicação (Cip)

F961a Fujita, Thiago Cezar.
Análise do polimorfismo CXCL12 rs1801157 e envolvimento dos inibidores de
tirosina quinase na expressão da quimiocina humana CXCL12 e do seu receptor
CXCR4 em leucemia mielóide crônica / Thiago Cezar Fujita. – Londrina, 2011.
80 f. : il.

Orientadora: Maria Angélica Ehara Watanabe
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Leucemia mieloide de fase crônica – Teses. 2. Polimorfismo (Genética) –
Teses. 3. Quimiocinas – Teses. 4. Patologia experimental – Teses. I. Watanabe, Maria
Angelica Ehara. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 658.013

THIAGO CEZAR FUJITA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO CXCL12 RS1801157 E
ENVOLVIMENTO DOS INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE NA
EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA HUMANA CXCL12 E DO SEU
RECEPTOR CXCR4 EM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia Experimental

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe
UEL - Londrina – PR

Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
UEL - Londrina – PR

Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira
UEL - Londrina – PR

Londrina, 04 de novembro de 2011.

*"A NEVE E AS TEMPESTADES MATAM AS
FLORES, MAS NADA PODEM CONTRA AS
SEMENTES"*

KHALIL GIBRAN

*DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO A ALGUÉM
QUE MESMO DIANTE DE TANTAS
DIFICULDADES AO LONGO DA VIDA,
ENSINOU AOS SEUS QUE O RESPEITO, A
AMIZADE, O COMPANHEIRISMO, O
ESFORÇO, HONESTIDADE E O TRABALHO
SÃO FATORES INTRÍNSECOS DA
FELICIDADE E SUCESSO. QUE SEM SUA
AJUDA, EU JAMAIS TERIA CHEGADO ATÉ
AQUI, E SEUS ENSINAMENTOS É QUE ME
DÃO O “TRAMPOLIM” PARA SE
ALCANÇAR AO LONGE:*

MINHA MÃE.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha luz protetora que é *tudo* pra mim, que sempre me protege, me guia e me ilumina em todos os passos da minha vida, por Ele ser tão bom e fiel comigo;

Aos meus pais Walter e Vera, pelo amor eterno e incondicional. Pelo carinho e pela preocupação; pelo colo e pelas broncas; pela educação e pela disciplina; pelos princípios morais, pelas alegrias, pela compreensão; por sempre estarem ao meu lado, por sempre me apoiarem, sempre me guardarem, me ensinarem, não importa o esforço e o sacrifício. Meus queridos pais: eu amo vocês;

A meu irmão Rafael, que sempre me auxiliou com suas palavras e gestos. Irmão: Obrigado por tudo;

À minha namorada Vanessa, por tudo o que ela representa, pela compreensão, amor, carinho e cumplicidade demonstrados ao longo das inúmeras jornadas na vida.

À minha prima Paula, que tem sempre me ajudado nos momentos mais difíceis e que tem sido a minha companheira de todas as horas; Paula: Obrigado por tudo;

À minha família, em especial minhas avós Circe e Rita, que me ajudaram muito nesses últimos anos, me ensinando, cobrando o meu melhor e fazendo de tudo por mim. Vó Circe e Vó Rita: Vocês são especiais pra mim;

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Angelica Ehara Watanabe, por cumprir seu papel com tanta dedicação e brilhantismo, fundamentais para a realização desse trabalho. Obrigado pelas palavras de encorajamento, por sua inteligência e clareza. Obrigado pelo exemplo de profissionalismo, pela compreensão, por cada detalhe que me inspira a seguir este caminho. Agradeço por compreender minhas limitações, por me fazer crescer a cada momento de aprendizado que tive durante ao seu lado, e, sobretudo pela amizade ao qual me sinto eternamente abençoado. Angel: Muito obrigado por ser minha estrela guia;

A todos que fazem ou já fizeram parte do Laboratório de Imunologia e Genética Molecular: Aparecida de Lourdes Perim; Elaine Delicato; Juliana Laino do Val Carneiro; Julie Massayo Maeda Oda; Karen Brajão de Oliveira; Kalil Willian Alves de Lima; Karina de Almeida Gualtieri, Leandra Fiori Lopes; Marla Karine Amarante; Mateus Nóbrega Aoki; Natália Ketelut Carneiro; Patrícia Sayuri Suzuki; Roberto Iemitsu Tatakihara, Roberta Losi Guemdarovski e Vânia Darc de Castro. Àqueles que não somente me ajudaram no trabalho de alguma forma, mas que sempre estão dispostos e dedicaram muitíssimo de seus tempos para me ensinar, me apoiar e me ajudar, e que têm minha sincera amizade.

Aos professores Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz e Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira por participação na banca examinadora, dedicando seus tempos para correção da monografia e assim ajudando na minha formação.

À VI Turma de Biomedicina e aos colegas de mestrado, meus eternos amigos os quais estiveram comigo ao longo dessa importante etapa da vida, sempre os levarei dentro no meu coração e saudosamente na minha memória, que sabem o quão difíceis, mas quão recompensadores foram esses últimos anos. Aos professores, pelos ensinamentos, e aos funcionários que me auxiliaram de alguma forma.

Agradeço às Profas. . Maria Helena Fungaro e Márcia Furlaneto pelos relevantes conselhos, pelo empréstimo dos equipamentos de seus laboratórios e pela agradável convivência.

Agradeço aos colegas de laboratórios vizinhos, Ana Flávia, Daniel, Daniele, Manuela, Marcelo, Henrique e Lara pelo agradável convívio.

Agradeço aos pacientes do Hospital do Câncer de Londrina (HCL) e aos doadores saudáveis que confiaram em nosso projeto e nos cederam alíquotas de seu sangue periférico para que pudéssemos investigar tal polimorfismo.

Agradeço aos funcionários do Hospital do Câncer de Londrina (HCL), em especial aos hematologistas Dr. Luis Gabriel Fernandez Turkowski e Dr. Roberto Franzin

Coelho, que além de confiarem em nosso projeto, tornaram-no possível graças a suas gentis colaborações. Agradeço a todos que de alguma forma auxiliaram na minha formação e na concepção desse projeto.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela oportunidade de realizar o curso e pela infra-estrutura;

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG/UEL) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

FUJITA, Thiago Cezar. **Análise do polimorfismo CXCL12 rs1801157 e envolvimento dos inibidores de tirosina quinase na expressão da quimiocina humana CXCL12 e do seu receptor CXCR4 em Leucemia Mielóide Crônica.** 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

As leucemias são doenças particularmente heterogêneas e complexas, tanto do aspecto morfológico quanto biológico. A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença proliferativa do sistema hematopoiético caracterizada por uma superprodução de células da linhagem granulocítica, especialmente neutrófilos e ocasionalmente monócitos, resultando em acentuada esplenomegalia e elevada leucometria. Cerca de 90% dos pacientes diagnosticados com LMC apresentam um “marcador” denominado cromossomo Filadélfia (Ph), produto de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22, caracterizando uma oncoproteína denominada BCR/ABL. O tratamento para LMC, Ph positivo, inclui diferentes estratégias, que vão desde o simples controle na contagem de leucócitos, eliminação das células Ph positivas por substituição de células alogênicas ou por supressão não-específica do clone neoplásico. Dentre as drogas descritas para o tratamento de LMC na fase crônica são o Bussulfan e a Hidroxiuréia; transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas, Interferon- α e inibidores do domínio tirosina quinase do BCR/ABL. Ultimamente têm-se discutido o papel das quimiocinas e o seu envolvimento nas neoplasias. O fator-1 derivado do estroma da medula óssea (SDF-1/CXCL12) é uma quimiocina que ao se ligar ao receptor (CXCR4), desenvolve importantes funções na migração, retenção e desenvolvimento de progenitores hematopoiéticos na medula óssea. Além disso, o sistema CXCL12/CXCR4 está envolvido na quimiotaxia de células cancerosas e na metástase tumoral. Observou-se que as células leucêmicas escapam da apoptose *in vitro* quando entram em contato com as células produtoras de CXCL12. Foi descrito um polimorfismo do CXCL12 designado rs1801157 na região 3' UTR da quimiocina CXCL12 relacionada com um possível aumento da expressão dessa quimiocina. Portanto, o presente trabalho investigou a relação do polimorfismo rs1801157 CXCL12 na expressão de CXCL12 e CXCR4 em pacientes com LMC comparado a indivíduos saudáveis. No presente estudo, não foi encontrada relação entre a presença do polimorfismo 3'A para o CXCL12 e os pacientes acometidos por Leucemia Mielóide Crônica. Além disso, não houve associação entre a expressão de CXCL12 e a expressão de CXCR4, teste de correlação de Sperman não significativo ($p = 0,621$). Entretanto, foi detectada uma maior expressão de CXCR4 (1,946 vezes maior) nos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica ($p = 0,009$) comparados aos indivíduos saudáveis. Além disso, nesse trabalho, os diferentes aspectos da terapia na LMC também foram considerados para análise. Nessa população, há uma inferência entre o tempo de tratamento com o mesmo quimioterápico e a expressão de CXCR4 ($p = 0,036$) nos pacientes com LMC. Curiosamente, sete pacientes analisados que possuem tempo de tratamento por um período igual ou superior a 20 meses, demonstraram aumento acentuado na expressão de CXCR4, sendo que esse aumento foi em média três vezes maior aos pacientes com tempo de tratamento inferior a 10 meses ($p = 0,043$). Os aspectos moleculares desse trabalho podem auxiliar no diagnóstico, monitoramento e prognóstico das leucemias. Podem proporcionar também uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese assim como outros alvos e alternativas terapêuticas para a Leucemia Mielóide Crônica.

Palavras-chave: LMC. CXCL12. CXCR4. PCR em tempo real. Tratamento.

FUJITA, Thiago Cezar. **Analysis of CXCL12 rs1801157 polymorphism and the involvement of tyrosine kinase inhibitors on the expression of human chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in chronic myeloid leukemia.** 2011. 80 f. (Master's degree in Biological Science) University State of Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Leukemias are particularly heterogeneous and complex, both the morphological and biological aspects. The chronic myeloid leukemia (CML) is a proliferative disease of hematopoietic system characterized by an overproduction of cells of granulocytic lineage, particularly neutrophils and monocytes occasionally resulting in marked splenomegaly and elevated WBC (White Blood Cells) count. About 90% of patients diagnosed with CML have a "marker" called Filadélfia chromosome (Ph), the product of a translocation between chromosomes 9 and 22, featuring an oncoprotein called BCR/ABL. The treatment for CML, Ph positive, including different strategies, ranging from the simple control of leukocyte count, elimination of Ph positive cells for cell replacement or allogeneic non-specific suppression of neoplastic clone. Among the drugs described for the treatment of CML in chronic phase are busulfan and hydroxyurea; allogeneic hematopoietic stem cell, interferon- α and inhibitors of tyrosine kinase domain of BCR/ABL. A major cause of treatment failure and death of cancer patients is metastasis to secondary organs. Lately have been discussing the role of chemokines and their involvement in malignancies. Bone Marrow Stromal Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) is a chemokine that through the binding to its receptor (CXCR4), has major roles in the migration, retention and development of hematopoietic progenitors in bone marrow. It was observed that the leukemic cells escape from apoptosis *in vitro* when in contact with CXCL12-producing cells. Described a polymorphism of CXCL12 designated rs181157 in the 3'UTR of the chemokine CXCL12 in relation to a possible increase in expression of this chemokine. Therefore, this study investigated the relationship of the polymorphism rs181157 in the expression of CXCL12 and CXCR4 in patients of CML compared to healthy subjects. In this study, no relationship was found between the presence of polymorphism for CXCL12 3'A and patients suffering from CML. Furthermore, no association between the expression of CXCL12 and CXCR4 by Spearman correlation test was not significant ($p = 0,621$). However, we detect a higher expression of CXCR4 (1.946 more) in patients with CML ($p = 0,009$) compared to healthy subjects. Moreover, in this work, the different aspects of therapy in CML were also considered for analysis. In this population, there is an inference from the time get of treatment with same chemotherapy and the expression of CXCR4 ($p = 0,036$) in patients with CML. Interestingly, seven patients have time to treatment for a period equal to or greater than 20 months, showed marked increased in the expression of CXCR4, and this increase was on average three times higher than patients with treatment time of less than 10 months ($p=0,043$). The molecular aspects of this work may help in diagnosis, monitoring and prognosis of leukemia. They can also provide a better understanding of the molecular mechanisms involved in the pathogenesis as well as other targets and alternative therapies for chronic myeloid leukemia.

Keywords: CML. CXCL12. CXCR4. Real time PCR. Treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação do STI571 (Imatinibe)..... 22

Artigo A

Figura 1 – Perfil eletroforético do produto de digestão enzimática..... 53

Figura 2 – Expressão gênica do RNAm CXCL12 e CXCR4 dos pacientes com LMC em relação aos Indivíduos Saudáveis 54

Figura 3 – Análise dos genótipos CXCL12 por RFLP e expressão relativa de CXCR4 e CXCL12 55

Artigo B

Figure 1 – CXCL12 and CXCR4 mRNA from CML patients compared to healthy subjects 70

Figure 2 – Therapy with tyrosine kinase inhibitors and CXCL12 and CXCR4 expression 70

Figure 3 – CXCL12 and CXCR4 gene expression in relation to the treatment time for patients with CML 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
3'UTR	(<i>3' Terminal Untranslated Region</i>): Região 3' Não Codificadora
ABL	<i>Abelson murine leukemia</i>
AgNO₃	Nitrato de Prata
AIDS	(<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>): Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Alo-TMO	Transplante de Medula Óssea alogênico
ARG	Arginina
ATP	<i>Trifosfato de Adenosina</i>
bp	(bases pair): pares de bases
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BUS	Bussulfano
DNA	(<i>Desoxyribonucleic Acid</i>): Ácido desoxirribonucléico
EDTA	(<i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>): Ácido EtilenoDiaminoTetracético
G1	(<i>gap 1</i>): Intervalo 1
G2	(<i>gap 2</i>): Intervalo 2
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	(<i>Human Immunodeficiency Virus</i>): Vírus da Imunodeficiência Humana
HCL	Hospital do Câncer de Londrina
HWE	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
HY	Hidroxiuréia
IFN-α	Interferon Alfa
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfoblástica Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
M	Molar

mg	Miligrama
MIP-1α	Proteína-1 inflamatória de macrófagos
mL	Mililitro
MMM	Metaplasia Mielóide com Mielofibrose
mRNA	RNA mensageiro
<i>Msp-I</i>	enzima proveniente da bactéria <i>Moraxella species</i>
ng	Nanograma
NK	(<i>natural killer</i>) Exterminadoras naturais
Nm	Nanômetro
°C	grau <i>Celsius</i>
PCR	(<i>Polymerase Chain Reaction</i>): Reação em Cadeia da Polimerase
PDFGR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PKR	Proteína Quinase Dependente de RNA
pol	Polimerase ou Transcriptase Reversa
RFLP-Assay	(<i>Restriction Fragment Length Polymorphism Assay</i>)
S	(<i>synthesis</i>): Síntese
SDF-1	(<i>Stromal cell-Derived Factor 1</i>): Fator Derivado do Estroma da Medula Óssea 1
STI	<i>Signal Transduction Inhibitors</i>
TMO	Transplante de Medula Óssea
V	<i>Volts</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	LEUCEMIAS	15
1.2	LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	16
1.3	TERAPÊUTICA NA LMC	19
1.4	QUIMIOCINAS	27
1.5	CXCL12 (SDF-1) E CXCR4	30
2	OBJETIVOS	34
2.1	OBJETIVO GERAL	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
	Referências	35
3	ARTIGO A – “ANÁLISE DO POLIMORFISMO CXCL12 RS1801157 E EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA HUMANA CXCL12 E DO SEU RECEPTOR CXCR4 EM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA”	44
	Resumo	45
	Abstract	45
3.1	INTRODUÇÃO	46
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.2.1	Consentimento Livre e Esclarecido	48
3.2.2	População Estudada	49
3.2.3	Extração de DNA	49
3.2.4	Análise Molecular	49
3.2.4.1	<i>Análise do polimorfismo CXCL12 rs1801157</i>	49
3.2.4.2	Extração de RNA e Síntese de DNAc	50
3.2.4.3	Reação em cadeia da Polimerase - β actina	51
3.2.4.4	Expressão quantitativa dos genes CXCL12 e CXCR4	51
3.2.5	Análise Estatística	52
3.3	RESULTADOS	52
3.3.1	Gênero, Idade e Etnia	52
3.3.2	Análise Genotípica para o CXCL12	53

3.3.3	Análise da Expressão dos Genes CXCL12 e CXCR4.....	54
3.4	DISCUSSÃO	55
	Referências	59
4	ARTIGO B – “ANÁLISE DO POLIMORFISMO CXCL12 RS1801157 E EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA HUMANA CXCL12 E DO SEU RECEPTOR CXCR4 EM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA”	64
	Abstract.....	65
4.1	INTRODUCTION	65
4.2	MATERIALS AND METHODS	67
4.2.1	Sample	67
4.2.2	RNA Extraction and cDNA synthesis	68
4.2.3	Molecular Analysis of Beta-actin mRNA	68
4.2.4	Quantitative Real-time PCR for CXCL12 and CXCR4 mRNA	68
4.2.5	Real Time PCR Analysis.....	69
4.2.6	Statistical Analysis	69
4.3	RESULTS	69
4.3.1	Analysis of Gene Expression of CXCL12 and CXCR4.....	69
4.4	DISCUSSION	71
	References	76
	CONCLUSÃO.....	79
	AGRADECIMENTOS	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEUCEMIAS

As neoplasias malignas constituem a terceira causa de morte em seres humanos por todo o mundo e a sua incidência na população tem aumentado significativamente. A etiologia é diversa e, geralmente, os fatores de riscos envolvidos estão relacionados aos efeitos do desenvolvimento industrial e ao aumento da expectativa de vida (CANCER NET; INCA, 2010).

A etiologia para a maioria das leucemias é incerta, no entanto, alguns fatores de risco estão associados à sua origem, como anormalidades cromossômicas constitucionais, imunodeficiências congênitas, radiação ionizante e eletromagnética, infecções virais, substâncias químicas e drogas antineoplásicas específicas (MCKENNA, 2000; COLBY-GRAHAM, 2003).

De modo geral, a classificação das leucemias está baseada no tipo de linhagem celular predominantemente afetada e no nível de diferenciação celular. Portanto, os termos mielóide e linfóide denotam a procedência da célula acometida. Quanto ao curso clínico, esta neoplasia pode desenvolver-se de forma aguda ou crônica. Assim sendo, as leucemias agudas têm uma progressão rápida principalmente de células imaturas e indiferenciadas, denominadas de blastos. Por outro lado, as leucemias crônicas têm evolução relativamente indolente, permitindo a produção de células maduras e mais diferenciadas, que preservam algumas das suas funções normais (RAPAPORT, 1990; RUBIN, 2002).

Considerando os critérios supracitados, foi proposta uma classificação didática reconhecendo-se duas variantes principais para as formas aguda e crônica desta doença. Por conseguinte, tem-se a leucemia linfocítica (linfoblástica) nas formas agudas e crônicas (LLA e LLC) e a leucemia mielocítica (mieloblástica) também nas formas agudas e crônicas (LMA e LMC) (NEVILLE *et al.*, 1998; ASTER, 2000).

Estas doenças são caracterizadas como doenças clonais, hematopoiéticas, malignas, tendo origem a partir de uma única célula tronco medular, a qual sofreu uma alteração genética.

São doenças particularmente heterogêneas e complexas, tanto do aspecto morfológico quanto biológico. O clone leucêmico pode surgir em fases diferentes do desenvolvimento de linhagens celulares diversas, resultando em patologias de comportamento variável, tanto quanto a evolução clínica como na resposta terapêutica (LUSIS, 2000).

1.2 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença proliferativa do sistema hematopoiético caracterizada por uma superprodução de células da linhagem granulocítica, especialmente neutrófilos e ocasionalmente monócitos, resultando em acentuada esplenomegalia e elevada leucometria (KEATING *et al.*, 2005).

Sob o ponto de vista epidemiológico, a LMC corresponde a 14% dos casos de leucemias, com uma incidência anual de 1,6 casos a cada 100 mil indivíduos. É mais frequente em adultos com idades entre 40 e 60 anos e afeta ambos os sexos, com predominância no sexo masculino. Quanto aos fatores de risco, o mais associado ao surgimento da LMC é a exposição às radiações ionizantes em altas doses. Agentes químicos, biológicos e a predisposição genética parecem não exercer muita influência no aparecimento dessa doença mieloproliferativa crônica (DULLEY *et al.*, 2004; FRAZER, *et al.*, 2006).

A LMC classifica-se como uma das doenças mieloproliferativas, juntamente com a Policitemia Vera, a Trombocitemia Essencial e a Metaplasia Mielóide. A proliferação celular pode ser regulada direta ou indiretamente. Diretamente através de um mecanismo que determina se a célula passa o ponto de restrição, ou "inicia" o ciclo de divisão celular; ou indiretamente, por exemplo, através da regulação do comprometimento à diferenciação total ou à morte celular programada. Em qualquer um dos casos, os genes regulatórios normais podem ser classificados naqueles em que os produtos contribuem para estimular um aumento no número de células e naqueles que contribuem para sua inibição. Correspondentemente, há duas rotas de mutação em direção à proliferação incontrolada da célula e capacidade de invasão que são características do câncer. A primeira é para tornar um gene estimulatório hiperativo: este tipo de mutação possui um efeito dominante -somente uma das duas cópias dos genes necessita sofrer mudanças -e o gene alterado é chamado de oncogene (o alelo normal sendo um proto-oncogene). A segunda é para fazer um gene inibitório inativo: este tipo de mutação geralmente possui um efeito recessivo -ambas as cópias do gene devem ser inativadas ou deletadas para liberar a célula da inibição -e o gene perdido é chamado gene supressor do tumor. Os genes mutantes com efeito dominante -isto é, os oncogenes -podem ser identificados diretamente extraíndo o DNA das células tumorais e pesquisando os seus fragmentos que, introduzidos em células normais, irão causar a elas o comportamento semelhante a uma célula tumoral (COOPER, 1997).

A evolução clínica da LMC apresenta três fases: crônica, acelerada e blástica. A fase crônica é caracterizada por hiperplasia e intensa maturação de células mielóides, sendo

que alguns pacientes são assintomáticos, enquanto outros apresentam fadiga, astenia, cefaléia, irritabilidade, febre, sudorese noturna e perda de peso (DULLEY, *et al.* 2004). Alguns autores, como Sherbenou e Druker (2007), consideram a fase acelerada e crise blástica como um único estágio da doença, denominada fase acelerada. A definição precisa das fases da LMC ainda é motivo de debate entre os pesquisadores, mas o paciente que se apresenta em fase crônica possui melhor prognóstico em relação àqueles que se encaixam nas fases aceleradas ou blástica (COTTA E BUESO-RAMOS, 2007).

Durante o curso variável e instável da fase crônica, um aumento de dez a cem vezes pode ser observado no número de granulócitos, no sangue periférico, resultando, por vezes, em esplenomegalia acentuada. Embora a hiperplasia granulocítica na LMC possa ser considerada o primeiro passo na transformação maligna, as células leucêmicas são morfológica e funcionalmente difíceis de distinguir das células normais (PASTERNAK *et al.*, 1998). No mielograma é possível observar hiperplasia granulocítica e magacariocítica, embora muitas vezes outras alterações estejam presentes (MORRISON, 1994).

Células imaturas surgem na circulação na fase acelerada, mantendo a contagem de leucócitos acima dos 20.000/ μ L, com esplenomegalia crescente, hepatomegalia, infiltração de linfonodos, da pele, dos ossos e de outros tecidos. Com o desenvolvimento de anemia e/ou trombocitopenia, os sintomas tornam-se mais acentuados, e mais resistentes à terapêutica (SAWEYRS, 2004). Cerca de 15% dos pacientes entram nesta fase.

Os blastos no sangue periférico indicam progressão da doença. Estas células que substituem os granulócitos normais representam um subclone que demonstra novas características, como outras anormalidades cromossômicas, além do cromossomo Filadélfia, as quais podem ser observadas na fase acelerada e na crise blástica (PASTERNAK *et al.*, 1998).

Na crise blástica, que pode ser abrupta ou precedida pela fase acelerada, o quadro clínico assemelha-se ao da leucemia aguda, sendo comumente refratária ao tratamento. Aproximadamente 30% ou mais de células blásticas se encontram na medula óssea e/ou no sangue periférico, com presença de neutrófilos, e eosinófilos em maior quantidade. O total de basófilos pode subir para 20% e o paciente desenvolve trombocitopenia (TALPAZ *et al.*, 2002). As células blásticas frequentemente invadem outros tecidos e órgãos (HOFFBRAND & PETTIT, 1993). Por punção medular observa-se hiperplasia mielóide, numa relação mielóide/eritróide de 15/1 a 20/1.

A progressão da LMC para a fase acelerada está associada à instabilidade genômica, o que predispõe ao aparecimento de outras anormalidades moleculares. Anormalidades citogenéticas adicionais ao cromossomo Filadélfia, como o duplo Ph, trissomia

do cromossomo 8, trissomia do cromossomo 19, isocromossomo 17q e novas translocações ou deleções. A fase acelerada caracteriza-se pelo aumento no número de blastos na medula óssea e no sangue periférico, além de leucocitose, basofilia, anemia e trombocitopenia. Clinicamente, o paciente torna-se refratário ao tratamento empregado na fase crônica e pode apresentar progressão da hepato-esplenomegalia (DULLEY *et al.*, 2004). Quarenta a setenta por cento dos doentes permanecem de 4 a 6 meses na fase acelerada antes de evoluir para a crise blástica (GRIESSHAMMER *et al.*, 1996).

Em seguida, a doença evolui para a fase blástica, definida hematologicamente pelo aumento de blastos leucêmicos (linfóides ou mielóides) no sangue periférico e/ou medula óssea (mais de 20%). Nesse estágio da doença, muitos pacientes evoluem para óbito em três a seis meses (DULLEY *et al.*, 2004).

Cerca de 90% dos pacientes diagnosticados com LMC apresentam um “marcador” denominado cromossomo Filadélfia (Ph) na maioria das metáfases celulares da medula óssea (NOWELL, 1960). O marcador resulta de uma translocação envolvendo os cromossomos 9 e 22. Especificamente, surgem cromossomos derivativos, ou seja, o cromossomo 9 com acréscimo de material genético originário do cromossomo 22 no braço longo, e o cromossomo 22 com decréscimo de material genético no braço longo, sendo a translocação representada por $t(9;22)(q34;q11)$. Essa translocação funde um segmento do gene BCR do cromossomo 22 com uma região anterior ao segundo éxon do gene ABL do cromossomo 9, formando o gene quimérico BCR/ABL.

O gene quimérico codifica uma oncoproteína BCR/ABL (que possui atividade tirosina quinase desregulada). A expressão de BCR/ABL em células hematopoiéticas induz a inibição da apoptose, independência de fatores de crescimento, alterações nas interações célula-célula e célula-matriz, e leucemogênese. Devido à atividade anti-apoptótica deste oncogene, células expressando BCR/ABL são altamente resistentes a agentes quimioterápicos. Dessa forma, a proteína BCR/ABL promove a ativação constitutiva da sinalização mitogênica, redução de apoptose e redução da adesão das células ao estroma e à matriz extracelular (FERNANDEZ-LUNA, 2000).

O diagnóstico é realizado pelos achados clínicos, citogenéticos e hematológicos do sangue periférico e medula óssea e suas manifestações são controladas por quimioterapia oral (DULLEY *et al.*, 2004). É geralmente realizado na fase crônica com base no aumento do número de leucócitos circulantes, diminuição da atividade da fosfatase alcalina leucocitária, detecção do cromossomo Filadélfia e do oncogene BCR/ABL (MELO *et al.*, 2003;

SAWYERS, 2004). São comumente encontrados níveis baixos de desidrogenase láctica sérica, ácido úrico, e de vitamina B12 (MORRISON, 1994).

1.3. TERAPÊUTICA NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

O tratamento para LMC, cromossomo Filadélfia positivo, inclui diferentes estratégias, que vão desde o simples controle na contagem de leucócitos, eliminação das células Ph positivas por substituição de células alogênicas ou por supressão não-específica do clone neoplásico.

A primeira droga descrita a ser usada no tratamento da LMC foi o arsênico (FORKNER E SCOTT, 1931; HEHLMANN *ET AL.*, 2005). Nas décadas seguintes, o tratamento da LMC foi meramente paliativo, e era baseado em drogas citostáticas, como o Bussulfano e Hidroxiuréia. Até a década de 1980, estas drogas eram as mais efetivas no tratamento da LMC, pois apresentavam um controle da doença com baixa toxicidade e eram administradas oralmente (KANTARJIAN *et al.*, 1993). Entretanto, apesar de causarem remissão hematológica em 70% a 80% dos pacientes em fase crônica, estas drogas não eram capazes de estimular remissão citogenética.

A fase crônica da doença pode ser controlada com o bussulfano (BUS) ou com a hidróxiuréia (HY), mas seu curso natural é minimamente melhorado. O BUS foi o principal quimioterápico usado no tratamento para a LMC durante muitos anos, substituído durante a década de oitenta pela hidroxiuréia (SILVER *et al.*, 1999). A hidroxiuréia, por sua atividade antimetabólica, não apresenta o mesmo risco de causar malignidades secundárias e, quando usada para controlar a contagem sanguínea dentro dos limites normais, proporciona melhor resultado que o obtido com bussulfano no que se refere a sobrevida (HELMANN *et al.*, 1993).

Na presente data, três modalidades de tratamento mostram uma influência positiva no curso natural da LMC em fase crônica: transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (alo-TMO), Interferon- α (sozinho ou em combinação com baixas doses de ara-C) e inibidores do domínio tirosina quinase do BCR/ABL, como mesilato de Imatinibe e outros (TEFFERI *et al.*, 2005).

O transplante de medula óssea (TMO) alogênico foi primeiramente introduzido no final dos anos 60 para tratar deficiências congênitas imunológicas e outras doenças hematológicas não malignas. Nos anos 70, E. Donnall Thomas e colaboradores mostraram que alguns pacientes com leucemia aguda refratária obtinham sobrevida longa e

livre de doença após quimioterapia em altas doses, seguida de transplante da medula óssea de irmão HLA idêntico.

No final dos anos 70 e início dos anos 80, o TMO – tanto alogênico (de outro indivíduo) como singênico (de gêmeo idêntico) – mostrou ser capaz de induzir remissão citogenética e sobrevida longa e livre de doença nos pacientes com LMC (PASSWEG, 1998; NOWELL, 2002).

As células-tronco usadas para o transplante alogênico podem ser obtidas tanto da medula óssea e do sangue periférico, como também do cordão umbilical. Por essa razão, o que antes era conhecido como transplante de medula óssea atualmente é generalizado como transplante de células-tronco. Em ambas as circunstâncias o paciente é submetido a altas doses de quimioterapia, com o objetivo de eliminar as células leucêmicas antes do transplante, e esse tratamento agressivo limita, em certo grau, a seleção dos doentes considerados apropriados para tal procedimento (NOWELL, 2002).

O transplante de medula óssea alogênico ainda hoje é a única terapia curativa da LMC. Em geral, os pacientes em fase crônica respondem melhor ao TMO do que os pacientes em fase acelerada ou crise blástica (TEFFERI *et al.*, 2005). Embora esta modalidade terapêutica possa curar 50% a 60% dos pacientes, a recidiva da doença representa a causa principal de falha do tratamento. Os pacientes que recaem depois do alo-TMO podem ser reinduzidos para segundas remissões duradouras com estratégias terapêuticas distintas, que incluem infusões de linfócitos do doador, interferon- α (IFN- α) e drogas inibidoras da atividade quinase da proteína BCR/ABL. (HEHLMANN *et al.*, 2005). Apesar de ser uma alternativa que pode levar à cura, o alo-TMO apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, nem todos os pacientes encontram um doador. Em segundo lugar, o transplante está associado com uma porcentagem relativamente alta de mortalidade (cerca de 40%), devido principalmente à doença enxerto versus hospedeiro e a infecções associadas com a imunossupressão (VAN RHEE *et al.*, 1997; TEFFERI *et al.*, 2005). Além disso, somente 20 a 30% de todos os pacientes são candidatos ao transplante. Existem diversos fatores que influenciam na alternativa pelo transplante, como idade (quanto mais jovem melhor), fase da doença (o ideal é transplantar em fase crônica), disponibilidade de um doador, se o doador é aparentado ou não, grau de histocompatibilidade, e tempo entre o diagnóstico e o transplante (BACCARANI *et al.*, 2006).

Os interferons são uma família de proteínas produzidas por células de eucariotos, que ocorrem naturalmente em resposta à exposição a antígenos e a mitógenos, como nas infecções virais e doenças malignas. Os interferons têm efeito biológico

pleiotrópico que inclui a inibição da proliferação celular, a regulação da expressão de citocinas e a modulação do sistema de vigilância imune.

Dos três grupos de interferons já identificados (interferon-alfa, interferon-beta e interferon-gama), o interferon-alfa (INF- α) é o que tem sido mais usado no tratamento de malignidades hematológicas e tumores sólidos (FADERL, 1999). O INF- α ou interferon leucocitário é uma citocina produzida por linfócitos B, por macrófagos e por células NK (*natural killer*), com atividade antitumoral em malignidades hematológicas e outros tipos de câncer (VIAL, 1994).

As células na fase crônica da LMC são sensíveis a fatores de crescimento hematopoético e a citocinas. Doentes tratados com INF- α podem obter significativa redução de células Ph positivas na medula óssea, chegando alguns a apresentar completa remissão citogenética, embora quase todos permaneçam com o rearranjo *BCR/ABL*, evidenciado por técnicas moleculares. Desse modo o INF- α foi a primeira droga não-mielotóxica capaz de reduzir o número de células leucêmicas e de controlar a progressão da doença na fase crônica.

A terapia com o INF- α está associada com elevada toxicidade. A maioria dos pacientes exibe uma síndrome semelhante à da gripe (febre, calafrios, mialgia, dor de cabeça), náusea, vômitos e diarreia. Efeitos adversos tardios são limitados à dose em somente 20% dos pacientes. Em geral, 10% a 25% dos doentes interrompem a terapia por causa da intolerância (STONE, 2004).

A sobrevida global em cinco anos dos doentes tratados com interferon -alfa (INF- α) é de aproximadamente 63%, e em 10 anos, de cerca de 40% (DULLEY et. al., 2004; JAMUR, 2005).

A LMC foi a primeira doença hematológica para qual um projeto de uso racional de drogas delineou uma terapia com alvo molecular efetiva (MELO, 2003). Após uma melhor compreensão das bases moleculares da LMC foram desenvolvidos os inibidores de tirosina quinase, como o mesilato de imatinibe, o dasatinibe e o nilotinibe; dos quais demonstraram serem mais eficientes no controle da doença do que o INF- α (MANASH; SHAH, 2004). O INF- α era a terapia padrão para os casos de LMC em fase crônica antes da descoberta do mesilato de imatinib. A associação de INF- α com outras drogas como hidroxiuréia e/ ou baixas doses de citarabina mostrou melhor resposta citogenética quando comparada àquela observada nos pacientes que receberam somente o INF- α , porém a combinação destes compostos não tem efeito no aumento da sobrevida dos pacientes (HEHLMANN, et al., 2007).

Essa terapia tem como alvo a enzima tirosina quinase, BCR/ABL, responsável por grande parte dos eventos leucemogênicos na LMC. O uso desses inibidores pode reverter as alterações malignas nas células leucêmicas e/ou provocar a apoptose dessas células (MANASH; SHAH, 2004).

O domínio SH1 da BCR/ABL é um alvo molecular para o tratamento da LMC, por ter papel essencial na leucemogenicidade da oncoproteína, por meio de sua atividade tirosina quinase. Inicialmente, pesquisas de produtos naturais para compostos antagonistas da atividade catalítica da BCR/ABL identificaram potenciais candidatos, como a genisteína (isoflavonóide) e a herbimicina-A (antibiótico). Tentativas subsequentes foram feitas a partir de compostos sintéticos com estruturas químicas capazes de competir tanto com o trifosfato de adenosina (ATP) como com o substrato 6 do sítio de ligação no domínio da quinase.

O melhor inibidor sintético de ligação com o ATP é o 2-fenilaminopirimidina ou mesilato de imatinibe, antes denominado STI571 (Glivec® ou Gleevec™, da Novartis Pharma, Basel, Suíça) (DRUKER, 1996). Anteriormente, supunha-se que esse composto agia diretamente como um inibidor competitivo do ATP, mas hoje é conhecido que este inibidor ocupa somente parte do espaço de ligação com o ATP na enzima ABL (Figura 1) e atua principalmente por ligar e estabilizar a BCR/ABL na sua forma inativa, de maneira que a oncoproteína não se ligue ao ATP (SCHINDLER *et al.*, 2001; NAGAR *et al.*, 2002; GAMBACORTI-PASSERINI *et al.*, 2003 – citados por GOLDMAN, 2004).

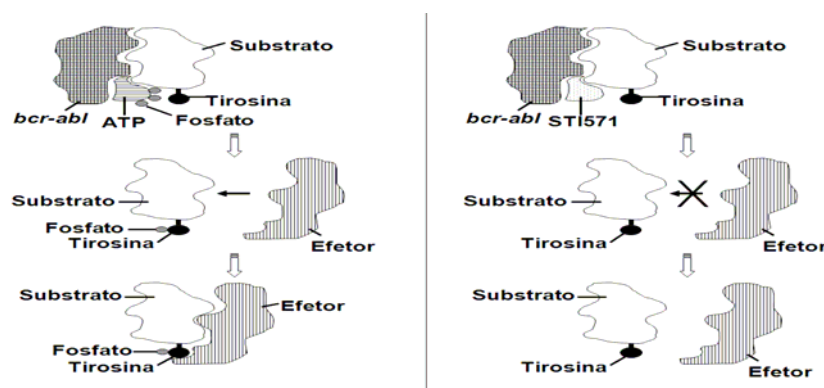


Figura 1 – Mecanismo de ação do STI571 (Imatinibe).

O mesilato de imatinibe é um potente inibidor de quatro proteínas tirosina-quinases: da autofosforilação da ABL, do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor receptor* -PDGFR-A e B), do receptor KIT (receptor

do fator de células-tronco) e da ARG (*Abelson-related gene*), em concentração submicromolar (BUCHDUNGER *et al.*, 2000; OKUDA *et al.*, 2001 – citados por MELO, 2003). Das 100 ou mais tirosina-quinases humanas conhecidas, somente a p210 é inibida com a eficiência demonstrada pelo mesilato de imatinibe, e essa seletividade, presumivelmente, explica sua relativa ausência de toxicidade (GOLDMAN, 2004).

O composto é um inibidor de transdução de sinal (*signal transduction inhibitors* – STI) que inibe a função tirosina-quinase da p210 impedindo que as células que a expressam se proliferem (DEININGER *et al.*, 1997; KANTARJIAN *et al.*, 2002a).

Esse medicamento inibe a progressão da LMC para a fase acelerada ou blástica, induz remissão hematológica em 98% dos pacientes e remissão citogenética completa em 76% do pacientes após 12 meses de tratamento (DRUKER, 2000; JOHN, 2004).

A inibição da oncoproteína resulta na modulação transcricional de vários genes envolvidos no controle do ciclo celular, na adesão celular e na organização do citoesqueleto, resultando na apoptose das células Ph positivas (DEININGER *et al.*, 2000). Em ensaios clonogênicos, há um decréscimo de 95% no número de células Ph positivas, mas sem inibição de formação de colônias de células normais. A inibição seletiva do crescimento pode ser demonstrada para as linhagens *BCR/ABL* + tanto *in vitro* (DEININGER *et al.*, 1997) como em camundongos (DRUKER *et al.*, 1996; Le COUTRE *et al.*, 1999).

O uso do Imatinibe apresentou efeito em todas as fases da doença, tendo sido mais substancial e estável nos pacientes recém-diagnosticados. As respostas ao Imatinibe ocorrem a nível hematológico, citogenético e molecular. Cerca de 90% dos pacientes em fase crônica apresentam resposta hematológica ao Imatinibe. (KANTARJIAN *et al.*, 2002b). Por ser uma droga nova, o tempo de acompanhamento da resposta a esse medicamento é muito curto. Ainda não é possível saber qual é o real efeito curativo desse medicamento, e por quanto tempo os pacientes continuarão em remissão.

Problemas associados ao tratamento da LMC com mesilato de imatinibe têm sido identificados. Nas fases avançadas da doença muitos pacientes não respondem ao medicamento; outros respondem, mas desenvolvem resistência tardia ao tratamento. Na crise blástica, as respostas são de curto prazo, com duração média de três a seis meses, e somente 10% a 15% dos pacientes têm resposta por um período mais longo. Na fase acelerada, após 12 meses de terapia 30% a 60% dos pacientes progridem para a fase blástica ou deixam de apresentar resposta hematológica (CORTES *et al.*, 2004). Os mecanismos de resistência não estão completamente esclarecidos, mas incluem: seleção de células com super-expressão da *BCR/ABL* (MAHON *et al.*, 2000); seleção das células que expressam níveis normais da

BCR/ABL, mas com mutações no domínio quinase ABL; e seleção de células que podem ser independentes da expressão BCR/ABL, possivelmente por ativação anormal de outras vias oncogênicas. Na mesma célula podem coexistir mais de um desses mecanismos (MELO *et al.*, 2003).

A resistência ao mesilato de imatinibe pode ser identificada por critérios laboratoriais ou clínicos. É primária quando a resistência é identificada em linhagens celulares ou em pacientes que não tiveram exposição anterior ao medicamento; ou secundária quando a resistência ocorre após resposta inicial à droga. A resistência pode também ser atribuída à perda de capacidade do mesilato de imatinibe de inibir a BCR/ABL ou à incapacidade de atingir, em concentração suficiente, a oncoproteína no espaço intracelular, por inativação ou degradação. Os mecanismos de resistência podem diferir em pacientes tratados na fase crônica ou na fase avançada da doença (GOLDMAN, 2004).

Os mecanismos de resistência têm sido analisados e o mais comum é a reativação da atividade de quinase da BCR/ABL por mutações de ponto ou por amplificação gênica (GORRE *et al.*, 2001). A mutação de ponto no sítio de ligação da tirosina-quinase pode impedir a ligação do mesilato de imatinibe com a proteína, por interrupção de pontos de contato críticos entre eles ou por induzir uma conformação da proteína à qual o medicamento não se pode ligar (BRANFORD *et al.*, 2003). Dependendo do tipo de mutação presente, o aumento da dose pode ser uma boa estratégia para restaurar a resposta ao mesilato de imatinibe.

Em pacientes portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) e LMC refratários ao mesilato de imatinibe já foram descritos mais de 40 diferentes mutações no gene BCR/ABL (BACCARANI *et al.*, 2006). As mutações em pacientes resistentes ao mesilato de imatinibe acarretam uma mudança estrutural na enzima BCR/ABL, o que dificulta o deslocamento do ATP pelo mesilato de imatinibe no sítio de ação da proteína BCR/ABL, enquanto preserva a atividade quinase da enzima. A primeira mutação descrita que confere resistência ao mesilato de imatinibe determina a troca do aminoácido treonina por uma isoleucina na posição 315 e denomina-se T315I. Essa mutação é encontrada principalmente em pacientes com doença avançada e está associada ao pior prognóstico nos casos de LMC (GORRE, *et al.* 2001).

Segundo Weisberg e colaboradores (2007), a expansão de clones mutantes de BCR/ABL em paciente tratados com mesilato de imatinibe é frequente já que ele pode selecionar clones resistentes que já existiam no paciente pré-tratado. O aumento desses clones resistentes acarretaria na recaída do paciente ou progressão da LMC.

Como outras possíveis causas de resistência, cita-se: níveis elevados de proteína 1 de resistência a multidrogas (*multidrug resistance protein 1*); ligação do mesilato de imatinibe com a 1-alfa glicoproteína ácida; e anormalidades moleculares adicionais ao BCR/ABL, que previnem a apoptose do clone maligno apesar da inativação eficiente da quinase pelo mesilato de imatinibe (STONE, 2004).

As estratégias utilizadas para melhorar a sobrevida e prognóstico dos pacientes resistentes ao mesilato de imatinibe são: O aumento da dose administrada; associação com outros compostos que possuem atividade contra LMC ou emprego de outros inibidores de BCR/ABL.

O aumento da dose do mesilato de imatinibe, apesar de gerar remissão em alguns pacientes pode conduzir ao aparecimento de efeitos adversos graves, em particular mielossupressão, hipersensibilidade e retenção de líquidos. A associação desse medicamento com outras drogas está em teste e parece ser uma opção promissora (JOHN *et al.*, 2004).

Outras drogas inibidoras da atividade tirosina quinase do BCR/ABL estão sendo desenvolvidas e utilizadas em pacientes com LMC resistentes ao Imatinibe. Drogas como Dasatinibe (BMS354825) e Nilotinibe (AMN107) são mais potentes que o Imatinibe (HEHLMANN *et al.*, 2005), e já estão sendo utilizadas nos pacientes resistentes a este medicamento. Outros medicamentos como Bosutinibe (SKI-606) e MK0457 também estão sendo testadas em pacientes resistentes ao Imatinibe.

O dasatinibe é um novo agente que foi aprovado para o tratamento de adultos com LMC em fase crônica, fase acelerada ou crise blástica resistentes ou intolerantes ao tratamento prévio com imatinibe. Dasatinibe (Sprycel®, Bristol-Myers Squibb, NY, USA) é um inibidor de tirosina quinase BCR/ABL disponível na forma oral, sendo, *in vitro*, 300 vezes mais ativo do que o imatinibe. Também *in vitro*, o dasatinibe tem se mostrado ativo contra todas as mutações da oncoproteína BCR/ABL resistentes ao imatinibe, com exceção da T315I (HOCHHAUS, 2007).

O dasatinibe é um inibidor de múltiplos alvos, sendo capaz de inibir a tirosina quinase BCR/ABL, a família de quinze Src, o c-Kit o PDGFR (CORTES, 2005; JABBOUR, 2007). O dasatinibe é um duplo inibidor Src/ABL, isto é, inibidor da família de quinases Src que também exhibe propriedades inibitórias ao ABL. (O'HARE, 2005; HOCHHAUS, 2008). Ele é um forte inibidor da enzima tirosina quinase mostrando uma potência muito maior que o imatinibe (O'HARE, 2005; COPLAND, 2006). Além disso, o dasatinibe, diferentemente do imatinibe, inibe as formas ativas e inativas da molécula BCR/ABL (COPLAND, 2006; DELAMAIN, 2008).

A habilidade do dasatinibe em inibir efetivamente a proliferação de células mutantes resistentes ao imatinibe sugere que este composto tem significativo potencial terapêutico na LMC. Entretanto, a toxicidade hematológica desta droga pode ser observada em pacientes em fase de doença mais avançada (TOKARSKI, 2006; DELAMAIN, 2008).

Em relação às citopenias, o dasatinibe mostrou perfil de anemia, leucopenia, neutropenia e trombocitopenia um pouco maior que o observado com o uso de imatinibe. A toxicidade hematológica também foi maior com o uso de dasatinibe e a toxicidade não hematológica foi bastante semelhante, com exceção da efusão pleural e edema pulmonar que não foi constatada com uso de imatinibe (HOCHHAUS, 2007)

O nilotinibe (AMN-107, Tassigna®) é uma nova aminopiridina, sendo uma droga análoga ao imatinibe; entretanto, a seletividade e a afinidade de ligação contra a quinase ABL do nilotinibe é substancialmente maior quando comparada ao imatinibe (O'HARE, 2005). A ação do nilotinibe parece ser mais potente que a do imatinibe, e funciona como um inibidor de imatinibe-resistente de BCR/ABL (O'HARE, 2005; HAZARIKA, 2008). *In vitro* é um excelente inibidor de fosforilação de BCR/ABL, sendo projetado para ligar fortemente a proteína BCR/ABL, aumentando assim sua eficácia (JABBOUR, 2007).

O nilotinibe interage com Glu286 e a Asp381 formando uma molécula de AMN107, que é um inibidor ATP-competitivo da atividade da proteína tirosino quinase do BCR/ABL, prevenindo a ativação das vias mitogênico e antiapoptótica dependentes do BCR/ABL, levando à morte do fenótipo do BCR/ABL (DELAMAIN, 2008). Ele também inibe o c-Kit e o PDGFR, mas, assim como o dasatinibe, não inibe o domínio de mutação T315I do gene BCR/ABL (JABBOUR, 2007). Esta droga foi recentemente aprovada e tem demonstrado respostas em pacientes que estão em tratamento das fases crônica e acelerada da LMC e que são resistentes ou intolerantes ao tratamento com imatinibe (DELAMAIN, 2008).

Nilotinibe e dasatinibe parecem ser igualmente ativas contra todas as mutações conhecidas que promovem resistência ao imatinibe, exceto a T315I, nas doses terapêuticas utilizadas (SHAH, 2004; WEISBERG, 2005).

1.4 QUIMIOCINAS

As quimiocinas, também designadas de citocinas quimiotáticas (LAURENCE, 2006) constituem um grupo de pequenas proteínas solúveis e altamente básicas, cujo peso molecular varia de oito a dez kDa (BALKWILL, 2004a; LAURENCE,

2006) com algumas exceções, como a linfotactina (Lptn) que possui 16 kDa e a fractalcina ou neurotactina, com 38 kDa (WANG, 1998).

Sua descoberta original data de 1987 e, curiosamente, surgiu no decorrer do estudo da migração de linfócitos T para o timo (PEASE, 2006). As quimiocinas têm função de mensageiros intercelulares e são produzidos por vários tipos celulares e estão presentes durante a infecções e em processos inflamatórios, onde a presença de leucócitos é essencial na resposta do hospedeiro.

Poucos campos de estudo da Biologia Molecular sofreram revolução tão acentuada quanto ao campo das quimiocinas. A primeira molécula descrita como potente quimioatraente para neutrófilos, conhecida como IL-8, foi clonada na década de 90 (WOLPE *et al.*, 1988; WADA *et al.*, 1994).

Desde as décadas de 60-70, foram caracterizadas mais de 50 quimiocinas humanas e muitos homólogos em murinos. Seus efeitos estendem-se muito além de atrair leucócitos aos sítios de inflamação. Evidências indicam que as quimiocinas participam no desenvolvimento de órgãos, na angiogênese na recirculação dos leucócitos e na regulação imunológica (LUSTER *et al.*, 1995; YOSHIMURA *et al.*, 1987; WALZ *et al.*, 1989; BAGGIOLINI *et al.*, 1994; SARAFI *et al.*, 1997, LUSTER, 1998; CHENSUE, 2001).

As quimiocinas constituem uma grande família de mediadores inflamatórios e imunológicos, e apresentam similaridade com as citocinas, bem como diferenças claras. Assim como as citocinas, as quimiocinas são proteínas secretórias produzidas por leucócitos e células teciduais constitutivamente ou após indução, e exercem seus efeitos localmente de forma autócrina ou parácrina. Entretanto as quimiocinas são muito menores que as citocinas e desempenham sua atividade via receptores com sete α -hélices transmembrana acoplados à proteína G, os quais são típicos para atração de leucócitos (BAGGIOLINI, 2001).

As quimiocinas promovem um direcionamento no movimento dos leucócitos em desenvolvimento, na homeostasia e na inflamação. A migração de leucócitos do sangue para os tecidos faz parte de múltiplos passos, envolvendo uma série de interações coordenadas entre leucócitos e células endoteliais (SPRINGER, 1995). Diversas famílias de moléculas regulatórias como integrinas, quimiocinas e selectinas controlam diferentes passos deste processo. As selectinas facilitam o movimento dos leucócitos ao longo da superfície das células endoteliais (“rolling”). Acredita-se que as quimiocinas produzam sinais específicos que convertem as interações de baixa afinidade entre integrinas e selectinas, em interações de alta afinidade, resultando na migração dos leucócitos.

As quimiocinas são secretadas nos sítios inflamatórios e de infecção pelas células teciduais residentes, pelos leucócitos residentes e recrutados, e pelas células endoteliais ativadas por citocinas. São retidas localmente na matriz extracelular e na superfície celular (proteoglicanas heparan sulfato) mantendo um gradiente de concentração em torno do estímulo inflamatório e também do restante do endotélio. Da mesma forma que os leucócitos recrutados são ativados pelas citocinas pró-inflamatórias locais, eles podem tornar-se dessensibilizados ao sinal de outras quimiocinas pela alta concentração local das mesmas (BAGGIOLINI, 2001).

Quimiocinas são constituídas de 70 a 130 aminoácidos com quatro resíduos de cisteína conservados (BAGGIOLINI, 1994, 1997), de 8 a 10 kDa com 20 a 70% de homologia na seqüência de aminoácidos. Como proteínas secretórias, são sintetizadas com uma seqüência guia de 20-25 aminoácidos, a qual é retirada antes de sua liberação. Duas famílias principais, CXC e CC, também conhecidas como α e β quimiocinas, são distinguidas de acordo com a posição dos dois primeiros resíduos de cisteína, os quais são separados por um aminoácido variável (CXC) ou são adjacentes (CC). As cisteínas formam duas pontes dissulfeto (Cys1 \rightarrow Cys3 e Cys2 \rightarrow Cys4), o que confere às quimiocinas sua estrutura tridimensional. As pontes dissulfeto mantêm as regiões amino terminais juntas, o que é essencial para sua atividade biológica (BAGGIOLINI, 2001).

Uma nomenclatura sistemática para as quimiocinas e para seus receptores se tornou necessária com a descoberta de muitas moléculas novas. Esta classificação (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000) baseia-se no princípio estabelecido para os receptores na Conferência Gordon em Citocinas Quimiotáticas de 1966. Os receptores são definidos como CXC, CC, XC e CX3C, seguidos pela letra R (receptor) e um número. As quimiocinas são definidas seguindo o mesmo padrão, baseado em sua estrutura, seguidas pela letra L (ligante) e pelo número de seu gene. Enquanto que a nomenclatura sistemática tem sido adotada para os receptores, a maioria das quimiocinas ainda é distinguida por seus nomes tradicionais (BAGGIOLINI, 2001).

As quimiocinas se ligam a múltiplos receptores, e o mesmo receptor usualmente liga-se a mais de uma quimiocina. Entretanto, há uma exceção para esta regra, que é uma α -quimiocina, o Fator Derivado do Estroma da medula Óssea-1 (SDF-1). Esta quimiocina liga-se especificamente ao CXCR4 (HORUK, 2001) e também ao CXCR7 (WANG et. al., 2007).

Quimiocinas não apenas orquestram a resposta migratória das células envolvidas nas reações inflamatórias, mas também possui papel significativo no tráfego de vários tipos celulares durante a embriogênese (SCHIER, 2003).

Virtualmente, cada tecido e tipo celular residente podem ser induzidos a secretar quimiocinas. Enquanto determinadas células, como os macrófagos podem produzir uma variedade de quimiocinas, há tecidos que exibem uma produção restrita, sugerindo que algumas quimiocinas têm funções órgão-específicas (CHENSUE, 2001).

A identificação de um grande número de receptores de quimiocinas e a caracterização de sua seletividade e expressão em diferentes tipos de leucócitos tem fornecido informações sobre a regulação do tráfego de leucócitos na saúde e na doença (DE OLIVEIRA *et. al.*, 2007).

As quimiocinas podem ser secretadas por células tumorais, células adjacentes ao tumor e em locais de metástases sendo muito importantes no contexto do câncer (ROLLINS, 1997).

Uma das principais causas da falha do tratamento e morte dos pacientes com câncer é a metástase para órgãos secundários (DEWAN, 2006). Metástase em câncer é resultado de várias etapas sequenciais e representa um processo altamente organizado, não-randômico e órgão-seletivo (NICOLSON, 1993).

O crescimento do tumor primário, a invasão e a metástase para órgãos distantes são dependentes de uma verdadeira rede de eventos altamente regulados que incluem: transformação celular, ambiente pró angiogênico, crescimento das células tumorais, invasão através da matriz extracelular e das células endoteliais, entrada na circulação sanguínea e finalmente a metástase não randômica das células tumorais à órgãos distantes (ARVANITAKIS *et al.*, 1997; VICARI & CAUX, 2002).

Ultimamente têm-se discutido o papel das quimiocinas e o seu envolvimento nas neoplasias. O fator-1 derivado do estroma da medula óssea (SDF-1/CXCL12) é uma quimiocina da subfamília CXC de quimiocinas que, através do seu receptor (CXCR4), desenvolve importantes funções na migração, retenção e desenvolvimento de progenitores hematopoiéticos na medula óssea. Além disso, o sistema CXCL12/CXCR4 está envolvido na quimiotaxia de células cancerosas e na metástase tumoral (KANG *et al.*, 2005).

Um grande número de células tumorais expressam receptores de quimiocinas em sua superfície celular, que, quando ativados, desencadeiam vias de sinalização intracelular envolvidas na sobrevivência, proliferação, invasão e crescimento

tumoral (BALKWILL, 2004b; VANDERCAPPELLEN, 2008). Além disso, muitas células tumorais são capazes de secretar quimiocinas, que atuam de forma autócrina sobre a massa tumoral. Em ambos os casos, considera-se que as quimiocinas possuem um efeito direto nas células tumorais (BEN-BARUCH, 2006a).

Admite-se também que as quimiocinas podem regular a migração de células tumorais a locais metastáticos específicos, onde encontram condições que favorecem sua viabilidade. Nesse caso, os locais onde a metástase será formada devem apresentar elevada expressão de quimiocinas e estas devem induzir a migração das células tumorais que expressam seu receptor correspondente (ROLLINS; BEN-BARUCH, 2006a).

Verificou-se que células tumorais como as células do tumor de mama podem ser guiadas através da corrente sanguínea até órgãos distantes que expressem quimiocinas como o CXCL12, pois estas células possuem receptores que possibilitam este evento. As células tumorais invadiriam estes órgãos e então formariam tumores secundários. Diante desse quadro, novas pesquisas apontam no sentido de evitar esses mecanismos, tentando interferir na interação entre receptores celulares e quimiocinas (MULLER *et al.*, 2001; MURPHY, 2001).

Um número de quimiocinas tem sido reportado por mobilizar células tronco hematopoiéticas e células progenitoras ou células sanguíneas diferenciadas, incluindo a proteína-1 inflamatória de macrófagos (MIP-1 α /CCL3), interleucina 8 (IL-8/CXCL8), fator derivado do estroma da medula óssea (SDF-1) entre outros (PELUS *et al.*, 2002).

Observou-se que as células leucêmicas escapam da apoptose *in vitro* quando entram em contato com as células produtoras de CXCL12. Sugere-se que as quimiocinas e seus receptores, além de governar a migração das células leucêmicas, também podem contribuir para resistência das células leucêmicas à apoptose induzida pela quimioterapia. É possível que os receptores CXCR4 entre outros possam representar um novo alvo para o desenvolvimento de tratamentos efetivos para esta doença (BURGER & KIPPS, 2002).

1.5. CXCL12 (SDF-1) E CXCR4

O Fator Derivado do Estroma da Medula Óssea 1 (SDF-1) é membro da subfamília CXC de quimiocinas e é expresso pelas células estromais, incluindo fibroblastos e células endoteliais (MULLER *et al.*, 2001, SALVUCCI *et al.*, 2002). pertencente à família CXC (alfa-quimiocina) foi inicialmente descrito como um fator derivado de células do estroma da medula óssea, e um fator pré-estimulador de células B. O SDF-1, também

conhecido como CXCL12, é uma quimiocina constitutivamente expressa por células do estroma medular e por outros tecidos. Inúmeros estudos sugerem que o SDF-1 desempenha um papel fundamental no *homing* de células tronco e de células progenitoras hematopoiéticas (AIUTI *et al.*, 1997).

O SDF-1/CXCL12 é uma quimiocina homeostática que sinaliza através do receptor de quimiocina CXCR4, o qual possui importante papel no processo de hematopoiese, desenvolvimento e organização do sistema imune (BURGER & KIPPS, 2006).

O CXCR4 é um dos receptores conhecido para CXCL12. A ligação desta quimiocina com seu receptor exibe efeito quimiotático para leucócitos *in vitro*, tendo uma alta capacidade quimioatraente *in vivo* (RAZMKHAH *et al.*, 2005).

A ação da quimiocina CXCL12 sobre o receptor CXCR4 já é bem conhecida, no entanto, estudos recentes demonstram sua correlação com outro receptor heptamérico transmembrana, CXCR7. O mecanismo de ação sobre tal receptor é diverso ao primeiro, não ocorrendo alteração conformacional seguido de liberação de mediadores intracitoplasmáticos, sendo os sinais extracelulares correspondentes à resposta a quimiocina da via sinalizadora (KALATSKAYA *et al.*, 2009).

Estudos demonstraram que o CXCL12 mobiliza células hematopoiéticas progenitoras e células tronco, com a capacidade de repopular tecidos (HATTORI *et al.*, 2001). O efeito mobilizador do CXCL12 foi diretamente relacionado à sua concentração no plasma, sugerindo que estas respostas são controladas por um gradiente de concentração de quimiocinas.

Muller *et al.* (2001) mostraram que, no câncer de mama, os órgãos-alvo de metástase expressam altos níveis da quimiocina CXCL12, e induzem a movimentação específica das células tumorais de mama que expressam o receptor correspondente a esta quimiocina, o CXCR4. Também se verificou que o receptor CXCR4 é altamente expresso em tecidos tumorais mamários, mas não no tecido normal de mama, e que seu ligante CXCL12, da mesma forma, encontra-se altamente expresso na medula óssea, pulmão e linfonodos, locais onde se observa maior ocorrência de metástases neste tipo de câncer. Observou-se, inclusive, que a neutralização com anticorpos monoclonais contra o CXCR4 acarretou a redução de metástases das células tumorais de mama para o pulmão e linfonodos em camundongos.

Além disso, uma vez que as células tumorais interagem com a CXCL12, via seu receptor, ocorre a indução da sinalização intracelular que aumentam as propriedades metastáticas, de crescimento e de sobrevivência das células anormais (BEN-BARUCH,

2006b). De fato, as quimiocinas e seus receptores parecem favorecer a proliferação e a sobrevivência das células tumorais mesmo sob condições de estresse. Em condições de hipóxia observa-se o aumento da expressão do CXCR4, que favorece o crescimento do tumor (STALLER, 2003).

Recentes estudos têm mostrado que tumores de origem nas células hematopoiéticas e não hematopoiéticas expressam diferentes receptores de quimiocinas que podem estar envolvidos no crescimento celular neoplásico, metástase e angiogênese. Desordens humanas linfoproliferativas parecem ser provenientes de transformações malignas de células linfocíticas normais congeladas em um discreto estágio de maturação. Mostraram ainda que em desordens linfoproliferativas agudas ou crônicas, o CXCR4 é ativado em muitas malignidades de células T e B e podem estar envolvidas na metástase localizada dos elementos neoplásicos. Receptores de quimiocina adicionais são expressos nas desordens linfoproliferativas individuais, mas eles são frequentemente não funcionais (PISTOIA *et al.*, 2006).

Tem sido identificado um número crescente de moléculas quimioatraentes capazes de permitir a migração *in vitro* de células linfóides malignas (LEGDEUR *et al.*, 1997; MOHLE *et al.*, 1998; BURGER *et al.*, 1999), como por exemplo, na leucemia linfóide crônica, onde as células leucêmicas expressam CXCR4 e são atraídas pelo gradiente da quimiocina CXCL12 (BURGER *et al.* 1999; MOHLE *et al.*, 1999; NISHII *et al.*, 1999; BRADSTOCK *et al.*, 2000; MOHLE *et al.*, 2000). Em adição, o CXCR4 é altamente expresso em células de linfoma, bem como em linhagens mielóides (BURGER & KIPPS, 2002).

O CXCL12 pode estimular a sobrevivência e o crescimento de células neoplásicas de maneira parácrina, além de promover angiogênese no tumor em desenvolvimento (BURGER & KIPPS, 2006).

O sequenciamento da quimiocina SDF-1 (CXCL12), (GenBank: L36033), revelou um polimorfismo no segmento evolucionário conservado da região 3' não traduzida (3'UTR), (posição 801 G → A) do gene estrutural transcrito. Este polimorfismo, designado SDF1-3'A ou CXCL12 rs1801157-alelo A. Este alelo variante pode ter funções regulatórias importantes, resultantes do aumento na concentração de SDF-1 (WINKLER *et al.*, 1998).

Em diversas análises com organismos vertebrados, demonstrou-se que a região 3'UTR é mais longa que sua análoga 5'UTR, indicando um significativo potencial regulatório. Além disso, a própria variação na extensão da região 3'UTR tem aumentado durante os processos evolutivos, sugerindo um papel maior na complexidade das espécies (MAZUMDER *et al.*, 2003).

As regiões 3' não codificadoras (UTR) de RNAs mensageiros para muitos genes têm sido identificadas como regiões regulatórias importantes do transcrito de RNA por si só, bem como do produto originado. Na maioria dos casos, os mecanismos de controle da tradução resultam da interação entre proteína -RNA com as regiões 5' ou 3' UTR. Um exemplo é a proteína quinase dependente de RNA (PKR), ativada por regiões 3'UTR do RNA, a qual pode gerar diversos efeitos, inclusive anti-tumorais (NUSSBAUM *et al*, 2002).

A associação entre o polimorfismo genético do CXCL12 tem sido amplamente investigada quanto à resistência a infecção pelo HIV e a progressão da AIDS (TIENSIWAKUL *et al*, 2004; WATANABE *et al*, 2003).

As leucemias são alterações clonais caracterizadas por um descontrole da proliferação de células da linhagem hematopoiética. Nas leucemias agudas, existe um bloqueio na diferenciação das células hematopoiéticas ou linfopoiéticas conduzindo a um acúmulo de blastos imaturos circulantes no sangue, medula óssea, e algumas vezes, em sítios extra medulares. Observou-se que as células leucêmicas escapam da apoptose *in vitro* quando entram em contato com células produtoras de CXCL12. Sugere-se que as quimiocinas e seus receptores, além de governar a migração das células leucêmicas, também podem contribuir com sua notável resistência à apoptose induzida pela quimioterapia. É possível que os receptores CXCR4 entre outros possam representar um novo alvo para o desenvolvimento de tratamentos efetivos para esta doença (BURGER & KIPPS, 2002).

Baseado nessas informações o trabalho visou investigar a mutação descrita e a sua influência na concentração da quimiocina CXCL12 e quais implicações essa influência teria na leucemia mielóide crônica?

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência do polimorfismo CXCL12 rs1801157-alelo A na região 3' UTR da quimiocina CXCL12 e a expressão de RNAm da quimiocina CXCL12 e de seu receptor CXCR4 em indivíduos saudáveis e pacientes com leucemia mielóide crônica submetidos a diferentes protocolos de tratamentos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a ocorrência do polimorfismo CXCL12 rs1801157-alelo A na região 3'UTR do gene da quimiocina CXCL12 na população com Leucemia Mielóide Crônica e dos Doadores Saudáveis do Hemocentro e do Hospital Universitário.

Correlacionar os resultados de polimorfismo CXCL12 rs1801157-alelo A e expressão de RNAm da Quimiocina CXCL12 e de seu receptor CXCR4 com os diferentes protocolos de tratamento dos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica.

REFERÊNCIAS

- AIUTI, A.; WEBB, I. J.; BLEUL, C.; SPRINGER, T.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.*, 185: 111-120, 1997.
- ARVANITAKIS, L.; GERAS-RAAKA, E.; VARMA, A.; GERSHENGORN, M. C.; CESARMAN, E. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature*, v. 385, p.347-350, 1997.
- ASTER, J.; KUMAR, V. Leucócitos, linfonodos, baço e timo. In: CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap.15, p.580-625.
- BACCARANI, M.; SAGLIO, G.; GOLDMAN, J.; HOCHHAUS, A.; SIMONSSON, B.; APPELBAUM, F.; APPERLEY, J.; CERVANTES, F.; CORTES, J.; DEININGER, M.; GRATWOHL, A.; GUILHOT, F.; HOROWITZ, M.; HUGHES, T.; KANTARJIAN, H.; LARSON, R.; NIEDERWIESER, D.; SILVER, R.; HEHLMANN, R. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 108: 1809-1820, 2006.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55: 97-179, 1994.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. *Annual Review of Immunology* 15: 675-705, 1997.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.*, 250:91-104, 2001.
- BALKWILL, F.: Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004a, 4(7):540-550.
- BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M: Cancer: an inflammatory link. *Nature* 2004b, 431(7007):405-406.
- BEN-BARUCH, A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 2006a, 25(3):357-371.
- BEN-BARUCH, A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin Cancer Biol* 2006b, 16(1):38-52.
- BRADSTOCK, K. F.; MAKRYNIKOLA, V.; BIANCHI, A.; SHEN, W.; HEWSON, J.; GOTTLIEB; D. J. Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers. *Leukemia*, v. 14, p. 882–888, 2000.
- BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; WALSH, S. Detection of BCR/ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*, v. 102, n. 1, p.276-83, 2003.

- BURGER, J. A.; BURGER, M.; KIPPS, T. J. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCL12 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, v. 94, p. 3658-3667, 1999.
- BURGER, J. A.; KIPPS, T. J. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia and Lymphoma*, v. 43, p.461-466, 2002.
- BURGER, J. A.; KIPPS, T. J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 107: 1761-1767, 2006.
- CANCER NET. Oral complications of chemotherapy and head/neck radiation: Supportive care-health professionals. Disponível em: <http://www.cancernet.nci.nih.gov>. Acessado em: 20 jun. 2010.
- CHENSUE, STEPHEN W. Molecular Machinations: Chemokine Signals in Host-Pathogen Interactions. *Clinical Microbiology Reviews*, v.4, p. 821-835, 2001.
- COLBY-GRAHAM, F. M.; CHORDAS, C. The childhood leukemias. *J Pediatr Nurs*, v.8, n.2, p.87-95, Apr. 2003.
- COOPER, GEOFFREY M. *The Cell -A Molecular Approach*. ASM Press, 1997, cap.15, p.599-635.
- COPLAND, M.; HAMILTON, A.; ELRICK, L. J.; BAIRD, J. W.; ALLAN, E. K.; JORDANIDES, N.; BAROW, M.; MOUNTFORD, J. C.; HOLYOAKE, T. L. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*. 2006;107(11):4532-9.
- CORTES, J. E.; O'BRIEN, S. M.; GILES, M. Investigational strategies in chronic myelogenous leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 18, p. 619-639, 2004.
- CORTES, J.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S.; JONES, D.; LUTHRA, R.; SHAN, J.; GILES, F.; FADERL, S.; VERSTOVSEK, S.; GARCIA-MANERO, G.; RIOS, M. B.; KANTARJIAN, H. (2005). Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin. Cancer Res.*, 11, 3425-3432.
- COTTA, C. V.; BUESO-RAMOS, C. E. New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann. Diagn. Pathol.*, Filadélfia, v.11, p.68-78, 2007.
- DEININGER, M. W. N.; GOLDMAN, J. M.; LYDON, N. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR/ABL-positive cells. *Blood*, v. 90, n. 9, p. 3691-3698, 1997.
- DEININGER, M. W. N.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, v. 96, n. 10, p. 3343-3354, 2000.
- DELAMAIN, M. T.; CONCHON, M. Os inibidores de tirosino quinase de segunda geração. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(1):37-40.

- DE OLIVEIRA, K. B.; FUJITA, T. C.; ODA, J. M. M.; AOKI, M. N.; TATAKIHARA, R. I.; CARNEIRO, J. L. D. O.V.; WATANABE, M. A. E. Envolvimento das quimiocinas e seus receptores na patogênese de doenças infecciosas e inflamatórias. *biosaúde, Londrina*, v. 9, n. 1/2, p. 41-64, jan./dez. 2007.
- DEWAN, M. Z.; AHMED, S.; IWASAKI, Y.; OHBA, K.; TOI, M.; YAMAMOTO, N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60; 273-276, 2006.
- DRUKER, B. J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E.; OHNO SAYURI, SEGAL G. M.; FANNING, S.; ZIMMERMANN, J.; LYDON, N. B. Effects of a selective inhibitor of the ABL tyrosine kinase on the growth of BCR/ABL positive cells. *Nature Medicine*, v. 2, n. 5, p. 561-566, 1996.
- DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. Lessons learned from the development of ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest., New Haven* , v.105, p 3-7, Jan. 2000.
- DULLEY, F.; HAMERSCHLACK, N. Leucemia mielóide crônica. *Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (Abrale)*, n. 25, p. 11-12, 2004.
- FADERL, S.; KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. *Oncology*, v. 13, n. 2, p. 169-184, 1999.
- FERNANDEZ-LUNA, J. L. BCR/ABL and inhibition of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Apoptosis*, 2000; 5: 315-8.
- FORKNER, C. E.; SCOTT, T. F. M. Arsenic as a therapeutic agent in chronic myeloid leukemia. Preliminary report. *JAMA* 97: 3-5, 1931.
- FRAZER, R.; IRVINE, A. E.; MCMULLIN, M. F. Chronic myeloid leukaemia in the 21st Century. *Ulster Med. J., Belfast* , v. 76(1), p. 8-17, November 2006.
- GOLDMAN, J. M. Chronic myeloid leukemia: still a few questions. *Experimental Hematology*, v. 32, p. 2-10, 2004.
- GRIESSHAMMER, M.; HEINZE, B.; HELLMANN, A. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis: retrospective analysis of prognostic factors in 90 patients. *Annals of Hematology*, v. 73, p. 225-230, 1996.
- GORRE, M. E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR/ABL gene mutation or amplification. *Science*, v. 293, p. 876-880, 2001.
- HATTORI, K.; HEISSIG, B.; TASHIRO, K.; HONJO, T.; TATENO, M.; SHIEH, J. H.; HACKETT, N. R.; QUITORIANO, M. S.; CRYSTAL, R. G.; RAFII, S.; MOORE, M. A. Plasma elevation of stromal cell derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, 979: 3354-3360, 2001.
- HAZARIKA, M.; JIANG, X.; LIU, Q.; LEE, S. L.; RAMCHANDANI, R.; GARNETT, C. *et al.* Tasigna for chronic and accelerated phase Filadélfia chromosome – positive chronic

myelogenous leukemia resistant to or intolerant of imatinib. *Clin Cancer Res.* 2008;14(17): 5325-31.

HEHLMANN, R.; BERGER, U.; HOCHHAUS, A. Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. *Ann Hematol* 84: 487-497, 2005.

HEHLMANN, R.; SCHIFFER, C. A. BCR/ABL tyrosina kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 357, p. 258-65, Jul. 2007.

HELMANN, R.; HEIMPEL, H.; HASFORD, J. Randomized comparison of bulsufan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. *Blood*, v. 82, p. 398,1993.

HOCHHAUS, A. Dasatinib for the treatment of Filadélfia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia after imatinib failure. *Expert Opinion.* 2007;8(18):3257-64.

HOFFBRAND, A. V.;PETTIT, J. E. *Essential Haematology.* 3 ed, Blackwell Scientific Publications, 1993.

HORUK, R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev;* 12: 313-335, 2001.

INCA. Particularidades do câncer infantil. Disponível em: <http://www.inca.org.br/cancer/tipos.html>. Acesso em: 20 jun. 2010.

JABBOUR, E.; CORTES, J. E.; GILES, F. J.; O'BRIEN, S.; KANTARJIAN, H. M. Current and emerging treatment options in chronic myeloid leukemia. *Cancer.* 2007;109(11):2171-81.

JAMUR, V. R. Estudo citogenético de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica tratados com o Mesilato de Imatinibe Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

JOHN, A. M.; THOMAS, N. S. B.; MUFTI, G. J, PADUA, R. A. Seminars in cancer biology: Target therapies in myeloid leukemia. *Science*, Washington, v. 14, p. 41-62, Feb. 2004.

KALATSKAYA, I.; BERCHINE, A. Y.; GRAVEL, S.; LIMBERG, J.; ROSENBAUM, J. S.; HEVEKER, N. AMD3100 Is a CXCR7 Ligand with Allosteric Agonist Properties. *Mol Pharmacol* 75:1240–1247, 2009.

KANG, H.; MANSEL, R. E.; JIANG, W. G. Genetic manipulation of stromal cell-derived factor attests the pivotal role of the autocrine SDF-1-CXCR4 pathway in the aggressiveness of breast cancer cells. *Int J Oncol*, 26(5): 1429-34, 2005.

KANTARJIAN, H. J.; DEISSEROTH, A.; KURZROCK, R.; ESTROV, Z.; TALPAZ, M. Chronic Myelogenous Leukemia: A concise update. *Blood* 82(3): 691-703, 1993.

KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S. Imatinib mesylate for Filadélfia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon-alpha: follow-up results. *Clinical Cancer Research*, v. 8, p. 2177–2187, 2002a

- KANTARJIAN, H.; SAWYERS, C.; HOCHHAUS, A.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C.; NIEDERWIESER, D.; RESTA, D.; CAPDEVILLE, R. et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinibe mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 346:645-652, 2002b..
- KEATING, M. J.; KANTARJIAN, H. Leucemias crônicas. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. (Org.). *Cecil: tratado de medicina interna*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1331-1336.
- LAURENCE, A. D. Location, movement and survival: the role of chemokines in haematopoiesis and malignancy. *Br J Haematol* 2006, 132(3):255-267.
- LE COUTRE, P.; MOLOGNI, L.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; BUCHDUNGER, E.; GIARDINI, R.; FORMELLI, F.; GAMBACORTI-PASSERINI, C. In vivo eradication of human BCR/ABL positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 91, p.163-168, 1999.
- LEGDEUR, M. C.; BEELEN, R. H.; SCHUURHUIS, G. J.; BROEKHOVEN, M. G.; VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; TEKSTRA, J.; LANGENHUIJSEN, M. M.; OSSENKOPPELE, G. J. A functional study on the migration of human monocytes to human leukemic cell lines and the role of monocyte chemoattractant protein-1. *Leukemia*, v.11, p. 1904– 1908, 1997.
- LUSIS, M. K. P. Classificação FAB das leucemias mielóides agudas. *Rev.Bras. Hematol.Hemoter*, 2000. 22, 175-178.
- LUSTER, A. D.; GRENBERG, S. M.; LEDER, P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med*, 1995; 182: 219-31.
- LUSTER, A. D. Mechanisms of Disease: Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England Journal of Medicine*, v. 338, p.436-445,1998.
- MAHON, F. X.; DEININGER, M. W.; SCHULTHEIS, B. Selection and characterization of BCR/ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*, v. 96, p. 1070-1079, 2000.
- MANASH, K. P.; MURKHOPADHYAY, A. K. Tyrosine kianse – Role and significance in cancer. *Int. J. Med. Sci.*, p.101-115, June 2004.
- MAZUMDER, B.; SESHADRI, V.; FOX, P. L. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem. Sci.*, 28: 91-98, 2003.
- MCKENNA, S. J. Leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.89, n.2, p.137-139, Feb. 2000.
- MELO, J. V.; HUGHES, T. P.; APPERLEY, J. F. Chronic myeloid leukemia. *Hematology (American Society of Hematology Educational Program)*, p. 132-152, 2003.
- MÖHLE, R.; BAUTZ, F.; RAFII, S.; MOORE, M. A. S.; BRUGGER, W.; KANZ, L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34⁺ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*, v. 91, p. 4523-4530, 1998.

MÖHLE, R.; FAILENSCHMID, C.; BAUTZ, F.; KANZ, L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1. *Leukemia*, 13: 1954– 1959, 1999.

MÖHLE, R.; SCHITTENHELM, M.; FAILENSCHMID, C.; BAUTZ, F.; KRATZ-ALBERS, K.; SERVE, H.; BRUGGER, W.; KANZ, L. Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 110: 563–572, 2000.

MORRISON, V. A. *Chronic leukemias*. *CA Cancer J Clin*; 1994; 44: 353-77.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; G. E. N.; CATRON, D.; BUCHANAN, M. E.; MCCLANAHAN, T.; MURPHY, E.; YUAN, W.; WAGNER, S. N.; BARRERA, J. L.; MOHAR, A.; VERASTEGUI, E.; ZLOTNIK, A. *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. *Nature*, 410:50-56, 2001.

MURPHY, M. P. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N. Engl. J. Med.*, 345: 833-835, 2001.

NEVILLE, B. W. *et al.* Distúrbios hematológicos. In: *Patologia Oral e maxillofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap.13, p.405-430.

NICOLSON, G. L. Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metastasis Rev*; 12:325-43, 1993.

NISHII, K.; KATAYAMA, N.; MIWA, H.; SHIKAMI, M.; MASUYA, M.; SHIKU H.; KITA, K. Survival of human leukaemic B-cell precursors is supported by stromal cells and cytokines: association with the expression of bcl-2 protein. *British Journal of Haematology*, v. 105, p. 701–710, 1999.

NOWELL, R.; HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human granulocyte leukemia. *Science* 1960, p. 132, 1497.

NOWELL, P.; ROWLEY, J.; KNUDSON, A. Cancer genetics, cytogenetics-defining the enemy within. *Nature Medicine*, v. 4, n. 10, p. 1107-1111, 2002.

NUSSBAUM, J. M.; GUNNERY, S.; MATHEWS, M. B. The 3'-untranslated regions of cytoskeletal muscle mRNAs inhibit translation by activating the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Nucleic. Acids Res.*, 30: 1205-12, 2002.

O'HARE, T.; WALTERS, D. K.; STOFFREGEN, E. P.; JIA, T.; MANLEY, P. W.; MESTAN, J. *et al.* In vitro activity of BCR/ABL inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant ABL kinase domain mutants. *Cancer Res*. 2005;65(11):4500-5.

PASSWEG, J. R.; ROWLINGS, P. A.; HOROWITZ, M. M. Related donor bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 12, n. 1, p. 81-92, 1998.

- PASTERNAK, G. H.; SCHULTHEIR, B.; HEHLMANN, R. Chronic Myelogenous Leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1998; 124:643-60.
- PEASE, J. E.; TJ WILLIAMS. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *Br J Pharmacol*, 2006; 147 Suppl 1:S212-221.
- PELUS, L. M.; HOROWITZ, D.; COOPER, S. C.; KING, A. G. Peripheral blood stem cell mobilization: A role for CXC chemokines. *Critic. Rev. Oncol. Hematol.*, 43: 257-75, 2002.
- PISTOIA, V.; CORCIONE, A.; DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L. Lymphoproliferative disorders and chemokines. *Curr Drug Targets*. 2006 Jan;7(1):81-90.
- RAPAPORT, S. I. As leucemias linfocíticas. In: *Introdução a hematologia*, 2 ed. São Paulo: Roca, 1990. Cap. 17, p. 215-238.
- RAZMKHAH, M.; TALEI, A. R.; DOROUDCHI, M.; KHALILI-AZAD, T.; GHADERI, A. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) alleles and susceptibility to breast carcinoma. *Cancer Lett.*, 225: 261-266, 2005.
- ROLLINS, B. J. Chemokines. *Blood* 1997, 90(3):909-928.
- ROLLINS, B. J. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer* 2006, 42(6):760-767.
- RUBIN, E; FABER, J. L. Sangue e Órgãos linfóides. In: *Patologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 2002. Cap. 20, p.1015-1150.
- SALVUCCI, O.; YAO, L.; VILLALBA, S.; SAJEWICS, A.; PITTALUGA, S.; TOSATO, G. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood*; 99:2703-11, 2002.
- SARAFI, M. N.; GARCIA-ZEPEDA, E. A.; MACLEAN, J. A.; SHARO, I. F.; LUSTER, A. D. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *Journal of Experimental Medicine*, 185:99-109, 1997.
- SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. *Nature*, 2004; 432, 7015: 294-7.
- SCHIER, A. F. Chemokine signaling: Rules of attraction. *Curr Biol*; 13: R192-R194, 2003.
- SHAH, N. P.; TRAN, C.; LEE, F. Y.; CHEN, P.; NORRIS, D.; SAWYERS, C. L. Overriding Imatinib Resistance with a Novel ABL Kinase inhibitors. *Science*, Washington, v. 305, p. 309-491, Jul. 2004.
- SHERBENOU, D. W.; DRUKER, B. J. Applying the discovery of the Filadélfia chromosome. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v. 117, p.2067-2074, Aug. 2007.
- SILVER, R. T.; WOOLF, S. H.; HELLMANN, R. An evidence – based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood*, v. 94, n. 5, p. 1517-1536, 1999.

- SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57:827-872; 1995.
- STALLER, P.; SULITKOVA, J.; LISZTWAN, J.; MOCH, H.; OAKELEY, E. J.; KREK, W: Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 2003, 425(6955):307-311.
- STONE, R. M. Optimizing treatment of chronic myeloid leukemia: a rational approach. *The Oncologist*, v. 9, p. 259-270, 2004.
- TALPAZ, M.; SILVER, R. T, DRUKER. B. J.; GOLDMAN, J. M.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C. A.; FISCHER, T.; DEININGER, M. W.; LENNARD, A. L.; HOCHHAUS, A.; OTTMANN, O. G.; GRATWOHL, A.; BACCARANI, M.; STONE, R.; TURA, S.; MAHON, F. X.; FERNANDES-REESE, S.; GATHMANN, I.; CAPDEVILLE, R.; KANTARJIAN, H. M.; SAWYERS, C. L. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*, 2002; 99 (6): 1928-37.
- TEFFERI, A.; DEWALD, G. W.; LITZOW, M. L.; CORTES, J.; MAURO, M. J.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. M. Chronic myeloid leukemia: Current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 80(3): 390-402, 2005.
- TIENSIWAKUL, P. Stromal cell-derived factor (SDF) 1-3'A polymorphism may play a role in resistance to HIV-1 infection in seronegative high-risk Thais. *Intervirology*, 47: 87-92, 2004.
- TOKARSKI, J. S.; NEWITT, J. A.; CHANG, C. Y.; CHENG, J. D.; WITTEKIND, M.; KIEFER, S. E. *et al.* The structure of dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* 2006;66 (11):5790-7.
- VANDERCAPPELLEN, J.; VAN DAMME, J.; STRUYF, S: The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 2008, 267(2):226-244.
- VAN RHEE, F.; SZYDLO, R. M.; HERMANS, J.; DEVERGIE, A.; FRASSONI, F.; ARCESE, W.; DE WITTE, T.; KOLB, H. J.; NIEDERWISER, D.; JACOBSEN, N.; GAHRTON, G.; BANDINI, G.; CARRERAS, E.; BACIGALUPO, A.; MICHALLET, M.; RUUTU, T.; REIFFERS, J.; GOLDMAN, J. M.; APPERLEY, J.; GRATWOHL, A. Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transp* 20: 553-560, 1997.
- VIAL, T.; DESCOTES, J. Clinical toxicity of the interferons. *Drug Safety*, v. 10, n. 2, p. 115-150, 1994.
- VICARI, A. P.; CAUX, C.; Chemokines in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 13, p.143-154, 2002.
- YOSHIMURA, T.; MATSUSHIMA, K.; TANAKA, S. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Aca Sci USA*, 1987; 84:9233-7.

- WADA, T.; TOMOSUGI, N.; NAITO, T.; YOKOYAMA, H.; KOBAYASHI, K.; HARADA, A.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Prevention of proteinuria by the administration of anti-interleukin 8 antibody in experimental acute immune complex-induced glomerulonephritis. *Journal of Experimental Medicine*, 180:1135-1140, 1994.
- WALZ, A.; DEWALD, B.; VON TSCHARNER, V.; BAGGIOLINI, M. Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils. *J Exp Med*, 1989; 170:1745-50.
- WANG, J. M.; DENG, X.; GONG, W, S. U. S: Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods* 1998, 220(1-2):1-17.
- WANG, J.; SHIOZAWA, Y.; WANG, J.; WANG, Y.; JUNG, Y.; PIENTA, K. J.; MEHRA, R.; LOBERG, R.; TAICHMAN, R. S. The Role of CXCR7/RDC1 as a Chemokine Receptor for CXCL12/SDF-1 in Prostate Cancer. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, December 5, 2007, DOI 10.1074/jbc.M707465200.
- WATANABE, M. A. E.; CAVASSIN, G.G.O.; ORELLANA, M. D.; MILANEZI, C. M.; VOLTARELLI, J. C.; KASHIMA, S.; COVAS, D.T. SDF-1 gene polymorphisms and syncytia induction in Brazilian HIV-1 infected individuals. *Microbial. Pathog.*, 35: 31-34, 2003.
- WEISBERG, E.; MANLEY, P.W.; BREITENSTEIN, W.; BRUGGEN, J.; COWAN, J. S. W.; RAY, A.; HUNTLY, B.; FABBRO, D.; FENDRICH, G.; HALL, E. M.; JUNG, A. L.; MESTAN, J.; DALEY, G. Q.; CALLAHAN, L.; CATLEY, L.; CAVAZZA, C.; AZAM, M.; NEUBERG, D.; WRIGTH, R. D.; GILLILAND, D. G.; GRIFFIN, J. D. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant BCR/ABL. *Cancer Cell*. 2005;7:2542-51.
- WEISBERG, E.; MANLEY, P. W.; COWAN-JACOB, S. W.; HOCCHAUS, A.; GRIFFIN, J. D. Second generations inhibitors of BCR/ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Nature*, London, v. 7, p. 345-356, May 2007.
- WINKLER, C.; MODI, W.; SMITH, M. W.; NELSON, G. W.; WU, X.; CARRINGTON, M.; DEAN, M.; HONJO, T.; TASHIRO, K.; YABE, D.; BUCHBINDER, S.; VITTINGHOFF, E.; GOEDERT, J. J.; O'BRIEN, T. R.; JACOBSON, L. P.; DETELS, R.; DONFIELD, S.; WILLOUGHBY, A.; GOMPERS, E.; VLAHOV, D.; PHAIR, J.; O'BRIEN, S. J. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science*, 279: 389-393, 1998.
- WOLPE, S. D.; DAVATELIS, G.; SHERRY, B.; BEUTLER, B.; HESSE, D. G.; NGUYEN, H. T.; MOLDAWER, L. L.; NATHAN, C. F.; LOWRY, S. F.; CERAMI, A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *Journal of Experimental Medicine*, 167:570-581, 1988.
- ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification and their role in immunity. *Immunity*, 12:121-7; 2000.

3 ARTIGO A

**“ANÁLISE DO POLIMORFISMO CXCL12 RS1801157 E EXPRESSÃO DA
QUIMIOCINA HUMANA CXCL12 E DO SEU RECEPTOR CXCR4 EM LEUCEMIA
MIELÓIDE CRÔNICA”**

“ANÁLISE DO POLIMORFISMO CXCL12 RS1801157 E EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA HUMANA CXCL12 E DO SEU RECEPTOR CXCR4 EM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA”

Resumo

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença proliferativa do sistema hematopoiético caracterizada por uma superprodução de células da linhagem granulocítica. Cerca de 90% dos pacientes diagnosticados com LMC apresentam um “marcador” denominado cromossomo Filadélfia (Ph), produto de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22, caracterizando uma oncoproteína denominada BCR/ABL. Ultimamente têm-se discutido o papel das quimiocinas e o seu envolvimento nas neoplasias. Sabe-se que o fator derivado do estroma da medula óssea-1 (SDF-1/CXCL12) é uma quimiocina com importantes funções na migração, retenção e desenvolvimento de progenitores hematopoiéticos na medula óssea. Além disso, o sistema CXCL12/CXCR4 está envolvido na quimiotaxia de células cancerosas e na metástase tumoral. Portanto, o presente trabalho investigou a relação do polimorfismo rs1801157 CXCL12 com a expressão gênica de CXCL12 e CXCR4 em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica comparado aos indivíduos saudáveis. DNA e RNA de 44 pacientes com LMC do Hospital do Câncer de Londrina (HCL) e 42 doadores de sangue saudáveis do Hospital das Clínicas (HC) de Londrina foram analisados para o polimorfismo do rs1801157 CXCL12 e expressão gênica dos genes CXCL12 e CXCR4 por qRT-PCR. No presente estudo, não foi encontrada relação entre a presença do polimorfismo CXCL12 3’A para os doadores saudáveis e os pacientes acometidos por Leucemia Mielóide Crônica. Além disso, não houve correlação entre a expressão gênica de CXCL12 e de CXCR4 pelo teste de correlação de SPERMAN ($p = 0,621$). Entretanto, foi detectada uma maior expressão de CXCR4 (1,946 vezes maior) nos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica ($p = 0,009$) comparados aos indivíduos saudáveis. Os aspectos moleculares abordados neste trabalho podem auxiliar no diagnóstico e no prognóstico da leucemia, sendo um alvo que no futuro pode facilitar a compreensão dos mecanismos relacionados à progressão da leucemia.

Palavras-chave: LMC. Expressão gênica. CXCL12. CXCR4. PCR em tempo rReal.

Abstract

The chronic myeloid leukemia (CM) is a proliferative disease of hematopoietic system characterized by an overproduction of cells of granulocytic lineage. About 90% of patients diagnosed with CML have a “marker” called the Filadélfia chromosome (Ph), product of translocation between chromosomes 9 and 22, featuring an oncoprotein called BCR/ABL. A major cause of treatment failure and death of cancer patients is metastasis to secondary organs. Lately, have been discussions the role of chemokines and their involvement in malignancies. It is known that the factor-1 derive from bone marrow stroma (SDF-1/CXCL12) is a chemokine with important roles in migration, retention and development of hematopoietic progenitors in bone marrow. In addition, the system CXCL12/CXCR4 is involved in chemotaxis of cancer cells and tumor metastasis. Therefore, this study investigated the relationship of the polymorphism rs181157 in the

expression of CXCL12 and CXCR4 in patients with CML compared to healthy subjects. DNA and RNA from 44 CML patients in the Hospital Cancer of Londrina (HCL) and 42 healthy blood donors at the Clinical Hospital (CH) from Londrina were analyzed for the rs181157 polymorphism of CXCL12 and gene expression of CXCL12 and CXCR4 genes by qRT-PCR. In this study, no relationship was found between the presence of polymorphism for CXCL12 3'A and patients suffering from CML. Furthermore, no association between the expression of CXCL12 and CXCR4 by SPERMAN correlation test was observed ($p = 0.621$). However, we detect a higher expression of CXCR4 (1.946 more) in patients with CML ($p = 0.009$) compared to healthy subjects. The molecular aspects covered in this study may assist in diagnosis and prognosis of leukemia, as a target in the future that may facilitate the understanding of mechanism related to progression of leukemia.

Keywords: CML. Gene expression. CXCL12. CXCR4. Real time PCR.

3.1 INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa caracterizada pelo acúmulo excessivo de células mielóides. Trata-se de uma doença proliferativa do sistema hematopoiético, caracterizada pela expansão clonal de uma célula tronco primitiva e pluripotente que tem a capacidade de se diferenciar em células mielóides, monocíticas e megacariocíticas. Ela ocorre com uma incidência anual de 1,0-1,5 a cada 100.000 pessoas (PERROTTI, 2010).

A LMC foi a primeira doença neoplásica associada a uma aberração cromossômica (HEHLMANN, 2007). O cromossomo Filadelfia é uma translocação recíproca $t(9;22)(q34,q11)$, presente em 90% dos pacientes com LMC, que resulta na produção de uma proteína de fusão denominada BCR/ABL1 (anteriormente chamada de BCR/ABL), uma tirosina quinase constitutivamente ativa (JABBOUR, 2009).

A expressão de BCR/ABL em células hematopoiéticas induz a inibição da apoptose, independência de fatores de crescimento, alterações nas interações célula-célula e célula-matriz, e leucemogênese. Devido à atividade anti-apoptótica deste oncogene, células expressando BCR/ABL são altamente resistentes a agentes quimioterápicos (FERNANDEZ-LUNA, 2000).

O processo neoplásico da LMC é caracterizado por uma fase crônica, com duração aproximada de três a cinco anos, evoluindo inexoravelmente para a morte, com a transformação em um quadro leucêmico agudo. Inicialmente, são identificadas poucas manifestações clínicas, surgindo progressivamente sintomas constitucionais, esplenomegalia e

hepatomegalia. Eventualmente, o quadro é complicado por doença extramedular (TABAK, 2000).

Com o progresso da doença, as chances de falha nos tratamentos aumentam devido à presença de mutantes resistentes aos medicamentos, gerados principalmente através de mutações pontuais, formando sub- clones e resistentes (SHANNON, 2002; DRUKER, GAMBACORTI-PASSERINI, 2003).

A resistência aos quimioterápicos pode ser potencialmente superada pela combinação de múltiplos medicamentos. Vários alvos terapêuticos estão sendo estudados e novos compostos químicos estão sendo desenvolvidos na busca de auxiliar os pacientes resistentes a terapêutica atual da LMC (DAUB, DRUKER, NARDI, 2004).

As quimiocinas e seus receptores são uma família de pequenas citocinas pró-inflamatórias que regulam as respostas imunes desde a infecção, inflamação até o reparo tecidual. São responsáveis também por controlar o tráfego de células do sistema imunológico durante o seu desenvolvimento. Essas moléculas em particular têm chamado a atenção por atuarem de forma similar tanto na migração do tráfego leucocitário como também na migração e metástase das células neoplásicas em diversos tipos de câncer (LUKER, 2006; KOIZUMI, 2007; GOLAY, 2008).

A quimiocina CXCL12 conhecida como fator-1 derivado de células do estroma (SDF-1), e é expressa constitutivamente em vários órgãos que foi primeiramente clonada a partir de uma linhagem de células derivadas do estroma da medula óssea, e mais tarde identificada como fator estimulador do crescimento de células pré-B (TASHIRO, 1993; NAGASAWA, 1996; MULLER, 2001).

O CXCL12 é produzidopelas células do estroma da medula, células endoteliais, coração, músculo esquelético, fígado, cérebro e células renais parenquimatosas; todavia é produzida principalmente por osteoblastos, fibroblastos e células endoteliais da medula óssea (NAGASAWA, 1996; ASKARI *et al.*, 2003).

Atua regulando o tráfego de leucócitos e de muitos processos biológicos essenciais, incluindo o desenvolvimento neuronal e cardíaco, motilidade de células troncos, neovascularização, e tumorigênese (MA, 1998; LANE, 2000; HATTORI, 2001; BARBIERI, 2006; PETIT, 2007).

O sequenciamento da quimiocina CXCL12 (SDF1), (GenBank: L36033), revelou um polimorfismo no segmento evolucionário conservado da região 3' não traduzida (3'UTR), (posição 801 G → A) do gene estrutural transcrito. Este polimorfismo, designado

rs1801157 (CXCL12-A/SDF1-3'A), pode ter funções regulatórias importantes, resultantes do aumento na concentração de CXCL12 (WINKLER *et al*, 1998).

O polimorfismo CXCL12-A tem sido associado com mobilização de progenitores CD34⁺ no sangue periférico (BENBOUBKER, 2001), o que pode sugerir um papel importante na liberação de células progenitores da medula para a circulação, em condições normais ou patológicas.

O CXCR4 é o principal receptor conhecido para CXCL12. A ligação desta quimiocina com seu receptor exibe efeito quimiotático para leucócitos *in vitro*, e possui uma alta capacidade quimioatraente *in vivo* (RAZMKHAH *et al*, 2005).

Estudos identificaram uma proporção crescente de moléculas quimioatraentes capazes de permitir a migração *in vitro* de células linfóides malignas (LEGDEUR, 1997; MOHLE, 1998; BURGER, 1999), como por exemplo, na leucemia linfóide crônica, onde as células expressam CXCR4 e podem ser atraídas pelo gradiente da quimiocina SDF-1 (BURGER, 1999; MOHLE, 1999; NISHII, 1999; BRADSTOCK, 2000; MOHLE, 2000). Em adição, o CXCR4 é altamente expresso em células de linfoma, bem como em linhagens mielóides (BURGER & KIPPS, 2002).

O CXCL12 e seu receptor CXCR4 apresentam papel importante no crescimento tumoral, angiogênese e metástase de diferentes tipos de tumores, devido ao CXCL12 ser variavelmente expresso em células normais e tecidos cancerígenos (RAZMKHAH, 2005; DIMBERG, 2007). Portanto, o presente trabalho investigou a relação do polimorfismo rs1801157 CXCL12 na expressão de CXCL12 e CXCR4 em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica comparando com indivíduos saudáveis.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Consentimento Livre e Esclarecido

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, estando de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, CAAE No. 0164.0.268.000-09, Folha de Rosto No. 289083. Todos participantes assinaram antes o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por escrito.

3.2.2 População Estudada

Foram coletados sangue periférico de 44 pacientes diagnosticados com LMC do Hospital do Câncer de Londrina (HCL) e 42 doadores de sangue saudáveis do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina-PR, Brasil.

Os pacientes com Leucemia Mielóide Crônica foram provenientes do Instituto do Câncer de Londrina e seus diagnósticos seguiram os protocolos utilizados pelo hospital, baseando-se em colorações citoquímicas, imuno-histoquímica e imunofenotipagem.

As amostras consistiram em 5 mL de sangue periférico coletadas a vácuo, por aspiração mecânica automática (*vacutainer*), com agulhas e tubos descartáveis estéreis contendo o anticoagulante EDTA.

3.2.3 Extração do DNA

O DNA genômico foi obtido das amostras de sangue periférico dos indivíduos em estudo. A técnica foi baseada no rompimento enzimático de membranas celulares, eliminação de proteínas e ácidos graxos por ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol absoluto (MILLER *et al*, 1988).

Os DNAs, já secos, foram ressuspensos em 50 µL de Água Ultra Pura *Milli-Q* autoclavada. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria *Shimadzu* a 260 nm e em seguida armazenadas a -20°C . A integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% a 80 V.

3.2.4 Análise Molecular

3.2.4.1 Análise do polimorfismo CXCL12 rs1801157

A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 25 µL com as seguintes condições iniciais: 100ng de DNA dos pacientes, Buffer 10X (INVITROGEN *Life Technologies* – Brasil), dNTP 1,25 mM (Amershan Pharmacia Biotech Incorporation, USA), Primer Sense 2,5 µM (5' CAG TCA ACC TGG GCA AAG CC 3') Primer Anti-Sense 2,5 µM (5' CCT GAG AGT CCT TTT GCG GG 3') (*GenBank* L36033), $-\text{MgCl}_2$ 50 mM

(INVITROGEN *Life Technologies* – Brasil) e 1,25 U de Taq Polimerase (INVITROGEN *Life Technologies* – Brasil).

Os ciclos da reação no termociclador *MasterCycler Gradient eppendorf* seguiram 4 estágios respectivamente: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 1 ciclo de 72°C por 10 minutos, e 1 ciclo de final de 10°C por até 10 horas para manutenção.

Todas as reações foram efetuadas com um controle positivo (amostra conhecida e testada para ampliações) e um controle negativo (ausência de DNA) a fim de assegurar a não contaminação dos produtos de PCR. Os fragmentos originados da PCR foram de 293 bp, visualizados em gel de poliacrilamida 10% corados com nitrato de prata.

A digestão enzimática foi realizada nos produtos de PCR para o CXCL12 com a enzima *Msp-I* (Promega Corporation, Madison, USA).

A troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 801, contada a partir do códon de iniciação, elimina o sítio de restrição da enzima *Msp-I* (WINKLER *et al*, 1998). Caso não haja tal mutação no fragmento amplificado, a enzima reconhece o local de clivagem gerando dois segmentos, um de 100 bp e outro de 193 bp.

A reação de digestão foi realizada em um volume total de 10,0 µL de produto de PCR com a enzima *MspI* (Promega, Madison, WI, USA) por 3h a 37°C. Os produtos da reação de digestão enzimática foram analisados em gel de poliacrilamida 10% submetido à coloração por Nitrato de Prata (AgNO₃).

3.2.4.2 Extração de RNA e síntese de DNAc

O RNA total de leucócitos foi extraído com Trizol (Trizol LS; Invitrogen™, Carlsbad, California, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi mantido em água estéril tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Invitrogen™). A síntese de cDNA foi realizada utilizando 500ng de RNA, primer oligo dT (2,5µM), 20 U de transcriptase reversa (MLV-M; Moloney vírus da leucemia murina; Invitrogen™) e 4 U de inibidor da ribonuclease recombinante (RNase-Out™, Invitrogen™) a 42 ° C por 60 min (pH 50 mM Tris-HCl 8,3, 75 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 mM de dNTP) em um PCR Hybaid Sprint Termociclador (Biosystems, Guelph, Ontário, Canadá). A quantificação de DNA e RNA foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm e 280nm.

3.2.4.3 Validação da transcrição: reação em cadeia da polimerase –bactina

Para avaliar a integridade e a viabilidade das amostras de RNA foi realizado a reação em cadeia da polimerase para o gene da β actina. Os *primers* utilizados para a amplificação foram obtidos de acordo com o *GenBank Accession number*: BC014861. A reação de PCR para β actina foi submetida ao termociclador (*PCR Sprint ThermoHybaid, Biosystems*) utilizando-se: 20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP e 0.5U de *Taq polimerase*. Inicialmente, uma etapa de desnaturação foi constituída por um minuto à 94 °C, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, com extensão final de 10 minutos a 72 °C. O fragmento amplificado de β actina de 353 pares de bases foi analisado após eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, por 1 ½ hora, com coloração por nitrato de prata.

3.2.4.4 Expressão quantitativa dos genes CXCL12 e CXCR4

A reação de PCR em tempo real foi realizada no sistema de detecção *Chromo4™ Real Time PCR Detection* (BIO-RAD, Hercules, USA), utilizando-se o kit *Platinum® SYBR Green qPCR SuperMix UDG* (Invitrogen™, USA). A amplificação foi efetuada em condições específicas do kit *Platinum® SYBR Green qPCR SuperMix UDG* (Invitrogen™) usando 0.25 η M de cada par de primers específicos para o gene a ser avaliado.

Os *primers* utilizados para a amplificação do RNAm dos genes GAPDH, CXCL12 e CXCR4 foram obtidos a partir da sequência depositada no GenBank, de acordo com a sequência e o número de acesso da Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência de Primers

Gene	GenBank	Primer	Sequencia
CXCL12	NM_199168	<i>Sense</i>	5' TTA CCC GCA AAA GAC AAG T 3'
		<i>AntiSense</i>	5'AGG CAA TCA CAA AAC CCA GT 3'
CXCR4	AF025375	<i>Sense</i>	5'TGT TGG CTG AAA AGG TGG TC 3'
		<i>Antisense</i>	5' AAA GAT GAA GTC GGG AAT AGT C 3'
GAPDH	NM_002046	<i>Sense</i>	5'GAA GGT GAA GGT CGG A 3'
		<i>Antisense</i>	5'GGG TCA TTG ATG GCA AC 3'

A expressão gênica (GAPDH, CXCL12 e CXCR4) de cada amostra foi calculada considerando os valores de CT (*Cycle Threshold*) e eficiências segundo Pfaffl (2001):

Todos os valores de expressão foram obtidos através da média da triplicata dos valores de CT e eficiência de cada gene (CXCL12 / CXCR4 / GAPDH) para cada um dos indivíduos (22 pacientes com LMC e 54 Indivíduos Saudáveis). Foram comparadas as expressões considerando-se o diagnóstico (LMC ou Saudáveis) e o polimorfismo CXCL12 rs1801157-alelo A.

Para as análises individuais de expressões relativas dos pacientes com LMC, foram consideradas as médias dos valores de CT e eficiências dos indivíduos saudáveis.

3.2.5 Análise Estatística

Para análise demográfica e análise das frequências do alelo mutado foi utilizado o Teste de χ^2 (Qui-Quadrado), Teste *t-Student* e *Odds Ratio*. A análise de expressão de genes foi realizado pelo Software Relative Expression in Real Time (REST) 2009, seguida dos testes de *Correlação de Spearman* Teste *t-Student amostras pareadas*, *Kruskal-Wallis*, *ANOVA e Tukey*. As análises descritivas foram executadas através do Software SPSS Statistics 17.0 (2007) e também pelo Software Relative Expression in Real Time (REST) 2009.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Gênero, Idade e Etnia

O Perfil Etário das pacientes com leucemia mielóide crônica e doadores saudáveis do Hospital de Clínicas envolvidos neste estudo variou de 29 a 84 anos, sendo que houve uma predominância no intervalo de 41-60 nos doadores saudáveis e, uma predominância na faixa dos 31-40 anos nos paciente com LMC.

Houve uma discreta predominância de mulheres em ambos os grupos analisados. No presente estudo, o grupo controle (indivíduos saudáveis) apresentou 40,48% de homens e 59,52% de mulheres, e o grupo LMC apresentou 40,91% de homens e 59,09% de mulheres.

Em relação à etnia, houve uma prevalência em ambos os grupos da etnia caucasóide. A população controle apresentou 73,9% de caucasóide, 21,8% negra e 4,3% amarela. Já na população com LMC apresentou 71,4% caucasóide, 14,3% negra e 14,3% parda.

3.3.2 Análise Genotípica para o CXCL12

O polimorfismo genético CXCL12 rs1801157 alelo A foi avaliado pela amplificação de fragmento específico do gene CXCL12 e posterior digestão enzimática dos fragmentos amplificados pelas enzimas *Msp* I (Promega Corporation, Madison, USA). Os produtos de PCR-CXCL12 (293pb) foram submetidos à digestão enzimática, para caracterização genotípica dos indivíduos.

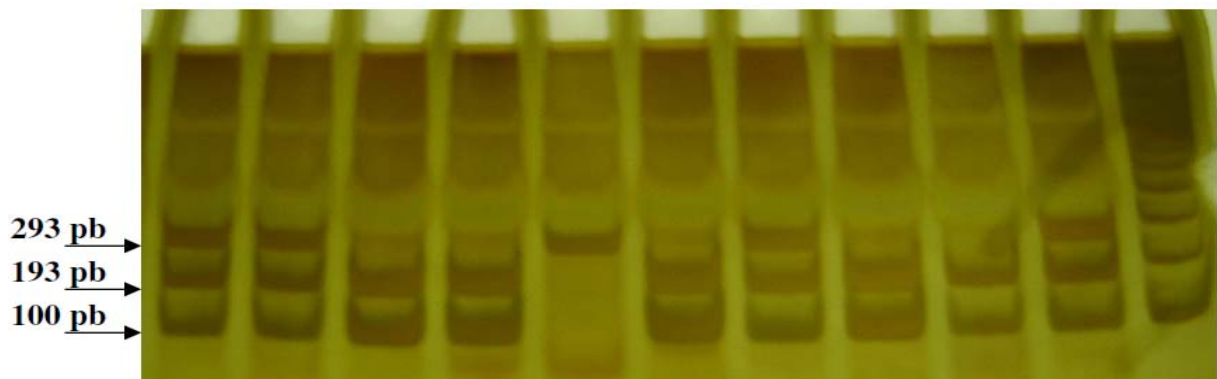


Figura 1 – Perfil eletroforético do produto de digestão enzimática. Gel de Poliacrilamida 12 10% corado com nitrato de prata pós digestão enzimática com a enzima *Msp*-I. 11-Ladder (100BP); 10-13 Controle Positivo; 5-Genótipo A/A (homozigoto para a mutação); 3,4,6,8,9-Genótipo G/G (homozigoto 14 sem a mutação); 1,2,7-Genótipo G/A (heterozigoto para a mutação).

Os indivíduos normais apresentaram uma distribuição genotípica de G/G 69% (29/42), G/A 31% (13/42), e nenhum com genótipo A/A, enquanto os pacientes apresentaram distribuição de G/G 61,30% (27/44), G/A 33,40% (16/44) e A/A 2,3% (1/44)

Ambos os grupos, LMC (n=44) e Controle (n=42), encontraram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O grupo Controle com valor de $\chi^2 = 0,8452$ e o grupo de pacientes com LMC com valor de $\chi^2 = 0,7954$.

A análise estatística não foi considerada significativa, visto que o valor do Teste de χ^2 (Qui-Quadrado) para genótipos foi de 1,33 (< 5,99) e o Teste de χ^2 (Qui-Quadrado) para portadores foi de 0,55 (< 3,84), com grau de liberdade igual a 2.

Além disso, não houve constatação de risco relativo para os diferentes genótipos de CXCL12 pelo cálculo de ODDS Ratio (0,71 com IC95% de 0,29 a 1,74) nos pacientes com leucemia mielóide crônica analisados frente aos indivíduos saudáveis.

3.3.3 Análise da Expressão dos Genes CXCL12 e CXCR4

Inicialmente, a integridade das amostras foi analisada através da amplificação do RNAm β actina. Fragmento de 353pb foi detectado, demonstrando que o RNA estava íntegro e livre de contaminação por DNA.

Os resultados obtidos foram representados pela expressão relativa, razão entre a detecção do gene investigado pelo gene constitutivo (Pfaffl, 2001).

Considerando todos os indivíduos analisados encontramos uma expressão de CXCR4 aproximadamente duas vezes maior (1,946) nos pacientes com LMC em relação aos indivíduos saudáveis ($p = 0,009$) pelo teste t de Student de amostras pareadas (Figura 2).

Todavia, não encontramos alteração significativa na expressão de CXCL12 na comparação entre os grupos, sendo que o CXCL12 apresentou-se 1,083 maior na população com LMC ($p = 0,702$) pelo teste t de Student de amostras pareadas.

Não houve associação entre a expressão da quimiocina CXCL12 com seu receptor CXCR4 pelo teste de correlação de Spearman, ($p = 0,621$), como demonstra a Figura 2.

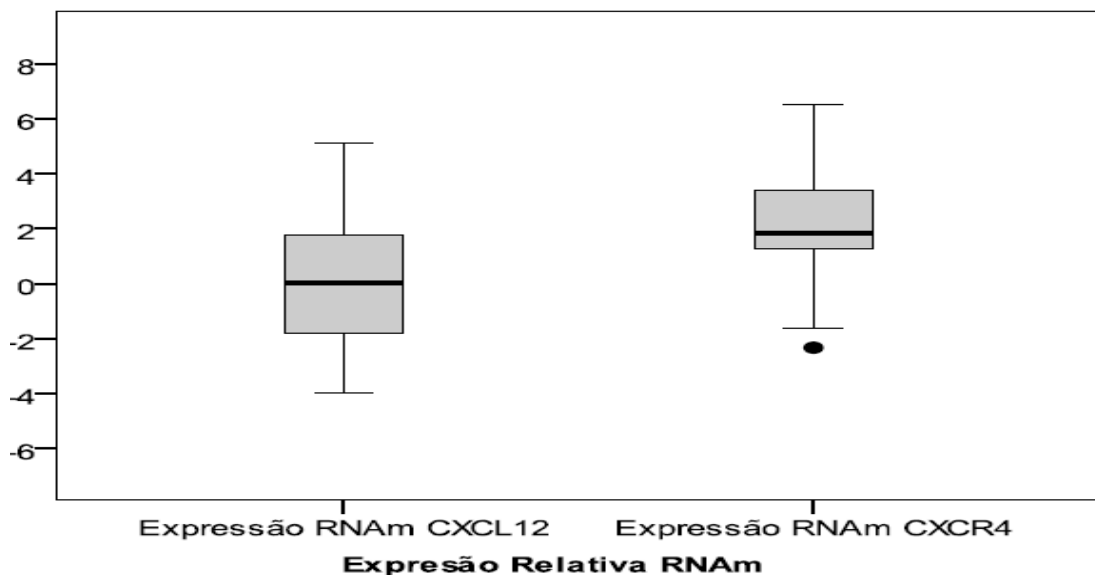


Figura 2 – Expressão gênica do RNAm CXCL12 e CXCR4 dos pacientes com LMC em relação aos Indivíduos Saudáveis. Expressão diferencial de CXCL12 ($p = 0,702$) e de CXCR4 ($p = 0,009$) entre pacientes com LMC e indivíduos saudáveis pelo teste t de Student amostras pareadas e associação entre a expressão da quimiocina CXCL12 com seu receptor CXCR4 foi realizado o teste de correlação de Spearman, não houve correlação estatisticamente significativa ($p = 0,621$).

Já a análise por genótipos para o polimorfismo CXCL12 rs1801157 não houve diferença estatisticamente significativa de expressão de ambos os genes CXCL12 ($p = 0,883$) e CXCR4 ($p = 0,994$) pelo teste de Anova para os pacientes com LMC comparados a média dos indivíduos saudáveis (Figura 3).

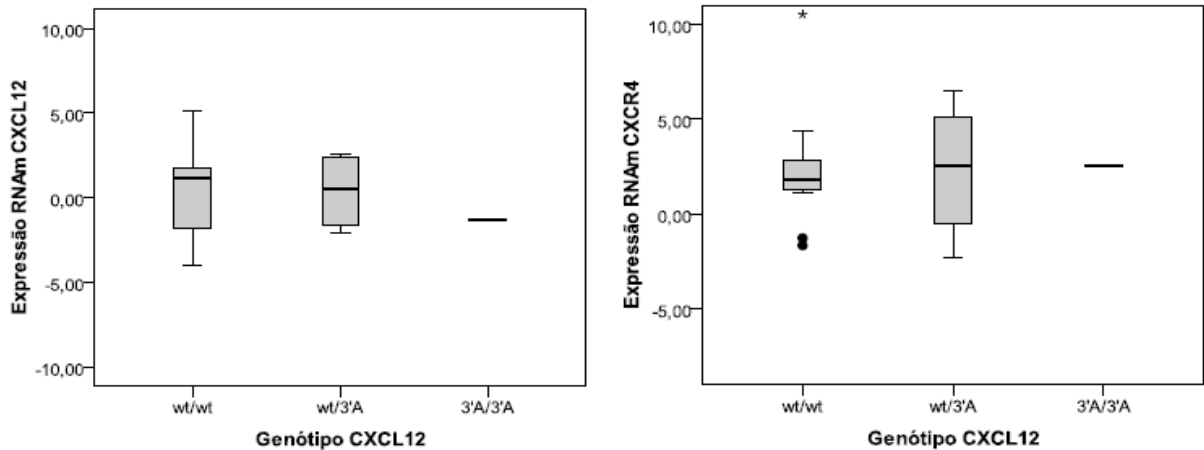


Figura 3 – Análise dos genótipos CXCL12 por RFLP e expressão relativa de CXCR4 e CXCL12. Expressão gênica do CXCL12 e CXCR4 em relação ao polimorfismo CXCL12 rs1801157 ($p = 0,883$ para CXCL12 e $p = 0,994$ para CXCR4), pelo teste de Anova.

3.4 DISCUSSÃO

Com uma incidência anual de aproximadamente 10 em cada 1.000.000 de pessoas no mundo, a leucemia mielóide crônica caracteriza-se como um dos casos mais comuns de desordem mieloproliferativa, e representa quase 20% de todas as leucemias, acometendo principalmente indivíduos acima da faixa de 40 anos (WARMUTH *et al.*, 1999).

Na LMC o prognóstico desfavorável em relação à idade avançada já foi bem estabelecido (HERNADEZ-BOLUDA *et al.*, 1999; KANTARJIAN *et al.*, 1985; SOKAL *et al.*, 1984), sendo que a média de idade entre os pacientes com leucemia mielóide crônica é de 50 anos.

Nenhuma diferença étnica ou geográfica existe com relação à incidência da LMC, porém, diferenças nas estratégias terapêuticas entre os países se dão devido à disponibilidade aos medicamentos de custo elevado e avanços nas tecnologias de diagnóstico (DOLL & SMITH, 1968; D'ANTONIO, 2005; HEHLMANN, *et al.*, 2007).

O CXCL12 foi inicialmente descrito como um fator derivado de células do estroma da medula óssea, e um fator pré-estimulador de células B (NAGASAWA *et al.*, 1996), e atualmente é denominado de CXCL12. É um potente quimioatraente para vários

tipos celulares, os quais apresentam o receptor CXCR4 acoplado a proteína G em sua superfície (GERLI *et al.*, 2005). O CXCR4 é altamente expresso em células de linfoma de células B, bem como em blastos da linhagem mielóide (MOHLE *et al.*, 1998).

Winkler *et al* (1998) identificaram um polimorfismo comum, denominado SDF1-3'A (CXCL12 rs1801157-alelo A), em um segmento evolucionariamente conservado região 3' não traduzível do gene estrutural CXCL12. O polimorfismo ocorre na posição 801 contada a partir do códon de iniciação ATG. A transição de uma guanina para adenina (G → A) elimina o sítio de restrição da enzima *Msp* I e *Hpa* II, permitindo a análise pelo polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) após PCR, e a rápida detecção dos genótipos.

As regiões 3' não codificadoras (UTR) de RNAs mensageiros para muitos genes têm sido identificadas como regiões regulatórias importantes do transcrito de RNA por si só, bem como do produto originado (THEKKUMKARA & LINAS, 2003). Na maioria dos casos, os mecanismos de controle e tradução resultam da interação entre proteína – RNA com as regiões 5' ou 3'UTR. Um exemplo é a proteína quinase PKR, ativada por regiões 3'UTR do RNA, a qual pode gerar diversos efeitos, inclusive anti-tumorais (DAVIS & WATSON, 1996; OSMAN *et al.*, 1999; BEN-ASOULI *et al.*, 2002; NUSSBAUM *et al.*, 2002). Em diversas análises com organismos vertebrados, demonstrou-se que a região 3'UTR é mais longa que sua análoga 5'UTR, indicando um significativo potencial regulatório. Além disso, a própria variação na extensão da região 3'UTR tem aumentado durante os processos evolutivos, sugerindo um papel maior na complexidade das espécies (MAZUMDER *et al.*, 2003).

Estudos sugerem que o polimorfismo CXCL12 rs1801157-alelo A atue aumentando a quantidade de proteína CXCL12 disponível para ligar-se ao CXCR4. Vários estudos têm avaliado a frequência genotípica em diferentes populações e diferentes condições patológicas, com o objetivo de se observar as possíveis implicações deste polimorfismo na susceptibilidade a doenças e nos padrões de desenvolvimento de certas condições (BALTER, 1998; BENBOUBKER *et al.*, 2001; GODDARD *et al.*, 2001; STEINERT *et al.*, 2001; SWEENEY & PAPAYANNOPOULOU, 2001; COLVIN & THOMSOM, 2002; SCHROPPEL, 2002).

Segundo Winkler *et al* (1998) é conhecido que o alelo mutado denominado de 3'A está relacionado com aumento nos níveis de transcrição de CXCL12 no sistema HIV. Além disso, o polimorfismo CXCL12 rs1801157-alelo A tem sido associado com a alta

mobilização de progenitores CD34⁺ no sangue periférico (BENBOUBKER, 2001), o que pode sugerir um papel importante na liberação de células progenitoras da medula para a circulação, em condições normais ou patológicas.

Cavassin *et al* (2004) observaram o polimorfismo genético da quimiocina CXCL12 em pacientes com linfoma e leucemia linfóide. A porcentagem de portadores do alelo 3'A nos pacientes com linfoma foi significativamente maior que os pacientes com leucemia linfóide, sugerindo um papel no comportamento clínico e biológico dos linfomas e leucemias linfóides.

Foi observado em pacientes com leucemia mieloide aguda, com infiltração extra-medular, uma alta expressão de CXCL12 sérico e CXCR4 em células mononucleares da medula óssea, sugerindo que, de alguma forma, esta expressão relacione-se com o processo patogênico e com as características da infiltração (ZENG *et al.*, 2005).

Rosti *et al* (2007) estudaram a expressão do receptor de quimiocina CXCR4 em células CD34⁺ circulantes de pacientes com metaplasia mieloide com mielofibrose (MMM), e analisou sua relação com a gravidade da doença. Rosti relatou uma diminuição na expressão de CXCR4 em pacientes com MMM em comparação a pacientes com Policitemia Vera e indivíduos saudáveis. Além disso, verificou que os menores níveis de expressão de CXCR4 ocorreu em pacientes com a forma avançada da doença, salientando a importância desse receptor na patogênese da MMM.

No presente estudo, a frequência do polimorfismo CXCL12 rs1801157-alelo A entre indivíduos saudáveis e pacientes com LMC foi de 0,1547 e 0,2045, respectivamente. A ocorrência do alelo 3'A nos indivíduos normais não diferiu dos estudos publicados, contudo, apesar da presença do polimorfismo nos pacientes com LMC ser consideravelmente maior, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

No presente trabalho foi verificado que não houve associação da mutação CXCL12 rs1801157-alelo A nos níveis de transcritos para os genes da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4. Nessa análise os indivíduos foram estratificados segundo seus genótipos para CXCL12, no qual os pacientes com genótipos selvagem foram comparados aos portadores, heterozigotos e homozigotos para o polimorfismo CXCL12 rs1801157-alelo A.

Além disso, embora não tenha sido verificada diferença estatística na expressão tanto de CXCL12 quanto de CXCR4 em relação ao polimorfismo CXCL12 rs1801157-alelo A, detectamos uma maior expressão de CXCR4 (1,946) nos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica ($p = 0,009$) em comparação aos indivíduos saudáveis (normais).

Peled *et al* (2002) demonstraram que células CD34⁺ Filadélfia positivas de pacientes com LMC, expressando o receptor CXCR4, migram em resposta ao fator derivado do estroma da medula óssea (CXCL12). Contudo, células CD34⁺ CXCR4⁺ mas Filadélfia negativas (normais) do mesmo paciente demonstravam maiores taxas de migração através do SDF-1(CXCL12), indicando um papel funcional mediado pelo CXCL12 na retenção de células imaturas CD34⁺ e células progenitoras na medula óssea de indivíduos saudáveis e de pacientes com LMC.

Jin *et al.* (2008) demonstraram que o aumento da expressão de CXCR4 devido ao tratamento com Mesilato de Imatinibe (Gleevec) induz a migração das células leucêmicas ao estroma medular, o que promove a sobrevivência dessas células quiescentes da LMC.

Vianello *et al.* (2010) relataram que o mecanismo de sobrevivência da células leucêmicas na LMC mediado pela células mesenquimais do estroma medular está relacionado a proteção da apoptose induzida pelo imatinibe, através da ativação do eixo CXCL12/CXCR4. Além disso, demonstraram também que o bloqueio do eixo CXCL12/CXCR4 restaura, em parte, a sensibilidade das células leucêmicas ao imatinibe.

Dentre os diversos estudos realizados, as quimiocinas (em especial o eixo CXCL12 / CXCR4) demonstram importante relação com as leucemias e outros tipos de cânceres. Futuramente, com uma melhor compreensão dos mecanismos da patogênese da leucemia mielóide crônica, novos alvos de terapia poderão ser promissores.

Referências

- ASKARI AT, UNZEK S, POPOVIC ZB, GOLDMAN CK, FORUDI F, KIEDROWSKI M, ROYNER A, ELLIS SG, THOMAS JD, DICORLETO PE, TOPOL EJ, PENN MS. Effect of stromal cell derived factor-1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;362:697–703.
- BALTER, M. Chemokine mutation slows progression in pathogenesis by SDF-1 chemokine gene variant. *Science*, 1998; 118:681-8.
- BARBIERI F, BAJETTO A, PORCILE C, PATTAROZZI A, MASSA A, LUNARDI G, ZONA G, DORCARATTO A, RAVETTI JL, SPAZIANTE R, SCHENTTINI G, FLORIO T. CXC receptor and chemokine expression in human meningioma: SDF1/CXCR4 signaling activates ERK1/2 and stimulates meningioma cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1090:332–343.
- BEN-ASOULI Y, BANAI Y, PEL-OR Y, SHIR A, KAEMPFER R. Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. *Cell*, 2002; 108(2):221-32.
- BENBOUBKER L, WATIER H, CARION A, GEORGET MT, DESBOSIS I, COLOMBAT P, BARDOS P, BINET C, DOMENECH J. Association between the SDF1-3'A allele and high levels of CD34+ progenitor cells mobilized into peripheral blood in humans. **Br. J. Haematol.**, 113: 247-50, 2001.
- BRADSTOCK KF, MAKRYNIKOLA V, BIANCHI A, SHEN W, HEWSON J, GOTTLIEB DJ. Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers. **Leukemia**, v. 14, p. 882–888, 2000.
- BURGER JA, BURGER M & KIPPS TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. **Blood**, v. 94, p. 3658-3667, 1999.
- BURGER JA, KIPPS TJ. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. **Leukemia and Lymphoma**, v. 43, p.461-466, 2002.
- CAVASSIN GGO, DE LUCCA FL, ANDRÉ ND, COVAS DT, FUNGARO MHP, VOLTARELLI JC, WATANABE MAE. Molecular investigation of the stromal cell-derived factor-1 chemokine in lymphoid leukemia and lymphoma patients from Brazil. *Blood Cells Mol. Dis.*, 33: 90-93, 2004.
- COLVIN BL, THOMSON A. Chemokines, their receptors, and transplant outcome. *Transplantation*, v.74, p.149-155, 2002.
- DAUB H, SPECHT K, ULLRICH A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3: 1001–10.
- DAVIS S, WATSON JC. In vitro activation of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by RNA from the 3'untranslated regions of human alpha-tropomyosin. *Pro Nati Aca Sci USA*, 1996; 93(1): 508-13.

D'ANTONIO J. Chronic myelogenous leukemia. *Clin. J. Oncol. Nurs.*, Pittsburgh, v. 9, p. 672, Dec. 2005.

DIMBERG J, HUGANDER A, LOFGREN S, WASTERTEDER D. Polymorphism and circulating levels of the chemokine CXCL12 in colorectal cancer patients. *Int J Mol Med* 2007;19:11–15.

DOLL R, SMITH PG. The long term effects of x-radiation in patients treated for metastatic haemorrhagic. *Br. J. Radiol.*, London, v. 41, p. 362-368, May 1968.

DRUKER BJ. Overcoming resistance to imatinib by combining targeted agents. *Mol Cancer Ther*, 2003. 2: 225–6.

DRUKER BJ. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv Cancer Res*, 2004. 91: 1–30.

FERNANDEZ-LUNA J L. BCR/ABL and inhibition of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Apoptosis*, 2000.

GAMBACORTI-PASSERINI CB, GUNBY RH, PIAZZA R, GALIETTA A, ROSTAGNO R, ET AL. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol*, 2003. 4: 75–85.

GERLI G, VANELLI C, TURRI O, ENARIO M, GARDELLINI A, PUGLIANO M, BIONDI ML. SDF1-3'A Gene Polymorphism Is Associated with Chronic Myeloproliferative Disease and Thrombotic Events. *Clin Chem*, 51 (12): 2411-4. 2005.

GODDARD S, WILLIAMS A, MORLAND C, QIN S, GLADUE R, HUBSCHER S, ADAMS DH. Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. *Transplantation*, v. 72, p. 1957-1967, 2001.

GOLAY J, INTRONA M. Chemokines and antagonists in non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Ther Targets*, 2008. 12:621–635.

HATTORI K, HEISSIG B, TASHIRO K, HONIO T, TATENO M, SHIEH JH, HACKETT NR, QUITORIANO MS, CRYSTAL RG, RAFII S, MOORE MA. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001; 97: 3354–3360.

HEHLMANN R, HOCHHAUS A, BACCARANI M. European Leukemia Net. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007.

HERNÁNDEZ-BOLUDA J C, CERVANTES F, CAMÓS M, COSTA D, RAFEL M, MONTSERRAT E. Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in the elderly: presenting features, natural history and survival. **Med Clin (Barc)**. 1999 May 1;112(15):565-7.

JABBOUR E, CORTE JE, KANTARJIAN HM. Suboptimal Response to or Failure of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia: What Is the Optimal Strategy? *Mayo Clin Proc*. February 2009.

JIN L, TABE Y, KONOPLEV S, XU Y, LEYSATH CE, LU H, KIMURA S, OHSAKA A, RIOS MB, CALVERT L, KANTAJARIAN H, ANDREEFF M, KONOPLEVA M. CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7(1). January 2008.

KANTARJIAN HM, SMITH TL, MCCREDIE KB, KEATIN MJ, WALTERS RS, TALPAZ M, HESTER JP, BLYGHAM G, GEHAN E, AND FREIREICH EJ. Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. **Blood**, 1985; 66(6): 1326-35.

KOIZUMI K, HOJO S, AKASHI T, YASUMOTO K, SAIKI I. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci*, 2007. 98:1652–1658.

LANE WJ, DIAS S, HATTORI K, HEISSIG B, CHOY M, RABBANY SY, MADEIRA J, MOORE MA, RAFII S. Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. *Blood* 2000; 96:4152–4159.

LEGDEUR MC, BEELEN RH, SCHUURHUIS GJ, BROEKHOVEN MG, VAN DE LOOSDRECHT AA, TEKSTRA J, LANGENHUIJSEN MM & OSSENKOPPELE GJ. A functional study on the migration of human monocytes to human leukemic cell lines and the role of monocyte chemoattractant protein-1. *Leukemia*, v.11, p. 1904–1908, 1997.

LUKER KE, LUKER GD. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett*, 2006. 238:30–41.

MA Q, JONES D, BORGHESANI PR, SEGAL RA, NAGASAWA T, KISHIMOTO T, BRONSON RT, SPRINGER TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4-and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:9448–9453.

MAZUMDER B, SESHADRI V, FOX PL. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem. Sci.*, 28: 91-98, 2003.

MILLER, S.A.; DKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid Res.* 16:115. 1988.

MÖHLE R, BAUTZ F, RAFII S, MOORE MAS, BRUGGER W & KANZ L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34⁺ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. **Blood**, v. 91, p. 4523-4530, 1998.

MÖHLE R, FAILENSCHMID C, BAUTZ F, KANZ L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1. **Leukemia**, 13: 1954– 1959, 1999.

MÖHLE R, SCHITTENHELM M, FAILENSCHMID, C, BAUTZ F, KRATZ-ALBERS K, SERVE H, BRUGGER W, KANZ L. Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. **Br. J. Haematol.**, 110: 563–572, 2000.

MULLER A, HOMEY B, SOTO H, NIANFENG GE, CATRON D, BUCHANAN ME, MCCLANAHAN T, MURPHY E, WEI Y, STEPHAN WN, BARRERA JL, MOHAR A, VERÁSTEGUI E, ZLOTNIK A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410:50–56.

NAGASAWA T, HIROTA S, TACHIBANA K, *ET AL*. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996; 382:635–638.

NARDI V, AZAM M, DALEY GQ. Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR/ABL. *Curr Opin Hematol*, 2004. 11: 35–43.

NISHII K, KATAYAMA N, MIWA H, SHIKAMI M, MASUYA M, SHIKU H & KITA K. Survival of human leukaemic B-cell precursors is supported by stromal cells and cytokines: association with the expression of bcl-2 protein. *British Journal of Haematology*, v. 105, p. 701–710, 1999.

NUSSBAUM JM, GUNNERY S, MATHEWS MB. The 3'-untranslated regions of cytoskeletal muscle mRNAs inhibit translation by activating the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Nucleic Acids Res.*, 30: 1205-12, 2002.

OSMAN F, JARROUS N, BEM-ASOULI Y, KAEMPFER R. A cis-acting element in the 3'-untranslated region of human TNF-alpha mRNA renders splicing dependent on the activation of protein kinase PKR. *Gene develop*, 1999; 13(24):3280-93.

PELED A, HARDAN I, TRAKHTENBROT L, GUR E, MAGID M, DARASH-YAHANA M, COHEN N, GRABVSKY V, FRANITZA S, KOLLET O, LIDER O, ALON R, RECHAVI G. LAPIDOT. Immature leukemic CD34+CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. *Stem Cells*, 2002; 259-66.

PERROTTI D, JAMIESON C, GOLDMAN J, SKORSKI T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest*. 2010.

PETIT I, JIN D, RAFII S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: A molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* 2007;28:299–307.

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, N^o 9, 2001.

RAZMKHAH M, TALEI AR, DOROUDCHI M, KHALILI-AZAD T, GHADERI A. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) alleles and susceptibility to breast carcinoma. *Cancer Lett.*, 225: 261-266, 2005.

ROSTI V, MASSA M, VANNUCCHI AM, BERGAMASCHI G, CAMPANELLI R, PECCI A, VIARENGO G, MELI V, MARCHETTI M, GUGLIELMELLI P, BRUNO E, XU M, HOFFMAN R, BAROSI G. The expression of CXCR4 is down-regulated on the CD34+ cells of patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood Cells Mol Dis*. 2007 May-Jun;38(3):280-6. Epub 2007 Mar 9.

SCHROPPEL B, FISCHEREDER M, ASHKAR R, LIN M, KRAMER BK, MARDERA B, SCHIANO T, MURPHY B. The impact of polymorphisms in chemokine and chemokine receptors on outcomes in liver transplantation. *Ame. J. Transplant.*, 2: 640-645, 2002.

SHANNON KM. Resistance in the land of molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2002. 2: 99-102.

SOKAL JE, COX EB, BACCARANI M, TURA S, GOMEZ, GA, ROBERTSON, JE, TSO CY, BRAUN TJ, CLARKSON BD, CERVANTES F. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood**, 1984; 63: 789-99.

STEINERT AUST G, KIESSLING M, KAMPRAD M, SIMCHEN C. Reduced expression of Stromal-Derived Factor 1 in Autonomous Thyroid Adenomas and Its Regulation in Thyroid-Derived Cells. *The Journal do Endocrinology & Metabolism.*, vol 86 (7), p. 3368-3376, 2001.

SWEENEY EA, PAPAYANNOPOULOU T. Increase in circulating SDF-1 after treatment with sulfated glycans. The role of SDF-1 in mobilization. *Ann N Y Scad Sci*. 2001 Jun; 938:48-52; discussion 52-3.

TABAK DG. Transplante de medula óssea em leucemia mielóide crônica. *Medicina, Ribeirão Preto*, 33: 232-240, jul./set. 2000.

TASHIRO K, TADA H, HEILKER R, SHIROZU M, NAKANO T, HONJO T. Signal sequence trap: A cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 1993; 261:600-603.

THEKKUMKARA TJ, LINAS SL. Evidence for involvement of 3'-untranslated region in determining angiotensin II receptor coupling specificity to G-protein. *Biochem J.*; 370:631-639, 2003.

VIANELLO F, VILLANOVA F, TISATO V, LYMPERI S, HO KK, GOMES AR, MARIN D, BONNET D, APPERLY J, LAM EWF, DAZZI F. Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica* 2010; 95(7). 1

WARMUTH M, DANHAUSER-RIEDL S, AND HALLEK M. *Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies*. *Ann Hematol*, 1999; 78: 49-64.

WINKLER C, MODI W, SMITH MW, NELSON GW, WU X, CARRINGTON M, DEAN M, HONJO T, TASHIRO K, YABE D, BUCHBINDER S, VITTINGHOFF E, GOEDERT JJ, O'BRIEN TR, JACOBSON LP, DETELS R, DONFIELD S, WILLOUGHBY A, GOMPERS E, VLAHOV D, PHAIR J, O'BRIEN SJ. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science*, 279: 389-393, 1998.

ZENG D F, KONG, PY CHENG XH, WEI L, CHANG C, AND PENG XG. The expression and clinical significance of stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 in acute leukemia and malignant lymphoma. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2005; 44(7): 522-4.

4 ARTIGO B

**“POSSIBLE INFLUENCE OF INHIBITORS OF TYROSINE KINASE ON THE
EXPRESSION OF HUMAN CXCL12 AND ITS RECEPTOR CXCR4 IN CHRONIC
MYELOID LEUKEMIA.”**

**“POSSIBLE INFLUENCE OF INHIBITORS OF TYROSINE KINASE ON THE
EXPRESSION OF HUMAN CXCL12 AND ITS RECEPTOR CXCR4 IN CHRONIC
MYELOID LEUKEMIA.”**

Abstract

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is characterized by a clonal expansion of myeloid cells and results from an acquired lesion in the DNA of a progenitor cell in the bone marrow. It is characterized genetically by the presence of the Filadélfia chromosome (Ph). The standard treatment for this type of leukemia is the use of tyrosine kinase inhibitors, which imatinib mesylate has been increased in clinical therapy. Although the tyrosine kinase inhibitors are effective chemotherapeutic agents in CML, and almost all patients treated achieve some form of remission, these drugs do not completely eliminate the leukemia. SDF-1, now designated as CXCL12, is a homeostatic chemokine that signals through the chemokine receptor CXCR4, which plays an important role in the process of hematopoiesis, development and organization of the immune system. It is possible that the CXCR4 receptor and others might represent a novel target for the development of effective treatments for this disease. Thus the objective of the present study was to evaluate the expression of the CXCL12 and CXCR4 genes with different treatment protocols in patients with chronic myeloid leukemia. A higher expression of CXCR4 was detected in patients with chronic myeloid leukemia ($p=0.009$) compared to healthy subjects. Furthermore, in this study, the different aspects of therapy in CML were also considered for analysis. In this population, there was an inference from the time of treatment with the same chemotherapy and the expression of CXCR4 transcripts ($p=0.036$) in patients suffering from chronic myeloid leukemia, and the longer treatment time was associated with the increased expression of this receptor. Considering all the individuals, a CXCR4 expression approximately two times higher (1.946) was found in patients with CML compared with healthy controls ($p=0.009$). Interestingly, seven patients were treated for a period equal to or greater than 20 months and all showed marked increase in CXCR4 expression. Patients treated for longer than 20 months showed median CXCR4 expression three times higher than patients treated for less than 10 months ($p=0.043$). Molecular aspects in this paper may assist in leukemia diagnosis and prognosis, as a target in the future that can facilitate the understanding of mechanisms related to leukemia progression.

Key words: CML. Treatment. Imatinib. CXCL12. CXCR4.

4.1 INTRODUCTION

Malignant neoplasms are the third leading cause of death in humans worldwide and their incidence in the population has increased significantly (CANCER NET; INCA, 2010).

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a proliferative disease of the hematopoietic system characterized by an overproduction of cells of granulocytic lineage (KEATING *et al.*, 2005).

CML represents 14% of leukemia cases, with an annual incidence of 1.6 cases per 100.000 individuals. It is more common in adults and affects both gender, with male predominance (DULLEY *et al.*, 2004; FRAZER, *et al.*, 2006).

About 90% of patients diagnosed with CML have a "marker" called the Filadélfia chromosome (Ph) in most bone marrow cell metaphases (NOWELL, 1960). The marker is the result of a translocation involving chromosomes 9 and 22.

This translocation is from the BCR/ABL chimeric gene and encodes a chimeric oncoprotein, which has deregulated tyrosine kinase activity. BCR/ABL expression in hematopoietic cells leads to inhibition of apoptosis, independent of growth factors, changes in cell-cell interactions and cell-matrix and leukemogenesis. Due to the anti-apoptotic activity of this oncogene, BCR/ABL expressing cells are highly resistant to chemotherapeutic agents (FERNANDEZ-LUNA, 2000).

The treatment for Filadélfia chromosome positive CML includes different strategies ranging from simple control the leukocyte count, elimination of Ph positive cells to cell allogeneic replacement or non-specific suppression of neoplastic clone (TEFFERI *et al.*, 2005).

Currently, three treatment modalities show a positive influence on the natural course of CML in the chronic phase: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-BMT), interferon- α (alone or in combination with low dose Ara-C) and tyrosine kinase inhibitors in the BCR/ABL domain, including imatinib mesylate (TEFFERI *et al.*, 2005).

Imatinib mesylate is a signal transduction inhibitor, which inhibits the function of p210 tyrosine kinase and prevents cells expressing this protein to proliferate (DEININGER *et al.*, 1997, KANTARJIAN *et al.* 2002).

However, as it is a new drug, the time to monitor the response to this drug has been very short. The real curative effects of this drug and for how long patients remain in remission are still unknown.

Problems associated with the CML treatment with imatinib mesylate have been identified. Many patients do not respond to medication in advanced stages of the disease, while others respond, but later develop resistance to treatment. In blast crisis, the response has been detected in the short term, and last an average of three to six months (CORTES *et al.*, 2004).

The resistance mechanisms are not completely understood, but include: selection of cells with BCR/ABL over-expression (MAHON *et al.*, 2000), selection of cells

expressing normal BCR/ABL levels, but with mutations in the ABL kinase domain, and selection of cells that may be independent of BCR/ABL expression, possibly due to abnormal activation of other oncogenic pathways. More than one of these mechanisms can exist in the same cell (MELO *et al.*, 2003).

The strategies used to improve survival and prognosis of patients resistant to imatinib mesylate are: combination with other compounds that are active against CML or the use of other BCR/ABL inhibitors.

Drugs such as dasatinib (BMS354825) and nilotinib (AMN107) are more potent than imatinib and are already being utilized in patients resistant to this drug. Other medications such as Bosutinib (SKI-606) and MK0457 are also being tested in patients resistant to Imatinib (HEHLMANN *et al.*, 2005).

The role of chemokines and their involvement in cancer has been discussed. The factor derived from bone marrow stroma 1 (SDF-1/CXCL12) is a chemokine of the CXC subfamily in which, through its receptor (CXCR4), plays major roles in the migration, retention and development of hematopoietic progenitors in bone marrow. Moreover, the CXCL12/CXCR4 system is involved in cancer cell and tumor metastasis chemotaxis (KANG *et al.*, 2005).

It was observed that the leukemic cells escape from apoptosis *in vitro* when in contact with CXCL12-producing cells. It has been suggested that chemokines and their receptors also govern leukemic cell migration and may also contribute to their remarkable resistance to apoptosis induced by chemotherapy. Therefore, the present study investigated the involvement of tyrosine kinase inhibitors on the expression of human CXCL12 and its receptor CXCR4 in chronic myeloid leukemia.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Sample

Following approval from the Human Ethics Committee of the Londrina State University, peripheral blood was collected from 22 patients with clinical and hematological diagnosis for chronic myeloid leukemia. All patients were attended in the University Hospital of Londrina and the Londrina Cancer Institute, Paraná State, Brazil. Peripheral blood was also collected from 54 healthy blood donors of the State University Hospital of Londrina-PR, Brazil.

4.2.2 RNA extraction and cDNA synthesis

Leukocytes were prepared from peripheral blood samples after using Red Blood Cells (RBC) lysis buffer. Total RNA was extracted from white blood cells with Trizol (Trizol LS; Invitrogen™, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA was resuspended in 18 µl sterile water treated with diethylpyrocarbonate (DEPC, Invitrogen™). The cDNA was synthesized using 500 ng and a GeneAmp RNA PCR kit (Perkin Elmer, Part Number N808-0017) with 0.4 mM oligo dT primer using 20 U reverse transcriptase of cloned Moloney murine leukemia virus (M-MLV, Invitrogen™) and 4 U of recombinant ribonuclease inhibitor (RNase Out 19™, Invitrogen™) at 42 ° C for 60 min in a Hybaid PCR Sprint Thermocycler, (Biosystems, Guelph, Ontario, Canada).

4.2.3 Molecular Analysis of Beta-actin mRNA

PCR for beta-actin cDNA was determined as described by AMARANTE *et al.* (2005). Briefly, cDNA synthesis was carried as previously described, and PCR conditions were: 94°C for 1 min followed by 35 cycles at 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72° C for 1 min and finally, 72°C for 10 min in a Hybaid PCR Sprint Thermal Cycler (Biosystems, Guelph, Ontario, Canada).

4.2.4 Quantitative Real-time PCR for CXCL12 and CXCR4 mRNA

Real-time PCR using SYBR green fluorescence was performed with 20 nanograms cDNA in 20 µl total volume. Each real-time PCR reaction consisted of 2.5 µl RT product, 10 µl Platinum[®] SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen™) and 0.25 µM of each sense and antisense primer.

The amount of CXCL12 and CXCR4 cDNA was estimated by the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) amplified using: sense primer (CXCL12) 5' TTA CCC GCA AAA GAC AAG T 3' and antisense primer (CXCL12) 5' AGG CAA TCA CAA 6 AAC CCA GT 3', sense primer (CXCR4) 5' TGTTGGCTGAAAAGGTGGTC 3' and antisense primer (CXCR4) 5' AAAGATGAAGTCGGGAATAGTC 3'. As a housekeeping gene, human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was amplified using the sense primer (GAPDH) 5' GAAGGTGAAGGTCGGA 3' and antisense primer (GAPDH) 5'

GGGTCATTGATGGCAAC 3'. The PCR reaction was performed for 40 cycles as follows: 95°C for 30 sec, 54°C for 30 sec and 72°C for 30 sec in a Chromo4™ Real Time PCR Detection (Bio-Rad, Hercules, USA).

4.2.5 Real Time PCR Analysis

The Ct value corresponds to the cycle number at which the fluorescence exceeds a threshold determined automatically. Data from chronic myeloid leukemia and control groups showed mean Δ Ct values, which were adjusted Ct values for CXCR4 and CXCL12 that were corrected by Ct values for GAPDH from control samples, considering efficiency values, according to the Pfaffl method (Pfaffl, 2001). Subsequently, a melting curve was recorded between 50°C and 98°C with a hold every 2 s.

4.2.6 Statistical Analysis

Gene expression was calculated according to Pfaffl (2001), followed by the paired Student's t test and Anova (with the Tukey' post hoc) test. Both tests were performed using the Relative Expression Software Tool (REST) 2009 and the SPSS Statistics 17.0 Software (2007).

4.3 RESULTS

4.3.1 Analysis of CXCL12 and CXCR4 Gene Expression

Before the CXCL12 mRNA assays, the viability of the RNA samples and cDNA quality were analyzed by conventional PCR for beta-actin, performed with specific primers. All the RNA samples presented detectable quantities of beta-actin mRNA and acceptable integrity during amplification. No contamination with genomic DNA was verified, since all the amplified products presented a fragment corresponding to 353bp.

Analysis of the CXCR4 and CXCL12 gene expression was performed by real-time PCR (qRT-PCR) for transcript detection and quantification.

CXCR4 expression was detected approximately two times higher (1.946) in patients with CML compared with healthy controls ($p=0.009$) by the Student t test for paired

samples. However, no significant change in the CXCL12 expression between groups was 11 observed ($p = 0.702$) by the Student t test for paired samples, as in Figure 1.

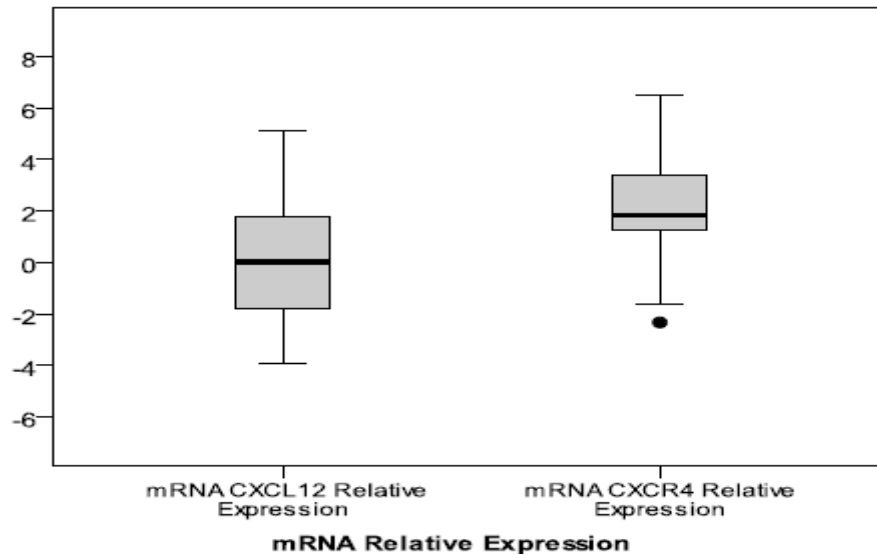


Figure 1 – CXCL12 and CXCR4 mRNA from CML patients compared to healthy subjects. Different expression of CXCL12 ($p=0.702$) and CXCR4 ($p=0.009$) between CML patients and healthy subjects by the Student t test paired samples.

Sixteen of the 22 patients analyzed by qRT-PCR were under treatment with imatinib, 2 patients with dasatinib, 3 patients with nilotinib and 1 patient with hydroxyureia. When analyzing the gene expression of both the CXCL12 and CXCR4 genes with the type of treatment to which patients with CML were submitted at the time of blood collection, no significant difference was observed for any of the genes ($p = 0.916$ for CXCL12 and $p = 0.917$ for CXCR4) (Figure 2).

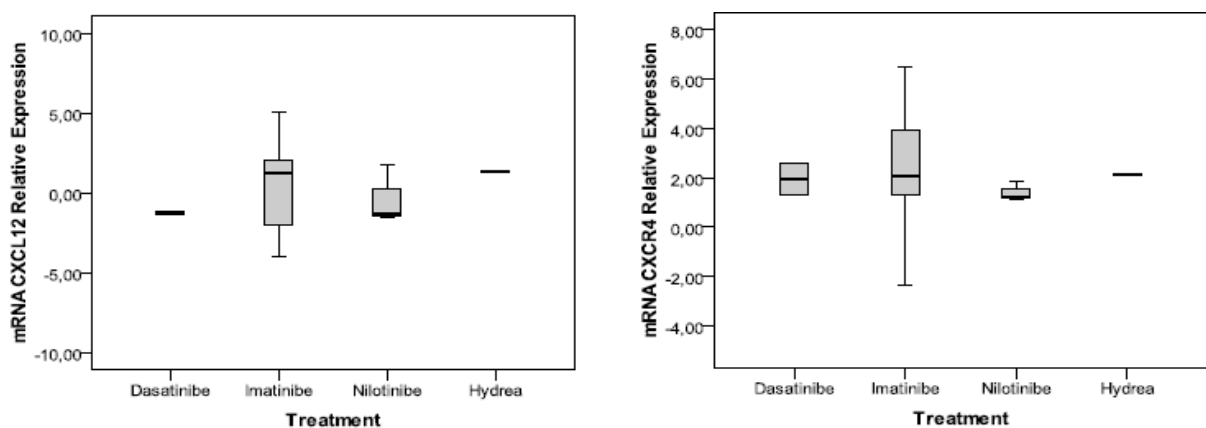


Figure 2 – Therapy with tyrosine kinase inhibitors and CXCL12 and CXCR4 expression. CXCL12 and CXCR4 gene expression for treatment with Dasatinibe, Imatinibe, Nilotinibe and Hydrea in patients with CML ($p = 0.916$ and $p = 0.917$ for CXCL12 to CXCR4), Anova.

However, when the patient treatment time was evaluated, interestingly, seven patients treated for a period equal to or greater than 20 months all showed increased expression for CXCR4. It is possible to suggest that continuous use of the same type of chemotherapy for more than 20 months results in increased CXCR4 gene expression.

This inference was analyzed for the relationship between the gene expression of CXCL12 and CXCR4 in CML patients with treatment time. There was no difference in CXCL12 expression of ($p=0.345$), but the same test showed difference for CXCR4 expression in relation to treatment time ($p=0.036$). In addition, patients with treatment longer than 20 months had CXCR4 gene expression almost three times higher compared to patients with treatment time shorter than 10 months (0.043) by the post hoc Tukey test, as shown in Figure 3.

Increased CXCR4 gene expression in patients in less than 20 months of treatment was due to the combined use of chemotherapy such as dasatinib and nilotinib.

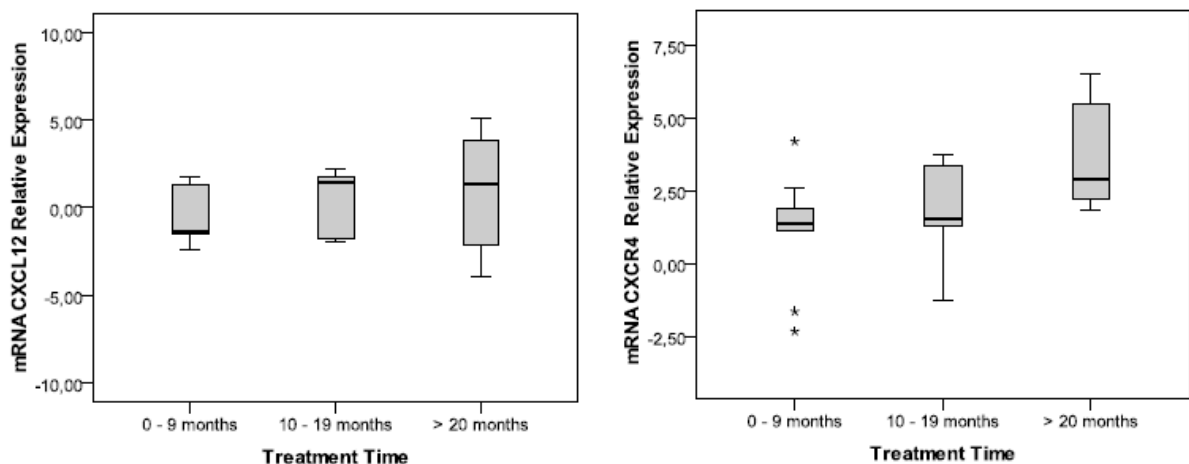


Figure 3 – CXCL12 and CXCR4 gene expression in relation to the treatment time for patients with CML. CXCL12 and CXCR4 gene expression in relation to the treatment time of CML patients ($p = 0.345$ and $p = 0.036$ for CXCL12 to CXCR4), Anova test. The Post-Hoc Tukey analysis was significantly different between times 1-9 months and over 20 months ($p = 0.043$) and was higher in the 6 group with over 20 months' treatment.

4.4 DISCUSSION

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is characterized by a clonal expansion of myeloid cells and results from an acquired lesion in the DNA of a progenitor cell in the bone marrow. It is characterized genetically by the presence of the Filadélfia chromosome (Ph).

This pathology was the first hematologic disease for which a project of rational drug use outlined an effective molecular target therapy (MELO, 2003). Following a better understanding of the molecular basis of CML tyrosine kinase inhibitors were developed such as imatinib mesylate, dasatinib and nilotinib, which proved to be more efficient in controlling the disease than the other types of chemotherapy such as INF- α . This therapy targets the tyrosine kinase enzyme, BCR/ABL and is responsible for much of leukemogenic events in CML. The use of these inhibitors can reverse the malignant changes in the leukemic cells and/or cause cell apoptosis (MANASH; SHAH, 2004).

A high expression of serum CXCL12 and CXCR4 in bone marrow mononuclear cells has been observed in patients with acute myeloid leukemia, with extramedullary infiltration, suggesting that, somehow, this expression is related with the pathogenesis and the characteristic infiltration (ZENG *et al.*, 2005).

Although no significant change in CXCL12 expression was detected in this study, an increase it was found in CXCR4 RNAm expression in patients with CML compared with healthy controls (Figure 1).

Currently, tyrosine kinase inhibitors as imatinib mesylate are the standard treatment for this type of leukemia. Although the tyrosine kinase inhibitors are effective chemotherapeutic agents in CML, and almost all patients treated achieve some form of remission, these drugs do not completely eliminate the leukemia.

Patients with chronic phase CML are immune system effective and generally feel good for extended periods. When symptoms and signs are present, they are generally are mild and related to increased cellular proliferation. Initial therapy is often sufficient to quickly restore effective hematopoieses. After a period of four to six years, chronic phase patients who were not treated invariably progress to a more aggressive stage and acute exacerbation of the disease, highly resistant to chemotherapy and rapidly fatal (QUINTÁS-CARDANA & CORTES, 2006).

While imatinib is effective in most patients with CML, some still in the chronic phase and a higher proportion in later phases are resistant or intolerant to imatinib (JABBOUR, 2008).

Analysis of the expression of both CXCL12 and CXCR4 genes of patients with CML demonstrated no statistically significant difference related to the type of treatment (Figure 2). Most patients showed significantly increased CXCR4 expression. However this increase was not accompanied by increased CXCL12 expression. Therefore, this increase did

not correlate with other factors discussed so far such as dose and type of chemotherapy used in therapy.

It is known that some patients fail initial treatment (primary resistance), while others lose a previously acquired response (secondary resistance), the latter being the most common and associated with the development of mutations in the BCR/ABL site (GOLEMOVIC, 2005; KEAM, 2008). The treatment options for patients resistant or intolerant to imatinib are limited. Tyrosine kinase inhibitors were developed as second generation broad spectrum of activity than imatinib, in order to decrease the chance of developing resistance (BRAVE, 2008).

The resistance mechanisms have been analyzed and the most common is the reactivation of kinase activity by BCR/ABL point mutations or gene amplification (GORRE *et al.*, 2001). A point mutation in the tyrosine kinase binding site can prevent imatinib mesylate binding with the protein by interrupting critical points of contact between them, or by inducing a formation of the protein to which the drug can not bind (BRANFORD *et al.*, 2003). Depending on the type of mutation present, increasing the dose may be a good strategy to restore the response to imatinib mesylate.

Two of these second generation tyrosine kinase inhibitors, nilotinib and dasatinib, have been approved for the treatment of CML after failure or intolerance to imatinib. Unfortunately, many patients fail subsequent treatment with these agents because of the possibility of developing highly resistant mutations. Several other strategies are in use to improve CML treatment, including increasing the imatinib dose combining different therapies, initial uses of second generation tyrosine kinase inhibitors and maintaining therapy with interferon-alpha and vaccine (AGRAWAL *et al.*, 2010).

Analysis of gene expression profiles identified the expression of the chemokine CXCL12 as a predictor of sensitivity to imatinib. Hägerstrand *et al.* (2006) defined the characteristics of an imatinib-sensitive subset of glioma cultures and provided evidence for a functional relationship between sensitivity to imatinib and chemokine signaling. These results will contribute to the design and evaluation of clinical trials exploring the therapeutic effects of imatinib on malignant brain tumors.

Currently the standard CML treatment is chemotherapy by Imatinib (imatinib mesylate, Gleevec). For patients intolerant or resistant to this drug treatment change in treatment is indicated. Substitution therapy by a second generation tyrosine kinase inhibitor, such as dasatinib and nilotinib, is common in such cases.

Peled *et al* (2002) demonstrated that CD34 + Filadélfia-positive CML patients expressing the CXCR4 receptor migrate in response to factors derived from bone marrow stroma (CXCL12). However, CD34 + CXCR4 + but Filadélfia negative (normal) from the same patient showed higher rates of migration by SDF-1 (CXCL12), indicating a functional role mediated by CXCL12 in the retention of CD34 +immature cells and progenitor cells in bone marrow of healthy individuals and CML patients.

In the present study there was no difference in CXCL12 expression, but an increase in CXCR4 expression was verified associated to treatment time ($p = 0.036$) where patients treated for longer than or equal 20 months showed CXCR4 expression three times higher ($p = 0.043$) than patients with treatment time shorter than 10 months (Figure 3).

We also note that other patients demonstrated an increased CXCR4 expression even in shorter treatment times with the current chemotherapy. It is important to remember that there is a plan to be followed as to which medicine will be adopted in the treatment of chronic myelogenous leukemia.

Some patients had high CXCR4 expression levels even in treatment times shorter than 20 months. These same patients were using second generation tyrosine kinase, either dasatinib and nilotinib. Therefore, despite the short treatment duration with current chemotherapy, these patients received imatinib for a time until the change in medication.

Jin *et al.* (2008) demonstrated the increase CXCR4 expression due to treatment with imatinib (imatinib mesylate, Glevec) induced leukemic cell migration to bone marrow stroma, which promoted survival of quiescent CML cells.

Vianello *et al.* (2010) reported that the leukemic cell survival mechanism in CML mediated by bone marrow stroma mesenchymal cells is related to protection from apoptosis induced by imatinib, through CXCL12/CXCR4 activation. In addition, it also showed that the CXCL12/CXCR4 spindle lock restores in part leukemic cell sensitivity to imatinib (VIANELLO, 2010).

A wide variety of strategies, such as peptides, small molecules, antibodies, and small interfering RNA have been used to target this pathway. Treatments in combination with current therapies seem to be especially promising in preclinical studies (WONG, 2008).

Zeng *et al.* (2006) described CXCR4 inhibition with the novel RCP168 peptide that overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. Although imatinib is an effective chemotherapy for chronic myeloid leukemia (CML), and almost all patients treated with imatinib achieve some form of remission, imatinib does not completely eliminate the leukemia (CORTES, 2005).

Therefore, although it is a relatively new chemotherapy treatment, it can be inferred that the high expression values of these patients are due to prolonged use of the same drug.

Finally, several mechanisms should be considered in treatment failure with imatinib, and they should be clarified to offer the patient the best second-line treatment, whether dose optimization, another tyrosine kinase inhibitor or bone marrow transplantation (PAGNANO, 2008).

In future, multiple treatment options will be available to CML patients. In addition, strategic combinations of new anticancer drugs, taking into account the patient's condition and response to different drugs in the same place, might act directly on the genes expressed and prevent new resistant clones.

Thanks.

The authors of this paper gratefully acknowledge the participation of all donors of biological samples and Institutions for the Promotion of scientific research, PROPPG-UEL, CAPES, CNPq and Araucaria Foundation

References

- AGRAWAL M, GARG RJ, KANTARJIAN H, CORTES J. Chronic Myeloid Leukemia in the Tyrosine Kinase Inhibitor Era: What Is the "Best" Therapy? *Curr Oncol Rep.* 2010.
- AMARANTE MK, DE LUCCA FL, DE OLIVEIRA CE, FUNGARO MHP, REICHE EM, MUXEL SM, WATANABE MAE. Expression of noncoding mRNA in human blood cells activated with synthetic peptide of HIV. *Blood cells, molecules & diseases* 2005 ; 35 (2): 286-90 .
- BRANFORD S, RUDZKI Z, WALSH S, PARKINSON I, GRIGG A, SZER J, TAYLOR K, HERRMANN R, SEYMOUR JF, ARTHUR C, JOSKE D, LYNCH K, HUGEHS T. Detection of BCR/ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*, v. 102, n. 1, p.276-83, 2003.
- BRAVE M, GOODMAN J, KAMINSKAS E. Sprycel for chronic myeloid leukemia and Filadélfia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. *Clin Câncer Res.* 2008;14(2):352-9.
- CANCER NET. Oral complications of chemotherapy and head/neck radiation: Supportive care-health professionals. Disponível em: <http://www.cancernet.nci.nih.gov>. Acessado em: 20 jun. 2010.
- CORTES JE, O'BRIEN SM, GILES M. Investigational strategies in chronic myelogenous leucemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 18, p. 619-639, 2004.
- CORTES J, TALPAZ M, O'BRIEN S, JONES D, LUTHRA R, SHAN J, GILES F, FADERL S, VERSTOVSEK S, GARCIA-MANERO G, RIOS MB, KANTARJIAN H. (2005). Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin. Cancer Res.*, 11, 3425–3432.
- DEININGER MWN, GOLDMAN JM, LYDON N, MELO JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR/ABL-positive cells. *Blood*, v. 90, n. 9, p. 3691-3698, 1997.
- DULLEY F, HAMERSCHLACK N. Leucemia mielóide crônica. *Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (Abrale)*, n. 25, p. 11-12, 2004.
- FERNANDEZ-LUNA, J L (2000) BCR/ABL and inhibition of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Apoptosis*, 5: 315-8.
- FRAZER, R.; IRVINE, A.E.; MCMULLIN, M.F. Chronic myeloid leukaemia in the 21st Century. *Ulster Med. J.*, Belfast , v. 76(1), p. 8-17, November 2006.
- GOLEMOVIC M, VERSTOVSEK S, GILES F, CORTES J, MANSHOURI T, MANLEY PW, MESTAN J, DUGAN M, ALLAND L, GRIFFIN JD, ARLINGHAUS RB, DOM T, KANTARJIAN H, BERAN M. AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of BCR/ABL, has in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2005;11;4941-7.

GORRE ME, MOHAMMED M, ELLWOOD K, HSU N, RON P, NAGESH PR, SAWYERS CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR/ABL gene mutation or amplification. *Science*, v. 293, p. 876-880, 2001.

HÄGERSTRAND D, HESSELAGER G, ACHTERBERG S, WICKENBERG BOLIN U, KOWANETZ M, KASTEMAR M, HELDIN CH, ISAKSSON A, NISTÉR M, OSTMAN

A. Characterization of an imatinib-sensitive subset of high-grade human glioma cultures. *Oncogene*. 2006 10;25(35):4913-22.

HEHLMANN R, BERGER U, HOCHHAUS A. Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. *Ann Hematol* 84: 487-497, 2005.

INCA. Particularidades do câncer infantil. Disponível em: <http://www.inca.org.br/cancer/tipos.html>. Acesso em: 20 jun. 2010.

JABBOUR E, CORTES J, GHANEM H, O'BRIEN, KANTARJIAN H. Target therapy in chronic myeloid leukemia. *Expert Rev. Anticancer Ther*. 2008;8(1):99-110.

JIN L, TABE Y, KONOPLEV S, XU Y, LEYSATH CE, LU H, KIMURA S, OHSAKA A, RIOS MB, CALVERT L, KANTAJARIAN H, ANDREEFF M, KONOPLEVA M. CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7(1). January 2008.

KANG, H; MANSEL, R E AND JIANG, W G (2005). Genetic manipulation of stromal cell-derived factor attests the pivotal role of the autocrine SDF-1-CXCR4 pathway in the aggressiveness of breast cancer cells. *Int J Oncol*, 26(5): 1429-34.

KANTARJIAN, H.M; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S. *et al*. Imatinib mesylate for Filadélfia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon-alpha: follow-up results. *Clinical Cancer Research*, v. 8, p. 2177–2187, 2002.

KEAM S. Dasatinib. In chronic myeloid leukemia and Filadélfia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Adis Drug Profile*. 2008;22(1):59-69.

KEATING, M. J.; KANTARJIAN, H. Leucemias crônicas. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. (Org.). *Cecil: tratado de medicina interna*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

p. 1331-1336.

MAHON, F.X.; DEININGER, M.W.; SCHULTHEIS, B. *et al*. Selection and characterization of BCR/ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*, v. 96, p. 1070-1079, 2000.

MANASH, K. P.; MURKHOPADHYAY, A. K. Tyrosine kiansé – Role and significance in cancer. *Int. J. Med. Sci.*, p.101-115, June 2004.

MELO, J.V.; HUGHES, T.P.; APPERLEY, J.F. Chronic myeloid leukemia. *Hematology (American Society of Hematology Educational Program)*, p. 132-152, 2003.

NOWELL, R.; HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human granulocyte leukemia. *Science* 1960, p. 132, 1497.

PAGNANO, K. B. B. Leucemia Mielóide Crônica – Causas de falha do tratamento com mesilato de imatinibe Rev. bras. hematol. hemoter. 2008;30(Supl. 1):22-26.

PELED A; HARDAN I; TRAKHTENBROT, L; GUR, E; MAGID, M; DARASH-YAHANA, M; COHEN, N; GRABVSKY, V; FRANITZA, S; KOLLET, O; LIDER, O, ALON, R; RECHAVI, G; LAPIDOT (2002). Immature leukemic CD34+CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. *Stem Cells*, 259-66.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, N^o 9, 2001.

QUINTÁS-CARDAMA A, CORTES JE. Chronic myeloid leukemia: Diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 81(7): 973-988, 2006.

SHAH, N. P.; TRAN, C.; LEE, F. Y.; CHEN, P.; NORRIS, D.; SAWYERS, C. L. Overriding Imatinib Resistance with a Novel ABL Kinase inhibitors. *Science*, Washington, v. 305, p. 309-491, Jul. 2004.

TEFFERI A, DEWALD GW, LITZOW ML, CORTES J, MAURO MJ, TALPAZ M, KANTARJIAN HM. Chronic myeloid leukemia: Current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 80(3): 390-402, 2005.

VIANELLO F, VILLANOVA F, TISATO V, LYMPERI S, HO KK, GOMES AR, MARIN D, BONNET D, APPERLY J, LAM EWF, DAZZI F. Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica* 2010; 95(7).

WONG D, AND KORZ W. Translating an Antagonist of Chemokine Receptor CXCR4: From Bench to Bedside. *Clin Cancer Res* 2008;14:7975-7980.

ZENG, D F; KONG, P Y; CHENG, X H; WEI, L; CHANG, C AND PENG, X G (2005). The expression and clinical significance of stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 in acute leukemia and malignant lymphoma. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 44(7): 522-4.

ZENG Z, SAMUDIO IJ, MUNSELL M, AN JING, HUANG Z, ESTEY E, ANDREEFF M, AND KONOPLEVA M. Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. *Mol Cancer Ther* 2006;5:3113-312.

CONCLUSÃO

- Não houve relação entre a presença do polimorfismo 3'A para o CXCL12 e os pacientes acometidos por Leucemia Mielóide Crônica, visto que a distribuição genotípica do polimorfismo CXCL12 rs1801157 em pacientes com leucemia mielóide crônica e indivíduos saudáveis não foram estatisticamente diferentes.
- No presente estudo, detectamos uma maior expressão de CXCR4 (1,946 vezes maior) nos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica ($p = 0,009$) em comparação ao indivíduos saudáveis (normais).
- Não houve associação entre a expressão de CXCL12 e a expressão de CXCR4, teste de correlação de Spearman não significativo ($p = 0,621$).
- Nesse trabalho, o tipo de quimioterápico e as doses utilizadas durante o tratamento não influenciaram na expressão dos transcritos nos genes CXCL12 e CXCR4 em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica.
- Na população em estudo, há uma inferência entre o tempo de tratamento com um mesmo quimioterápico e a expressão dos transcritos do gene CXCR4 nos pacientes acometidos por Leucemia Mielóide Crônica ($p = 0,036$), sendo que quanto maior o tempo de tratamento maior é a expressão do receptor.
- Imatinibe por tempo prolongado pode induzir aumento da expressão do gene CXCR4. Esta aumento pode indicar uma possível falha no tratamento e sinalizar uma recidiva da doença. Faz-se necessário, portanto, buscar uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese assim como outros alvos e alternativas terapêuticas para a Leucemia Mielóide Crônica.

Agradecimentos

Os autores do presente trabalho agradecem a participação de todos os doadores de amostras biológicas e as Instituições de Fomento à pesquisa científica, PROPPG-UEL, CAPES, CNPq e Fundação Araucária.